

ALMA MATER STUDIORUM
UNIVERSITA' DI BOLOGNA

FACOLTA' DI SCIENZE MATEMATICHE FISICHE E NATURALI

Corso di laurea magistrale in BIOLOGIA MARINA

**CRESCITA E PRODUZIONE DI TOSSINE NELLA
DIATOMEA *PSEUDO-NITZSCHIA MULTISTRIATA*
ISOLATA NEL NORD ADRIATICO**

Tesi di laurea in Biologia e Fisiologia Algale

Relatore:

Prof.ssa Rossella Pistocchi

Presentata da:

Monica Raccagni

Correlatori:

Dott.ssa Franca Guerrini

Dott.ssa Elena Riccardi

I sessione

Anno Accademico 2012/2013

INDICE

1 INTRODUZIONE.....	4
1.1 FITOPLANCTON E FENOMENI DANNOSI.....	4
1.1.1 <i>Organismi che causano HABs</i>	6
1.1.2 <i>Impatti negativi dei bloom algali</i>	7
1.1.3 <i>Fattori scatenanti dei fenomeni HAB</i>	9
1.2 AMNESIC SHELLFISH POISONING (ASP).....	11
1.2.1 <i>Casi di intossicazione</i>	11
1.2.2 <i>Acido domoico: struttura e meccanismo d'azione</i>	13
1.2.3 <i>Normativa e livelli di tolleranza</i>	16
1.3 IL GENERE <i>PSEUDO-NITZSCHIA</i>	20
1.3.1 <i>Caratteristiche generali</i>	20
1.3.2 <i>Distribuzione geografica delle fioriture di Pseudo-nitzschia spp</i>	25
1.3.3 <i>Fattori che influenzano la tossicità</i>	29
1.3.3.1 <i>Tossicità e fase di crescita</i>	30
1.3.3.2 <i>Tossicità e parametri fisici</i>	31
1.3.3.3 <i>Tossicità e macronutrienti</i>	32
1.3.4 <i>Pseudo-nitzschia multistriata</i>	35
2 SCOPO DELLA TESI.....	39
3 MATERIALI E METODI.....	41
3.1 ISOLAMENTO DELLA SPECIE.....	41
3.2 ALLESTIMENTO COLTURE BATCH.....	42
3.3 DISEGNO SPERIMENTALE.....	45
3.4 VALUTAZIONE DELLA CRESCITA ALGALE.....	46
3.4.1 <i>Curve di crescita</i>	46
3.4.2 <i>Metodo Utermöhl</i>	48
3.5 MISURA DELL'ATTIVITÀ FOTOSINTETICA.....	49
3.6 STIMA DEL BIOVOLUME.....	51
3.7 STIMA DEL CARBONIO ORGANICO PARTICOLATO (POC).....	52
3.8 ANALISI DEI NUTRIENTI	54
3.8.1 <i>Fosfati disciolti</i>	54
3.8.2 <i>Nitrati disciolti</i>	55
3.8.3 <i>Nutrienti assimilati</i>	56
3.9 QUANTIFICAZIONE DEL CONTENUTO DI ACIDO DOMOICO.....	57
3.9.1 <i>Preparazione e purificazione dei campioni</i>	57
3.9.2 <i>Cromatografia liquida associata a spettrometria di massa (LC-MS/MS)</i> ..	59
4 RISULTATI E DISCUSSIONE.....	63
4.1 PRESENZA E TOSSICITÀ DI <i>P. MULTISTRATA</i> IN ADRIATICO	63
4.2 ESPERIMENTO PRELIMINARE – EFFETTO DELLA BASSA TEMPERATURA (16°C) E DELLA CARENZA DI FOSFORO SU CRESCITA E TOSSICITÀ DI <i>P. MULTISTRATA</i>	65
4.2.1 <i>Valutazione della crescita</i>	65
4.2.2 <i>Misura dell'efficienza fotosintetica</i>	66
4.2.3 <i>Stima del biovolume e carbonio cellulare</i>	68
4.2.4 <i>Assimilazione dei nutrienti</i>	69

4.2.5	<i>Quantificazione di acido domoico intracellulare</i>	72
4.3	EFFETTO DI VARIAZIONI DI TEMPERATURA E NUTRIENTI SU CRESCITA E TOSSICITÀ DI <i>P.</i>	
	<i>MULTISTRIATA</i>	74
4.3.1	<i>Valutazione della crescita</i>	74
4.3.2	<i>Misura dell'efficienza fotosintetica</i>	76
4.3.3	<i>Stima del biovolume e carbonio cellulare</i>	79
4.3.4	<i>Assimilazione dei nutrienti</i>	83
4.3.5	<i>Quantificazione di acido domoico intracellulare</i>	87
5	CONCLUSIONI	91
6	BIBLIOGRAFIA	95
7	RINGRAZIAMENTI	107

1 INTRODUZIONE

1.1 Fitoplancton e fenomeni dannosi

Gli habitat marini più ricchi della terra si trovano nelle zone temperate, e sono caratterizzati da acque fredde, nelle zone costiere di un verde opaco e spesso torbide tanto da non permettere più di un paio di metri di visibilità subacquea. In larga misura è proprio nel loro essere verdi e torbidi che si nasconde il segreto della loro ricchezza; le acque delle zone temperate sono, infatti, sature di nutrienti e il colore verde deriva, almeno in parte, dall'immenso volume di vita microscopica che le abita. Questi organismi appartengono alla comunità planctonica e rappresentano la più grande risorsa alimentare del sistema marino; "plancton" deriva dal greco "ciò che è vagante" e comprende quindi l'insieme dei piccolissimi organismi animali e vegetali che vivono in sospensione fluttuando nell'acqua trasportati passivamente dalle acque. Esso è distinto in zooplancton, composto da organismi animali, fitoplancton, composto da organismi vegetali, e batteri (Ghirardelli, 1981).

Al fitoplancton appartengono gli organismi vegetali autotrofi fotosintetici presenti nel plancton, che sono in grado di utilizzare l'energia solare, attraverso il processo di fotosintesi, per trasformare la materia inorganica disciolta in composti organici utili ai vari processi vitali. Le alghe planctoniche sono i produttori primari più importanti degli ecosistemi e rivestono quindi un ruolo fondamentale nella fissazione del carbonio a livello globale. La loro capacità fotosintetica è enorme e supera di molto quella delle piante terrestri. Esse contribuiscono inoltre al rifornimento di ossigeno nell'atmosfera e rappresentano il primo anello delle catene alimentari degli ambienti acquatici. L'autotrofia è possibile grazie alla presenza di pigmenti fotosintetici quali clorofilla, carotenoidi e ficobiliproteine. Per effettuare la fotosintesi il fitoplancton necessita inoltre di luce e nutrienti disciolti, in particolare azoto e fosforo (e silicio per le diatomee).

Il fitoplancton comprende una grandissima varietà di generi con diverse capacità di sfruttare al meglio la disponibilità di luce e nutrienti e allo stesso tempo in grado di sviluppare differenti adattamenti in risposta alla variabilità ambientale. Le mutate condizioni ambientali possono quindi favorire alcune specie in grado di adattarsi

meglio alle nuove condizioni a scapito di altre; in certe condizioni ambientali, ad esempio, potrebbero diventare dominanti specie fitoplanctoniche normalmente di scarsa rilevanza, come specie algali tossiche. A questo proposito la comprensione delle variazioni strutturali e/o dinamiche che possono avvenire, in conseguenza di cambiamenti ambientali, a questo livello della catena trofica, è quindi di fondamentale importanza non solo per la comprensione del funzionamento dell'intero ecosistema marino costiero ma anche alla luce del fatto che alcune specie sono coinvolte in importanti fenomeni ecologici, come la produzione di sostanze gelatinose (mucillagini) (Pistocchi et al. 2005), la produzione di fitotossine (Boni et al., 2001; Ciminiello et al., 2006) o la formazione di maree colorate.

La capacità naturale delle microalghe di dar luogo ad intense fioriture è normalmente considerata benefica per le produzioni secondarie, sia in ambiente naturale che negli allevamenti, tanto che il fitoplancton, per il ruolo svolto rispetto alle catene alimentari acquatiche, è considerato come il corrispondente dell'*erba* dell'ambiente terrestre (Reynolds, 2007). Tuttavia, il fitoplancton può avere anche degli sviluppi con effetti nocivi, generando intense fioriture, conosciute nel loro insieme come Harmful Algal Blooms (HABs). Il termine HABs è stato per la prima volta introdotto nel 1974 in occasione della "1st International conference of blooms of toxic dinoflagellates", ed è usato per una ampia gamma di fenomeni ma che condividono due caratteristiche: l'essere causati da microalghe e avere spesso grossi effetti negativi sulle attività umane.

In generale per *bloom fitoplanctonico* si intende un improvviso aumento di una popolazione microalgale che grazie alle proprie strategie adattative e a condizioni ambientali ideali riesce a raggiungere concentrazioni di 10^4 - 10^5 cell /L in un determinato periodo di tempo (generalmente 1-3 settimane). La densità cellulare può essere così alta che le acque diventano in alcuni casi rosse (da cui il termine "maree rosse") ma anche verdi o marroni (Fig 1).



Fig. 1: alcuni esempi di fioriture algali: da sinistra *Noctiluca scintillans*, *Lingulodinium polyedrum*, *Lepidodinium chlorophorum* (Foto Daphne ARPA ER).

Le eterogeneità degli HABs invece risiedono nelle specie di organismi causativi, nel tipo di impatto e nella dinamica con cui si sviluppano.

1.1.1 Organismi che causano HABs

La lista di specie microalgali potenzialmente coinvolte negli HABs comprende circa 80 specie tossiche e 200 specie nocive su un totale approssimativo di 4000 microalghe marine planctoniche descritte (Sournia, 1995). Questa lista però è aumentata in modo significativo negli ultimi anni a causa di numerosi nuovi eventi dannosi, lo sviluppo della ricerca scientifica in questo campo e l'aumento delle interazioni dell'uomo con la zona costiera (Andersen, 1992).

Non è un compito facile attribuire ad una specie nota lo sviluppo di un fenomeno dannoso; la tossicità ed altri effetti negativi causati da alghe dannose non sono infatti limitati ad una singola classe di alghe o a pochi generi, ma sono distribuiti tra diversi gruppi tassonomici. Le specie dannose appartengono, infatti, a sei diversi gruppi tassonomici (diatomee, dinoflagellate, Haptophyta, Raphidophyta, Cyanophyta e Pelagophyta) che differiscono enormemente in termini di caratteristiche morfologiche, fisiologiche e ecologiche.

In termini di impatti negativi invece possiamo considerare tre tipi differenti di organismi causativi; i produttori di sostanze tossiche, i produttori di grande biomassa e quelli che sono legati ad entrambe queste caratteristiche.

1.1.2 Impatti negativi dei bloom algali

Sono state identificate quattro categorie di impatti nocivi legate alle microalghe marine (Zingone and Enevoldsen, 2000):

1. **Danni all'ecosistema marino;** un certo numero di HABs possono provocare seri danni ad altri organismi che pur non avendo un significativo valore commerciale per l'uomo sono componenti essenziali al funzionamento dell'ecosistema marino. In particolare la presenza simultanea di particolari condizioni fisiche e ambientali (luce ideale, buon apporto di nutrienti e scarsa movimentazione dell'acqua) possono amplificare gli effetti di anossia causati dalla presenza di alta biomassa fitoplanctonica. In altri casi possono verificarsi cambiamenti della comunità e rete trofica marina, o mortalità massiva di singole popolazioni di organismi (mammiferi marini, uccelli, pesci).
2. **Danni al turismo e ad altri usi ricreativi delle zone costiere;** buone condizioni dell'acqua marina (trasparenza, colore e odore) sono necessarie per un vantaggioso sfruttamento delle zone costiere per scopi ricreativi. I bloom algali spesso deteriorano tali caratteristiche con seri danni economici che negli ultimi anni hanno portato il fenomeno delle “maree rosse” all'attenzione del pubblico e delle autorità.
3. **Danni a risorse marine;** diversi tipi di alghe dannose generano mortalità di massa di organismi selvatici o di allevamento che sono preziose risorse alimentari per l'uomo. Alcuni esempi di specie ittiotossiche come le Raphidophyceae *Heterosigma akashiwo* e *Chattonella marina*, e molte dinoflagellate provocano la morte di pesci o invertebrati in vario modo; producendo tossine, causando ostruzioni meccaniche o lesioni alle branchie, riducendo la concentrazione di ossigeno derivante dall'alto tasso di respirazione fitoplanctonica e più spesso dalla respirazione batterica durante la fase di senescenza delle alghe.
4. **Rischi per la salute umana;** la maggior parte di microalghe produttrici di tossine appartengono alle dinoflagellate, ma esistono anche diatomee e qualche cianobatterio in grado di produrle. Alcune tossine algali, diverse per struttura e tossicità, possono raggiungere l'uomo in vari modi (Fig. 2); con il consumo di molluschi bivalvi, crostacei o di pesci tropicali che filtrando l'acqua di mare

hanno accumulato la tossina algale, attraverso l'inalazione dell'aerosol di acqua di mare contenente specie tossiche e che causerà problemi respiratori, o anche con irritazioni allergiche alla pelle. Attualmente si contano circa 2000 casi di intossicazione nell'uomo dovuta al consumo di molluschi o pesci vettore ogni anno (Hallegraeff et al., 1995, 2003). Questi dati rappresentano probabilmente una sottostima poiché, soprattutto per i casi con sintomi gastrointestinali, sono molte le diagnosi incorrette.

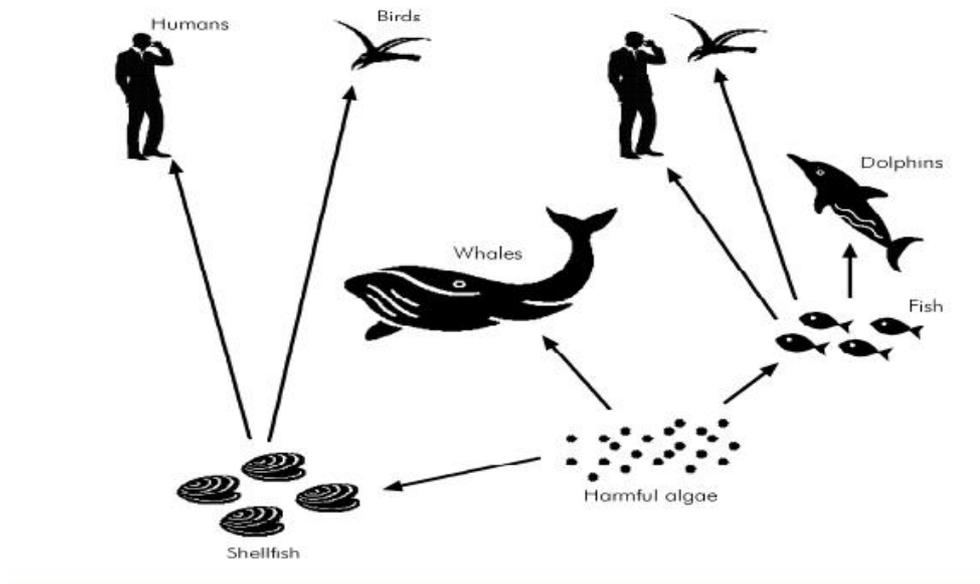


Fig. 2: Harmful algae, vie di intossicazione

A proposito di sintomi nell'uomo si riportano cinque principali sindromi da intossicazione dovuta al consumo di molluschi contaminati:

- ♣ **Paralytic shellfish poisoning (PSP):** sindrome causata dal gruppo delle Saxitossine (SXTs) prodotte da tre generi di Dinoflagellate (*Alexandrium*, *Gymnodinium* e *Pyrodinium*) e che agiscono sui canali del sodio voltaggio-dipendenti in nervi e cellule muscolari portando alla paralisi.
- ♣ **Diarrhoetic shellfish poisoning (DSP):** causata da Acido Okadaico (OA) e i suoi analoghi Dinophysitossine (DTXs) prodotte dalle dinoflagellate *Dinophysis* spp. e *Prorocentrum* spp. L'effetto è quello di stimolare la fosforilazione delle proteine che controllano la secrezione del sodio nelle

cellule intestinali.

- ⤴ **Neurotoxic shellfish poisoning (NSP)**: causata da Brevittossina sintetizzata dalle dinoflagellate *Gymnodinium breve* e *Ptychodiscus brevis*. Questa tossina agisce controllando la generazione del potenziale d'azione in cellule nervose, muscolari e del tessuto cardiaco provocando una incessante attivazione di tali cellule.
- ⤴ **Azaspiracid shellfish poisoning (AZP)**: sindrome scoperta più di recente e causata dal gruppo degli Azaspiracidi che agisce distruggendo la struttura citoscheletrica delle cellule e comprende più di 20 analoghi. Gli AZA sono stati identificati in due dinoflagellate *Protoperidinium crassipes* e *Azadinium spinosum*.
- ⤴ **Amnesic shellfish poisoning (ASP)**: l'unica sindrome causata da una diatomea (*Pseudonitzschia* spp) verrà trattata più dettagliatamente in seguito in quanto oggetto di questa tesi.

1.1.3 Fattori scatenanti dei fenomeni HAB

Dell'incremento degli HABs sembrerebbero responsabili più cause, capaci di agire contemporaneamente, ed i cui singoli effetti sono difficilmente distinguibili l'uno dall'altro. I fattori che influenzano positivamente lo sviluppo di una specie algale tossica o di un bloom vanno dalla natura della specie stessa, la sua biologia, il suo ciclo vitale, le interazioni con le altre specie, le variazioni di temperatura e salinità, del clima, la disponibilità di nutrienti ed in generale tutte le variazioni dell'ecosistema causate dall'impatto antropico.

Nonostante ci siano ancora molti dubbi sulla misura in cui gli impatti umani possano contribuire agli HABs, le modificazioni dello stato trofico, dovute alle pressioni antropiche esercitate direttamente sugli ecosistemi marini costieri e indirettamente, attraverso l'uso dei territori dei bacini idrografici, possono aiutare a spiegare, almeno in parte, l'espansione degli HABs. Ad esempio l'aumento della distribuzione geografica delle specie dannose può essere imputato al trasporto di stock di molluschi, acque di zavorra e plastiche galleggianti causato dall'uomo. L'espansione degli HABs viene indicata come connessa anche con altri fattori, come le modificazioni

dell'idrodinamismo nei sistemi costieri, in particolare con la creazione di aree di confinamento (Vila et al., 2001; Masò e Garcés, 2006), il sovrasfruttamento delle risorse marine, soprattutto con la pesca (Vasas et al., 2001; Walsh et al., 2011), ed i possibili effetti dei cambiamenti climatici indotti dalle attività umane (Hallegraeff, 2010).

E' stato spesso ipotizzato un ruolo favorente svolto dall'eutrofizzazione e/o dal cambiamento dei rapporti stechiometrici dei nutrienti (Anderson et al., 2002; Heisler et al., 2008) che in certe zone sembrerebbe un fattore chiave. Sorgenti antropogeniche di nutrienti sono ad esempio i fertilizzanti agricoli, l'uso di combustibili fossili, lo scarico di rifiuti umani e le conseguenze della produzione animale (Nixon, 1995; National Research Council, 2000). Le zone costiere di tutto il mondo sono sottoposte a sempre più consistenti ingressi di nutrienti come conseguenza delle attività umane e il carico di fosforo nelle acque marine è aumentato di tre volte rispetto ai livelli pre-industriali e pre-agricoli, il flusso di azoto è aumentato ancora di più (National Research Council, 2000). E' necessario inoltre tenere in considerazione che l'assimilazione dei nutrienti da parte delle microalghe dipende da molti fattori come le preferenze o lo stato nutrizionale e le capacità di uptake. Le dinoflagellate ad esempio hanno evoluto varie strategie di adattamento (bassa affinità ai nutrienti, preferenza per forme ridotte di azoto e la capacità di assumere azoto e carbonio anche da forme organiche o mixotrofia), mentre le diatomee sembrano svantaggiate con gli alti rapporti N:Si e P:Si che si misurano sempre più spesso lungo le coste a causa dell'impatto umano.

Anche gli stadi di quiescenza del ciclo vitale della specie sono importanti come fase iniziale di un bloom, e l'interazione alghe-batteri gioca un ruolo nell'eventuale produzione di tossine. Quest'ultima, infatti, sembrerebbe associata ad attività allelopatiche di inibizione della crescita di altre specie algali in competizione o come deterrente alla predazione di erbivori.

1.2 Amnesic Shellfish Poisoning (ASP)

1.2.1 Casi di intossicazione

Il primo caso documentato di intossicazione da ASP si verificò in Canada nel 1987, quando più di 100 persone vennero colpite dopo aver mangiato mitili provenienti da Prince Edward Island (PEI). L'intossicazione venne clinicamente definita dal presentarsi di disturbi gastrointestinali entro 24 ore e/o di insoliti disturbi neurologici entro 48 ore dal consumo dei molluschi. Ci furono circa 150 segnalazioni di disturbi, ma solo 107 vennero caratterizzati come ASP, e tra essi i sintomi gastrointestinali più comuni erano vomito, crampi addominali e diarrea mentre i sintomi neurologici erano caratterizzati da forti mal di testa o perdita di memoria a breve termine. Di questi 107 casi 12 richiesero un trattamento intensivo per gravi disturbi (coma, pressione sanguigna instabile, abbondanti secrezioni respiratorie) e 3 pazienti morirono in ospedale 11-24 giorni dopo il consumo dei molluschi (Jeffery et al., 2004).

Le cozze di negozi e ristoranti di PEI vennero analizzate e furono trovate considerevoli quantità della tossina neuroeccitatoria conosciuta come acido domoico (DA). Le concentrazioni di DA nei mitili andavano da 1,9 a 5,2 mg/g di tessuto edibile (Perl et al., 1990), mentre non fu trovato DA nei fluidi dei 12 pazienti analizzati, probabilmente perché erano trascorsi due giorni dall'ingestione dei molluschi.

L'origine dell'acido domoico fu collegata ad un bloom di quella che era allora chiamata *Nitzschia pungens*, ora conosciuta come *Pseudo-nitzschia multiseries* (Hasle, 1995).

Fioriture tossiche di *P. multiseries* si ripresentarono lungo la costa est del Canada anche per i seguenti tre anni ma le intossicazioni all'uomo furono prevenute grazie ad un intenso programma di monitoraggio (Mos, 2001).

Fu proprio grazie al costante monitoraggio che fu possibile descrivere ulteriori casi di ASP nel mondo (Fig. 3).

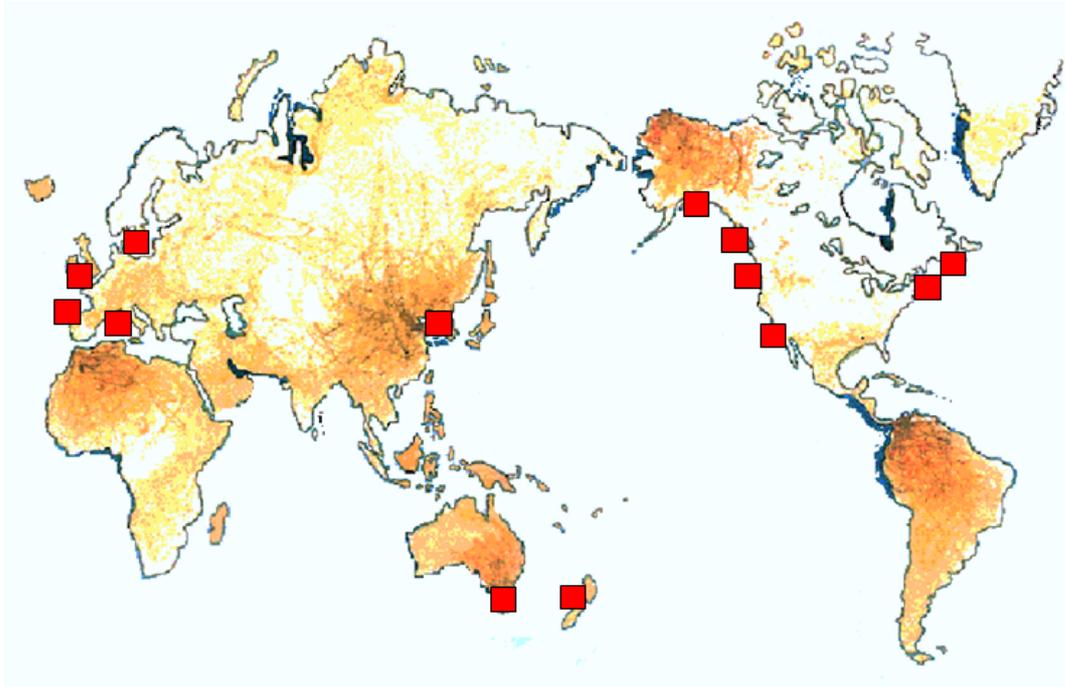


Fig. 3: distribuzione dei casi di ASP nel mondo

Nel 1989 l'acido domoico prodotto da *P. pseudodelicatissima*, fu trovato nei mitili (*Mytilus edulis*) provenienti da Bay of Fundy (Martin et al., 1990).

Nel 1991 si verificò il primo bloom tossico di *Pseudo-nitzschia* spp nella costa Pacifica degli Stati Uniti. Più di 100 pellicani bruni (*Pelacanus occidentalis*) e cormorani di Brandt (*Phalacrocorax penicillatus*) morirono a Monterey Bay, in California, dopo essersi nutriti di acciughe contaminate da un'altra specie tossica *P. australis*. Fioriture di *P. australis* continuarono ad essere comuni lungo la costa Pacifica fino al 1994.

Acido domoico fu ritrovato in granchi, acciughe e sardine nel 1996, quando centinaia di uccelli marini furono uccisi nel Messico (Sierra Béltran et al., 1997).

Nel 1998 furono segnalate altre due intossicazioni nelle coste americane; la prima si presentò nell'area costiera dello Stato di Washington (Wekell et al., 1994) dove alti livelli di DA furono trovati nei granchi di Dungeness (*Metacarcinus magister*), la seconda colpì 400 leoni marini (*Zalophus californianus*) che arrivarono morti lungo le rive della costa Californiana tra Maggio e Giugno. Fu trovato acido domoico nelle feci e frustuli di *P. australis* nelle interiora delle acciughe di cui probabilmente i leoni marini si erano nutriti.

1.2.2 Acido domoico: struttura e meccanismo d'azione

La principale tossina responsabile dell'ASP è l'acido domoico, un amminoacido appartenente alla classe dei Kainoidi. Fu isolato per la prima volta nel 1958 in Giappone dalla macroalga rossa *Chondria armata*, e gli fu di conseguenza dato il nome di alga marina che in Giapponese si traduce “domoi”. La seguente sua identificazione come tossina neuro tossica fu subito trattata con scetticismo, in quanto questo composto era conosciuto in Giappone come medicina popolare per il trattamento delle infezioni intestinali dovute ad un nematode se usato in dosi molto piccole.

Sono stati poi identificati 10 isomeri dell'acido domoico, mostrati in Fig. 4; gli isomeri A, B e C prodotti da *Chondria armata* e gli isomeri D, E, F e il diastereoisomero acido epidomoico in diatomee dei generi *Nitzschia* e *Pseudo-nitzschia*.

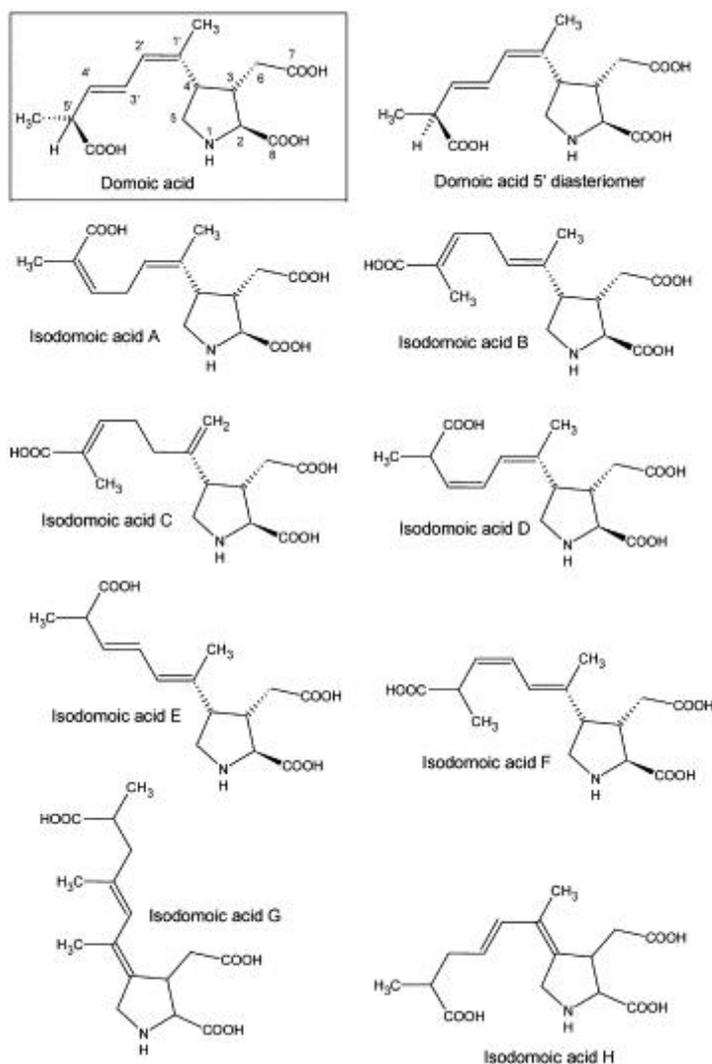


Fig. 4: strutture chimiche dell'acido domoico, i suoi isomeri A-H ed il suo 5' diastereoisomero (Jeffery et al., 2004)

L'acido domoico è un amminoacido con peso molecolare di 311 Da, solubile in acqua, in acidi e alcali diluiti, scarsamente solubile in metanolo ed etanolo, insolubile in etere di petrolio e benzene. Contiene tre gruppi carbossilici ed è un analogo dell'acido L-glutammico e dell'acido kainico (Fig. 5).

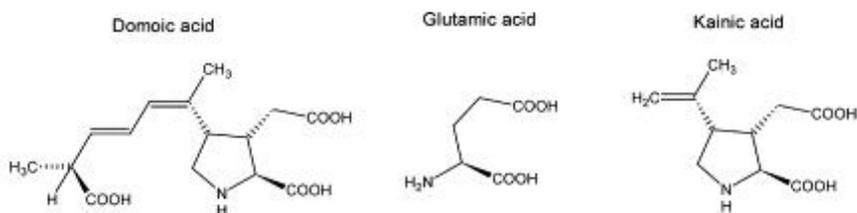


Fig. 5: somiglianze strutturali tra acido domoico, acido glutammico e acido kainico

L'acido kainico è un analogo dell'acido glutammico, uno dei principali neurotrasmettitori del sistema nervoso centrale (SNC), ed è un altro raro amminoacido neurotossico già noto in quanto potente agonista sui recettori dell'acido glutammico.

L'acido glutammico può essere responsabile del 75% della neurotrasmissione eccitatoria, infatti, unitamente all'acido aspartico, la cui struttura è simile all'acido domoico, è ritenuto tra i più importanti neurotrasmettitori naturali.

All'interno del sistema nervoso centrale dei mammiferi sono state identificate tre sottoclassi di recettori glutammici ionotropici che prendono nome dai loro principali agonisti. Queste classi di recettori sono indicati con sigle che derivano da principi attivi esogeni denominati con il termine di eccitossine: si tratta dell'N-metil-D-acido aspartico (NMDA), dell'acido kainico e dell'AMPA (α -ammino-3-idrossi-5-metil-4-isoacido azelopropionico) in passato noto come quisqualato o recettore QUIS.

I recettori ionotropici che rispondono al glutammato e ad altri amminoacidi eccitatori sono accoppiati a canali ionici cationi-specifici che mediano la trasmissione sinaptica e sono stati accettati, in generale, come i principali recettori che mediano l'eccitazione sinaptica nel SNC dei mammiferi (Baden et al., 1998).

L'acido domoico (avendo una struttura molecolare così simile e vicina a quella dei citati recettori) è quindi considerato un amminoacido eccitatorio, una neurotossina e un neurotrasmettitore per il sistema nervoso centrale che funziona in modo analogo a composti strutturalmente simili all'acido kainico (Hampson & Wenthold, 1988).

Dopo l'ingestione l'acido domoico può legarsi ai recettori dell'NMDA nel SNC con un coefficiente di affinità 3 volte maggiore rispetto all'acido kainico e 100 volte rispetto all'acido glutammico (Teitelbaum et al., 1990). A differenza dei neurotrasmettitori però l'acido domoico non è rilasciato dai neuroni, causando una depolarizzazione più lunga e quindi un rilascio maggiore di calcio all'interno dei neuroni. In questo modo l'attività enzimatica calcio-dipendente è mantenuta gonfiando i neuroni eventualmente fino alla morte.

Gli isomeri del DA invece si legano meno fortemente ai recettori del Kainato e risultano quindi meno tossici rispetto al DA; si va dall'acido isodomoico-F che è meno tossico di 2,7 volte fino all'acido isodomoico-B che è anche 95 volte meno potente (Sawant et al., 2007, 2010; Munday et al., 2008).

I recettori dell'NMDA nei mammiferi si trovano piuttosto diffusi a livello della corteccia cerebrale e dell'ippocampo che svolge un ruolo importante nella memoria a breve e a lungo termine e nella navigazione spaziale. L'acido domoico quindi, agendo come neuroeccitatore, può portare al danneggiamento delle cellule neuronali dell'ippocampo causando perdita di memoria da cui il nome Amnesic Shellfish Poisoning.

L'intossicazione è seguita da vari sintomi; di tipo gastrico (nausea, diarrea, gastroenteriti e crampi) e di confusione nelle prime 24 ore, fino a sintomi di tipo neurologico (atassia, mal di testa, difficoltà respiratorie, disorientamento, vertigini, perdita di memoria) e a volte coma nelle 48 ore dopo l'ingestione. I sintomi dipendono dalla quantità di DA assunta e dalla salute della persona colpita. Gli anziani, persone con disfunzioni renali o con una barriera emato-encefalica (BBB) compromessa risultano più sensibili all'intossicazione.

L'acido domoico viene accumulato da vari organismi come alcuni tipi di vongole (*Cerastoderma edule* e *Scrobicularia plana*), granchi (*Cancer magister*), mitili (*Mytilus edulis*), canolicchi (*Siliqua patula*), capesante (*Pecten maximus*) e, in quantità minore, anche in alcune specie di pesci, come acciughe e sgombri. L'accumulo avviene per diretta filtrazione del plancton o tramite l'ingestione degli organismi contaminati, per questo le concentrazioni di DA sono più alte nelle ghiandole digestive rispetto ad altri tessuti.

L'acido domoico è più tossico se consumato insieme ai mitili rispetto al consumo di DA

puro. Questo perché i tessuti dei molluschi contengono una maggior concentrazione di acido glutammico e aspartico.

Qualora sia presente negli alimenti marini, nell'uomo l'acido domoico è assorbito dalla mucosa gastrointestinale ad una velocità abbastanza bassa. Nel circolo sistemico la molecola dell'acido domoico si trova carica ed idrofila, utilizzabile da tutti i tessuti periferici. Quindi, la massima penetrazione è nel sangue ma, in condizioni normali, c'è scarsa penetrazione della barriera emato-encefalica.

Dal punto di vista metabolico sembra che DA sia scarsamente assorbito dall'intestino come dimostrato da esperimenti di iniezione intra-peritoneale e orale di DA nel topo (Iverson et al., 1989); i livelli di comportamento avverso nei roditori sono bassissimi o non osservabili, ed inoltre l'acido domoico veniva quasi interamente eliminato nelle feci dimostrando uno scarso assorbimento.

La quantità assorbita di DA non sembra venire metabolizzata, nei roditori, infatti, circa il 75% del DA iniettato veniva eliminato non modificato nelle urine entro 160 minuti, suggerendo che non subisce alcuna modifica metabolica prima dell'escrezione.

È stato studiato l'effetto della tossina negli animali, sia nel topo sia nelle scimmie. Nel topo sono stati osservati effetti neurologici dell'acido domoico (Tasker et al., 1991), e la morte sopraggiunge in seguito a grattamento delle spalle con le zampe posteriori e convulsioni.

Nelle scimmie (con peso corporeo di 3-5 kg), trattate oralmente con omogeneizzato di epatopaneas di mitili (dosi di 20-29 μ g di tossina) si sono manifestate gastroenteriti caratterizzate da anoressia, vomito, diarrea e alcuni effetti neurologici (tremori, disorientamento, ecc.). I sintomi gastrointestinali iniziavano dalle 3 alle 6 ore, quelli neurologici tra i 25 minuti e le 6 ore e si protraevano fino a 120 ore (Tryphonas et al., 1990b).

1.2.3 Normativa e livelli di tolleranza

In Italia le norme di controllo sanitario per le biotossine marine sono comparse a seguito dei fenomeni di eutrofizzazione, fioriture algali nell'Adriatico e fenomeni di intossicazioni da consumo di mitili provenienti dalle coste atlantiche della Spagna negli anni settanta.

A seguito di tali episodi i primi decreti legge inerenti le biointossicazioni furono inseriti nella legge del 2 maggio n° 192/1977, che imponeva controlli sulle norme igienico-sanitarie per la produzione, commercializzazione e vendita dei molluschi eduli lamellibranchi.

Un secondo decreto legge (D.M. 27 aprile 1978) ha introdotto norme sui requisiti microbiologici, chimici, biologici e fisici delle zone marine il cui uso era destinato alla molluschicoltura. Solo col D.M. 5 ottobre 1978 sono stati introdotti controlli rivolti anche ai molluschi commercializzati, per cui è stata estesa l'attenzione e il controllo del fitoplancton tossico nelle acque e quello delle biotossine nei molluschi bivalvi. Tale decreto, tuttavia, era indirizzato al solo controllo delle biotossine responsabili di PSP, seppure, successivamente, furono prese in considerazione le biotossine DSP, ciguatera e TTX. Col decreto 16 maggio 2002 è infine stata rivolta l'attenzione alla tossina acido domoico (ASP), che fino ad allora non era stata presa in esame.

In seguito, il Ministero della Sanità attraverso il D.M. n° 131 del 1 settembre 1990, emanò i metodi per la determinazione qualitativa e quantitativa dei popolamenti fitoplanctonici nelle acque adibite alla molluschicoltura.

Data l'aumentata richiesta di prodotti ittici che l'Unione Europea (UE) non riesce a soddisfare vedendosi costretta ad importare tali prodotti da paesi extra europei, si è resa necessaria una normativa europea che garantisca la sicurezza nel consumo di questi alimenti, importante risorsa alimentare, e ciò ha spinto l'UE a proporre normative sanitarie a tutela del consumatore, nonché dei limiti di tolleranza e dei metodi di analisi e identificazione delle varie biotossine.

Con la Direttiva del Consiglio del 15 Luglio 1991, la Comunità Europea stabiliva le norme sanitarie applicabili alla produzione e alla commercializzazione dei molluschi bivalvi vivi (91/492/CEE), normativa incorporata nel D.M. del 16 maggio 2002.

Nel 2004 poi fu pubblicata la normativa denominata “*EU Pacchetto d'igiene*” che riunisce, e sostituisce, le norme igieniche vigenti per il settore alimentare precedentemente contenute in numerose direttive individuali, con il preciso scopo di semplificare i concetti sulla sicurezza alimentare dell'intera filiera produttiva. Per quanto riguarda il problema delle biotossine marine la normativa comprende i seguenti regolamenti comunitari:

- ⤴ **REG. CE n° 852/04** – sull’igiene dei prodotti alimentari; contiene norme sulla produzione primaria, i manuali di corretta prassi igienica e l’istituzione dell’Autorità europea per la sicurezza alimentare (EFSA).
- ⤴ **REG. CE n° 853/04** – contenente norme specifiche in materia di igiene per gli alimenti di origine animale. In particolare all’Allegato III Sezione VII Capitolo V stabilisce i tenori massimi per le tossine ASP, PSP e DSP.

Il capitolo V stabilisce che *“gli operatori del settore alimentare devono garantire che i molluschi bivalvi vivi immessi sul mercato per il consumo umano non devono contenere biotossine marine in quantità totali (misurate nel corpo intero o parti consumabili separatamente) superiori ai 20 mg di DA per Kg per quanto concerne l’ASP”*.

I pochi dati sull'esposizione al DA associati a effetti avversi negli esseri umani (9 persone) in focolai ASP indicano che effetti gravi e irreversibili si sono verificati a circa 4 mg/kg di peso corporeo e il livello più basso di effetto avverso osservabile (LOAEL) per sintomi lievi è stato di 0,9 mg/kg di peso corporeo. Anche se la tossicità acuta per via orale non è ben caratterizzata, il gruppo di esperti scientifici sui contaminanti nella catena alimentare (CONTAM) ha ritenuto opportuno basare l'istituzione della dose acuta di riferimento su questo LOAEL.

Il consumo di una porzione di 400 g di carne di mollusco, considerata una grande porzione fra tutti gli stati membri, contenente DA e epi-DA per l'attuale limite UE di 20 mg DA /kg comporterebbe una esposizione alimentare di 8 mg DA (equivalenti a circa 130 mg DA / kg di peso corporeo per un adulto di 60 kg). Questo è circa quattro volte superiore alla dose acuta di riferimento di 30 µg DA / kg di peso corporeo (equivalente a 1,8 mg per porzione per un adulto di 60 kg) ed è considerato un rischio potenziale per la salute. Basato sul consumo corrente c'è una possibilità di circa l'1% del superamento della dose acuta di riferimento di 30 µg DA / kg di peso corporeo quando si consumano molluschi attualmente disponibili sul mercato europeo. Il gruppo CONTAM ha concluso che, per un adulto di 60 kg per evitare di superare la dose acuta di riferimento di 30 µg DA / kg di peso corporeo una porzione g di frutti di mare di 400 g non deve contenere più di 1,8 mg corrispondenti a 4,5 mg di DA per kg di carne di mollusco. Dai dati attualmente disponibili per i campioni in conformità con il limite normativo UE, il 3,5% supera questo valore.

- ▲ **REG. CE n° 854/04** – norme specifiche per l'organizzazione di controlli ufficiali sui prodotti di origine animali destinati al consumo umano, ed all'Allegato II Capitolo II affida all'Autorità per il monitoraggio negli Stati Membri il controllo dei molluschi bivalvi per la presenza di biotossine marine.
- ▲ **REG. CE n° 2074/05** – del 5 Dicembre che all'Annesso III stabilisce i metodi di analisi riconosciuti per le biotossine marine.
- ▲ **REG. CE n° 1244/2007** – del 24 ottobre 2007, che afferma che il contenuto di tossine ASP nella parte edibile dei molluschi debba essere rilevato con il metodo HPLC o qualsiasi altro metodo riconosciuto in campo internazionale, proponendo altresì, come metodo di screening, il metodo 2006.02 ASP ELISA, come pubblicato in Journal of AOAC (Giugno 2006).

La cromatografia liquida ad alte prestazioni con rilevazione ultravioletta (HPLC-UV) è il metodo di riferimento ufficialmente previsto dalla legislazione UE per la determinazione di DA ed epi-DA.

Il test immunoenzimatico (ELISA) è un altro metodo che può essere applicato per determinare la concentrazione di DA e dei suoi isomeri, ed è stato ufficialmente ammesso all'uso nell'UE a fini di screening.

Un'altra tecnica che ha il potenziale di determinare DA ed epi-DA è la cromatografia liquida in tandem con spettrometria di massa (LC-MS), anche se non è stato ancora formalmente validato in studi interlaboratorio, seguendo protocolli riconosciuti a livello internazionale.

Con Decisione del Consiglio n° 383 del 14 giugno 1993, la Comunità Europea designò i Laboratori di Riferimento Nazionali coordinati dal Laboratorio Comunitario la cui sede è a Vigo, in Spagna. Per l'Italia il Laboratorio Nazionale di Riferimento per le biotossine marine è la Fondazione Centro Ricerche Marine (CRM) di Cesenatico.

1.3 Il genere *Pseudo-nitzschia*

1.3.1 Caratteristiche generali

Dal punto di vista tassonomico le specie del genere *Pseudo-nitzschia*, sono alghe unicellulari eucarioti appartenenti alla classe *Bacillariophyceae* incluse nel vasto gruppo monofiletico delle *Heterokontophyta* che comprende anche altre alghe come le giganti kelp, organismi eterotrofi e oomiceti. Tutte le alghe all'interno del gruppo sono caratterizzate dalla presenza di cloroplasti delimitati da quattro membrane i cui tilacoidi contengono clorofilla di tipo *a* e *c* e *fucoxantina* come pigmento accessorio, mentre la sostanza di riserva è la *crisolaminarina*, un β -1,3 glucano depositato in vacuoli fuori dal cloroplasto.

Le *Bacillariophyceae* o diatomee sono una componente importante del fitoplancton ma si trovano in quasi tutti gli ambienti acquatici (oceani, acque dolci o salmastre e anche su suoli umidi) ed occupano varie zone della colonna d'acqua (plancton, benthos e perifiton). Contribuiscono a più del 45% della produzione primaria totale in oceano o al 20-25% a livello globale (Bates e Trainer, 2006).

All'interno della classe *Bacillariophyceae* le diatomee del genere *Pseudo-nitzschia* furono per la prima volta descritte da H. Peragallo nel 1897, prima che Hustedt (1958) le includesse nel diverso genere *Nitzschia* nel 1958. Nel 1994 infine Hasle (1995) ridescrisse *Nitzschia* come un genere specifico detto *Pseudo-nitzschia*, distinto dal precedente grazie alla capacità di formare colonie a catena (Fig. 6).



Fig. 6: a sinistra *Nitzschia palea* (www.protist.i.hosei.ac.jp), a destra *Pseudo-nitzschia* spp

La lunghezza delle catene dipende dalla specie ma in misura maggiore dallo stato di turbolenza e dallo stato nutrizionale delle cellule. Alcune specie mostrano infatti catene più lunghe durante la crescita esponenziale e una carenza di nutrienti, separandosi poi in cellule singole in crescita stazionaria (Fryxell et al., 1990).

Può trovarsi su piccola scala, ad esempio formando agglomerati in strati sottili a profondità medio-basse in aree riparate come fiordi (Rines et al., 2002), oppure su larga scala che copre ampie distese sulle coste. Può formare estese fioriture molto dense e visibili nelle baie, come nel caso di Monterey Bay, o anche più al largo dove le fioriture tendono ad essere meno dense e non visibili ad occhio nudo (Trainer et al., 2012).

Pseudo-nitzschia spp, come tutte le diatomee presenta una parete detta frustulo, composto prevalentemente silice e ricoperto di sostanza organica. Le cellule formano il frustulo con un complesso sistema di cattura di acido silicico dall'ambiente acquatico. In mare il silicio si trova a concentrazioni spesso limitanti di 3-4 μ M mentre nel frustulo si trova a concentrazioni 100 volte maggiori. Questo elemento risulta essere di fatto necessario alla crescita delle diatomee, e in più è stato dimostrato che se sono presenti anche gli altri nutrienti maggiori la crescita delle diatomee è proporzionale alla concentrazione della silice stessa.

La geometria del frustulo nel caso di *Pseudo-nitzschia* è di tipo pennato, caratterizzata cioè da simmetria bilaterale in contrasto con le diatomee centriche che esibiscono una simmetria radiale.

Il frustulo è formato da due parti, una più piccola detta ipoteca che si inserisce perfettamente nella più grande detta epiteca. Le due teche sono formate da una parte appiattita, detta valva, e da una parte laterale, detta cingolo, più o meno allungata grazie all'apposizione di bande commesurali (Boni et al., 2005). Il punto in cui le due valve si uniscono è visibile solo lateralmente e viene detta vista commesurale (Fig. 7b), mentre dalla parte valvare si nota l'intero profilo della valva (Fig. 7a).

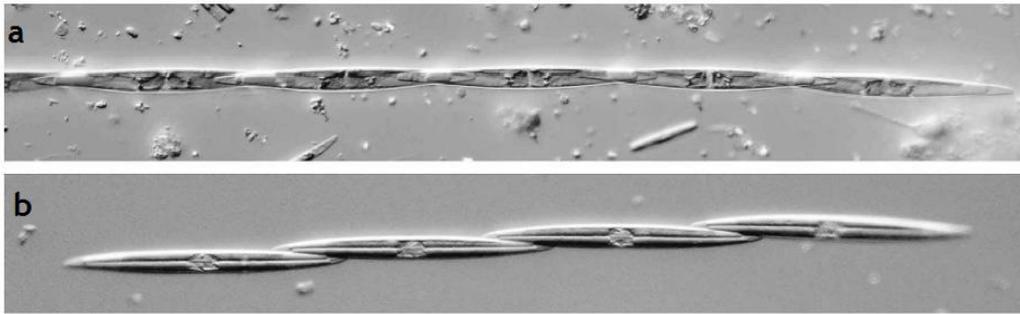


Fig. 7: a) vista valvare di una colonia di *P. australis*. b) vista commessurale di una colonia di *P. multiseries* in coltura

Si delineano quindi un asse apicale, che unisce i due poli del frustulo della diatomea pennata, un asse transapicale, che rappresenta l'asse più corto della parte valvare, e un asse peralvare che rappresenta la distanza tra una valva e l'altra (Fig. 8).

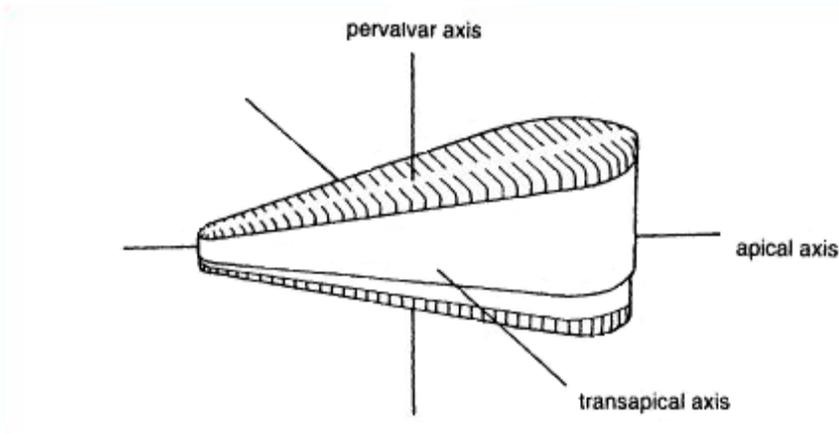


Fig. 8: assi del frustulo di una diatomea (*Identifying marine phytoplankton*, Carmelo R. Tomas, 1997).

Una fenditura detta raphe corre lungo ogni valva rinforzata all'interno della cellula da ponti silicei detti fibulae. In alcune specie il raphe è interrotto da uno spazio centrale, e può essere associato alla capacità di compiere rapidi movimenti di strisciamento mediante l'espulsione di muco. Le diatomee pennate, infatti, non sono flagellate, al contrario di molte altre Heterokontophyta, e prediligono la vita bentonica o acque turbolente.

Esistono delle scanalature, dette *interstriae*, sul lato inferiore di ogni valva fenestrate da pori detti *areolae* che consentono gli scambi della cellula col mezzo esterno che altrimenti sarebbero difficili a causa della rigida e resistente parete.

Fibulae (Fig. 9, freccia tratteggiata), *striae* (Fig. 9, ellisse tratteggiata) e *areolae* (Fig. 9, nel rettangolo) sono caratteristiche morfometriche specie-specifiche ma la loro individuazione al microscopio ottico è spesso difficoltosa, si ricorre quindi a microscopi a scansione o a trasmissione.

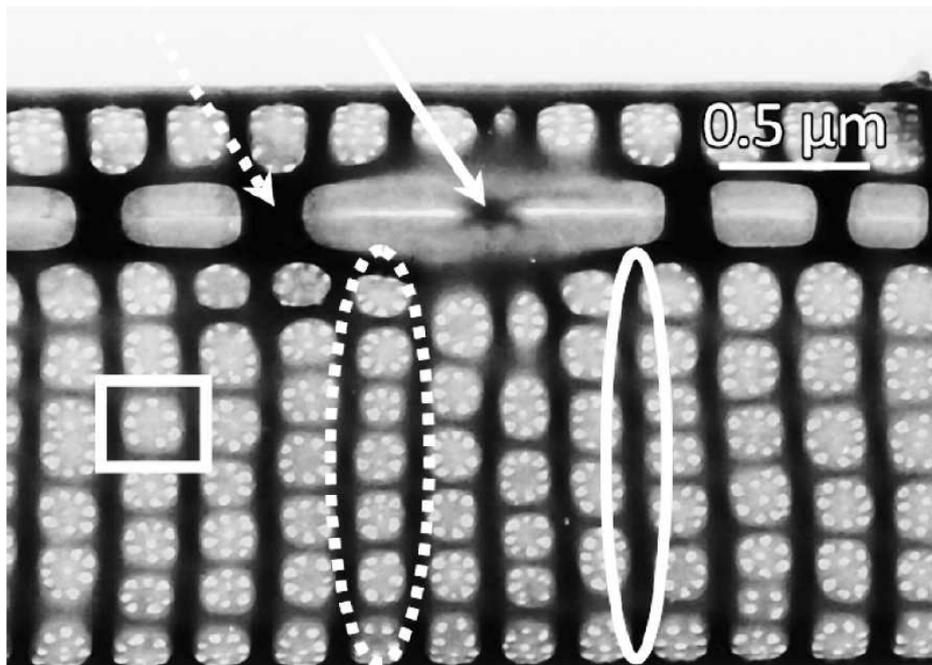


Fig. 9: immagine al microscopio elettronico a scansione di *P. calliantha*, si notano *fibulae*, *striae* e *areolae*

Per quanto riguarda il ciclo vitale le diatomee del genere *Pseudo-nitzschia* sono in grado di riprodursi sia per via asessuata sia per via sessuata. Durante la riproduzione vegetativa la piccola ipoteca parentale diventa l'epiteca della cellula figlia che vi formerà all'interno una nuova ipoteca. In questo modo però la dimensione delle cellule figlie diminuirà ad ogni divisione, fino al raggiungimento di una dimensione minima incompatibile alla vita. Tale dimensione critica è specie-specifica e va dal 20 al 75% della lunghezza massima della cellula (Davidovich and Bates 1998; Hiltz et al. 2000; Amato et al. 2005). Al di sotto di questo range le cellule non riescono più a riprodursi sessualmente ed andranno incontro a morte. La riproduzione sessuata è quindi

necessaria a riportare le dimensioni cellulari iniziali, ed avviene sia tra due cellule singole sia tra una cellula singola e un'altra cellula all'interno di una catena.

Di tutte le 37 specie di *Pseudo-nitzschia* fin'ora individuate, è stata descritta la riproduzione sessuata in colture di laboratorio per sole 14 specie, in quanto gli stadi sessuati sono fragili e difficili da individuare. La maggior parte delle specie è eterotallica, ossia richiede due cellule parentali di sesso opposto (“+” e “-”), ma sono state trovate alcune eccezioni. A parte alcune differenze di tempo necessarie a completare la riproduzione, il processo di accoppiamento è simile in tutte le specie di *Pseudo-nitzschia* studiate. Le due cellule parentali di tipo riproduttore opposto si allineano (gametangiogamia) e appaiono due gameti identici non flagellati all'interno di ognuna. Si parla di cis-anisogamia, poiché i due gameti sono identici ma non si comportano allo stesso modo; ognuno dei due gameti mobili (“+”) si andrà a fondere con uno dei due gameti passivi (“-”). Dalla loro veloce fusione (1-2 minuti) ne risulterà uno zigote sferico per ogni coppia, che rimarrà attaccato al frustulo parentale e si accrescerà nelle così dette auxospore (Fig. 10) ognuna circondata da un proprio perizonium.



Fig. 10 : Auxospore di *P. australis* (Lelong et al., 2012). Si notano i frustuli parentali vuoti in alto a sinistra, più piccoli e deformati a causa delle continue divisioni vegetative dopo un periodo prolungata in coltura

Quando vi sono le condizioni favorevoli, le auxospore germinano in seguito ad una

serie di divisioni e alla fine danno origine a cellule aventi la tipica morfologia del frustulo e che presentano la dimensione massima per quella specie.

Alcuni studi hanno evidenziato un'interessante relazione tra la riproduzione sessuata di *Pseudo-nitzschia* e batteri epibionti. Questi ultimi sarebbero, infatti, necessari all'attivazione del processo sessuale per la specie *P. multiseries* (Thompson, 2000). Esistono inoltre prove del rilascio di una sorta di “feromone” da parte del gamete attivo. Il filtrato di cellule riprodotte sessualmente ha indotto un'alta produzione di gameti in altre cellule anche in assenza di “sessi” opposti (Hachè et al., 2000).

1.3.2 Distribuzione geografica delle fioriture di *Pseudo-nitzschia* spp

Tutti gli episodi di fioritura del genere *Pseudo-nitzschia* registrati hanno lesa, in maniera diretta, la fauna marina, ma mai l'uomo, ad eccezione del primo episodio di intossicazione del 1987 in Canada.

La difficoltà, quando si incontrano delle fioriture algali determinate da *Pseudo-nitzschia* spp, e non solo, sta nell'accertarsi che la specie che ha generato il fenomeno, sia realmente tossica in quel momento.

Le coste degli Stati Uniti sono spesso interessate da casi di fioriture di *Pseudo-nitzschia* spp tanto che si parla di “hot spots”.

Le aree di impatto spaziano dalle coste dello Stato di Washington, con un chiaro “hot spot” nel golfo di Juan de Fuca dove fioriture di *Pseudo-nitzschia* spp si osservano di frequente in associazione con alte concentrazioni di DA (Trainer et al., 2002). In questa zona le cellule tossiche raggiungono le spiagge dopo aver raggiunto una elevata concentrazione e dopo essere sfuggite al vortice oceanografico grazie a periodi di upwelling e raggiungono così le coste più a sud dove rimangono abbastanza a lungo da essere ingerite dai molluschi allevati in zona.

Un'altra zona di “hot spot” si trova al largo della costa dell'Oregon ad Heceta Bank, dove la tossicità da acido domoico sembra aumentare negli ultimi anni come dimostra la prolungata chiusura di allevamenti dal 2003 al 2005 (Tweedle et al., 2010).

In California, presso Monterey Bay, è dal 1920 che sono stati documentati problemi associati a specie di *Pseudo-nitzschia* tossiche che avevano determinato morie di

pellicani e di altra fauna marina; questi episodi differiscono profondamente dal resto non solo perché le specie coinvolte sono differenti, ma anche perché il veicolo del contagio non erano stati mitili ma acciughe. La specie maggiormente presente è sempre stata *P. australis*; i blooms in questa zona comprendevano spesso al loro interno altre specie potenzialmente tossiche: *P. multiseriis*, *P. pseudodelicatissima* e *P. pungens*.

I blooms nella regione della California sono molto più comuni a livello della costa; dal sud al nord, questi episodi sembrano essere associati alle condizioni locali di circolazione che si sviluppano durante periodi in cui si instaura l'upwelling.

Anche le coste del Canada sono interessate da diversi casi di esplosioni algali. L'acido domoico prodotto da *P. multiseriis* fu identificato come la sorgente della tossicità presso Prince Edward Island (PEI, presso Cardigan Bay nell'est del Canada), che causò il primo caso di ASP al mondo nel 1987. Prince Edward Island è caratterizzata da una grande variabilità interannuale e da un generale declino nelle intensità dei blooms; di sicuro, le condizioni meteorologiche sono state indicate come una causa condizionante l'apparire dei blooms.

La baia di Fundy, ad est del Canada, già chiusa per PSP, è stata oggetto di osservazioni in seguito all'evento di ASP dell'87; qui è stata trovata la presenza, nel 1988, di acido domoico in mitili; la specie dominante era *P. pseudodelicatissima*, le cui fioriture si sono sempre verificate in concomitanza al periodo estivo, quando la temperatura dell'acqua è elevata, condizione questa, però, non prediletta dalla specie.

Nel Sud America, *P. australis* fu una delle prime specie di *Pseudo-nitzschia* identificate, ritrovata nel 1939 in Argentina. Da allora è stata trovata non solo nell'emisfero australe ma anche in svariate altre aree costiere e quindi è considerata una specie cosmopolita.

Le altre parti del globo non sono escluse dagli HABs; diverse specie di *Pseudo-nitzschia*, tra le quali *P. fraudulenta*, *P. pungens* e *P. pseudodelicatissima* sono state trovate nelle acque australiane sebbene non vi siano mai stati casi di ASP.

Diatomee del genere *Pseudo-nitzschia* spp sono state ritrovate nelle acque costiere della Nuova Zelanda per almeno quattro decenni, ma il primo caso di tossicità fu nel 1993 (Rhodes et al., 1996), quando si ritrovarono 270 $\mu\text{g DA g}^{-1}$ nella ghiandola digestiva del bivalve *Pecten novaezealandiae*.

Ritrovamenti di specie del genere *Pseudo-nitzschia* spp sono documentati anche in

Vietnam, Korea, Russia e Giappone. In particolare un bloom di *P. calliantha*, *P. multiseriata* e *P. multistriata* fu osservato nelle coste di Peter the Great Bay (Mare del Giappone) con abbondanze che superavano 10^6 cell/L.

Durante l'ultima decade anche i mari d'Europa sono stati interessati da fioriture di *Pseudo-nitzschia* spp, e l'acido domoico ha avuto effetti negativi su molti allevamenti di molluschi, causandone la chiusura in Gran Bretagna, Irlanda, Danimarca, Francia, Portogallo e Spagna.

Nelle coste atlantiche della Spagna negli ultimi anni un indebolimento del fenomeno di upwelling ha causato un aumento dei dinoflagellati rispetto alle diatomee ma un contemporaneo aumento delle specie di *Pseudo-nitzschia*.

Allo stesso modo *P. australis* sembra aver esteso la propria distribuzione verso le nordiche acque europee dell'Atlantico, dove prima non era mai stata ritrovata.

Nonostante in Italia non siano mai stati documentati casi di ASP, questo non ha escluso il possibile rischio sanitario associato al consumo di organismi vettore importati da altri paesi.

Le specie fino ad ora trovate nei mari italiani sono state le seguenti: *P. delicatissima* complex, *P. delicatissima*, *P. galaxiae*, *P. multistriata*, *P. calliantha*, *P. fraudulenta*, *P. subfraudulenta*.

In vari siti dell'arcipelago toscano (mar Tirreno), durante il periodo maggio 1999-luglio 2002, sono stati documentati episodi di aggregati mucilluginosi, di natura bentonica. La maggior parte delle componenti di tali fenomeni è stata identificata in diatomee, tra le quali il genere *Pseudo-nitzschia* spp.

P. delicatissima è stata registrata in alte concentrazioni nel Golfo di Napoli, dove dà luogo a fioriture regolari in primavera e, a volte, in autunno (Orsini et al., 2004). Altre cinque specie sono state rintracciate frequentemente nel Golfo di Napoli: *P. pseudodelicatissima*, *P. multistriata*, *P. fraudulenta*, *P. subfraudulenta* e *P. galaxiae*.

A partire dal 2000, l'acido domoico è entrato anche nel profilo di tossicità delle cozze del Mar Adriatico coltivate sia lungo le coste italiane (lato occidentale) sia quelle croate (lato orientale), anche se i livelli rilevati sono sempre stati al di sotto del limite normativo; contemporaneamente varie fioriture di *Pseudo-nitzschia* spp. sono state osservate in queste acque costiere (Pistocchi et al., 2012).

La presenza di acido domoico in mitili coltivati nell'alto Adriatico è stata riportata nel

golfo di Trieste da Honsell (2006), e tra il 2005-2006, ha dimostrato la presenza di *P. calliantha* come alga tossica, seppure in piccole quantità, già precedentemente riportata da Lundholm (Lundholm et al., 2003). La microalga era presente in autunno a livello superficiale ed aveva una concentrazione massima di 54.420 cell/L. Nel periodo estivo e in concomitanza dell'inizio dell'autunno, è stata rilevata la presenza di *P. delicatissima*, con un massimo di 20,840 cell/L a settembre. In generale, la presenza del genere in questione, durante il periodo di studio, era scarsa; solo il 9% di *Pseudo-nitzschia* spp. era stato trovato rispetto alle altre diatomee presenti nei campioni raccolti.

P. calliantha e *P. delicatissima* sono state le specie identificate a livello del bacino sud-ovest dell'Adriatico. Per entrambe le specie è stata osservata una variabilità inter-annuale con differenti risposte, sembrerebbe, ai fattori ambientali. La prima delle specie citate presentava forte stagionalità, era maggiormente correlata alle condizioni invernali dell'acqua; la seconda aveva comportamento opposto per quanto concerne la sua distribuzione e sembrava indipendente dai fattori ambientali (Caroppo et al., 2005). Una caratterizzazione delle specie di *Pseudo-nitzschia* presenti nelle coste nord-occidentali del bacino dell'Alto Adriatico è stata effettuata da Penna et al. (2012), grazie a campionamenti lungo tutta la colonna d'acqua e durati un anno, al largo di Pesaro. La comunità fitoplanctonica, nell'area campionata, era rappresentata principalmente da diatomee (più del 60%), e il 20% dell'abbondanza totale di diatomee era composta da *Pseudo-nitzschia*, la cui presenza è stata rilevata durante tutto l'anno, con un massimo di abbondanza, di più di 10^6 cell/L, in Aprile 2010. Dall'analisi filogenetica sono stati identificati i ceppi appartenenti alle specie *P. delicatissima*, *P. calliantha*, *P. pungens* e *P. manni*. La crescita in coltura di tali ceppi, e la conseguente analisi tossicologica, mostrava che solo il ceppo di *P. delicatissima* aveva prodotto DA e solo in una coltura questo raggiungeva valori quantificabili di circa 0,063 fg/cell (cioè 0,00006 pg/cell).

1.3.3 Fattori che influenzano la tossicità

In seguito alla scoperta della pericolosità dell'acido domoico per la salute umana e dell'intero ecosistema marino il numero di specie di *Pseudo-nitzschia* identificate è salito da 15 nel 1980 a circa 37 a partire dal 2010, e fra di esse è cresciuto a 12 anche il numero di specie confermate essere in grado di produrre acido domoico (Trainer et al., 2010; Lundholm, 2011).

Pseudo-nitzschia è stata rilevata lungo gran parte delle coste in tutto il mondo e mentre agli inizi gli impatti della sua tossina erano riportati, prevalentemente, e in misura più dannosa, solo in zone di upwelling, le sue manifestazioni anche se non a livelli mortali per l'uomo sono sempre più rilevate anche in zone di oceano aperto, con scarsa torbidità e concentrazione di clorofilla, oltre a sistemi di transizione come lagune, fiordi, estuari e baie.

Gli stimoli ambientali che causano produzione di tossine da parte di *Pseudo-nitzschia* sono quindi complesse, come dimostra lo schema in Fig.11, e possono essere uniche in relazione all'area di mare in cui si sviluppano.

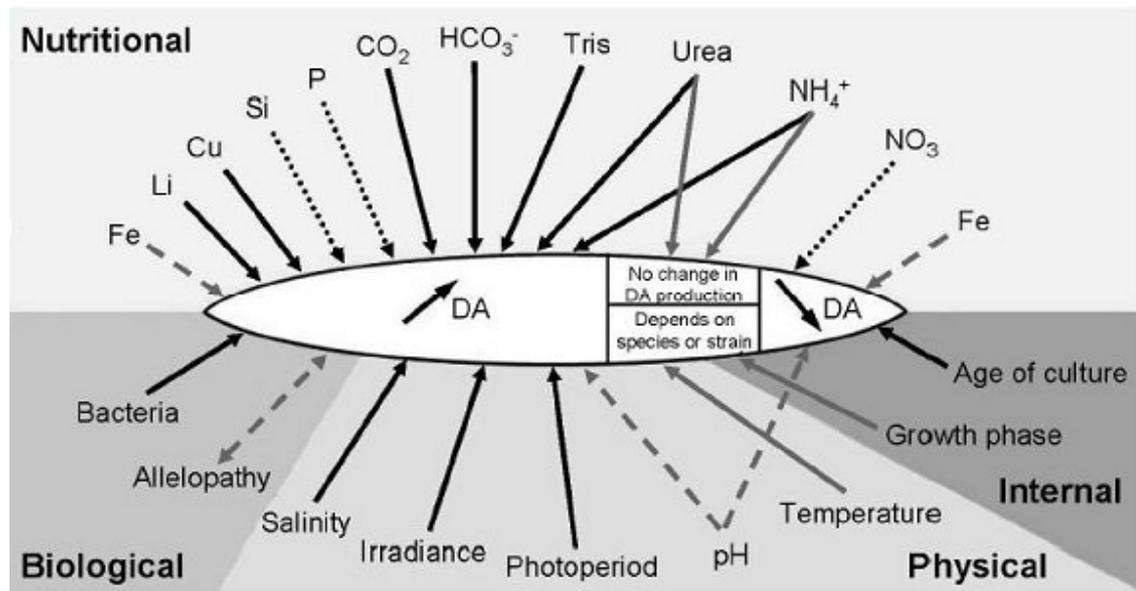


Fig. 11: sintesi dei fattori studiati e il loro impatto sulla produzione di DA. Le frecce nere indicano influenza positiva, le frecce tratteggiate indicano un'influenza negativa, le frecce grigie indicano un effetto specie dipendente e le frecce grigie tratteggiate indicano risultati contraddittori. (Lelong et al., 2012)

1.3.3.1 Tossicità e fase di crescita

I primi studi sui parametri che influenzano la tossicità di *Pseudo-nitzschia* descrivono una relazione tra il tasso di crescita e la produzione di acido domoico, e sono stati esaminati con colture di laboratorio della specie *P. multiseries* e poi spesso estrapolate per altre specie (revisionati da Bates, 1998). Questi dimostrano che la produzione di DA è spesso minima, o non rilevabile, durante la fase di crescita esponenziale di colture batch, per aumentare durante la fase stazionaria quando la divisione cellulare rallenta, forse a causa dell'esaurimento dei nutrienti. Questi dati sono stati confermati anche per *P. seriata* (Fehling et al., 2004), e per altre specie come *P. cuspidata* (Trainer et al., 2009b), *P. fraudolenta* e *P. calliantha* (Thessen et al., 2009) dove DA a bassa concentrazione era però presente anche durante la fase esponenziale. Al contrario per *P. sp. cf. pseudodelicatissima*, proveniente dal Golfo del Messico, l'acido domoico veniva prodotto decisamente all'inizio della crescita esponenziale (Pan et al., 2001). Quest'ultimo caso è forse spiegabile dalla recente scoperta che la specie *P. sp. cf. pseudodelicatissima* è in realtà composta da almeno sette specie, alcune delle quali potrebbero comportarsi diversamente.

Non sono molti gli studi condotti in colture batch per esaminare il momento di maggior produzione di DA, e i risultati esistenti sono, come visto, spesso contraddittori. E' ancora necessario chiarire se le variazioni nella produzione di DA durante il ciclo di crescita siano dovute a qualche alterazione intrinseca della fisiologia cellulare durante la crescita, o ad uno specifico fattore esterno.

Considerando un orizzonte temporale più ampio, è stato visto che la vitalità e la tossicità di *P. multiseries* (Bates, 1998) declinavano dopo un periodo di alcuni anni in coltura ed in particolare la diminuzione della tossicità era esponenziale e associata ad una riduzione della lunghezza delle cellule, dimostrando una correlazione positiva lineare tra l'acido domoico intracellulare e il volume della cellula (Mafra et al., 2009a). Potrebbe inoltre esistere una relazione tra la tossicità cellulare di *Pseudo-nitzschia* e l'abilità di iniziare la riproduzione sessuata. In alcuni casi le grandi cellule appena riprodotte sessualmente, avrebbero prodotto più acido domoico delle più piccole cellule parentali (Bates et al., 1999).

Il declino nell'abilità di produrre acido domoico potrebbe altrimenti essere connesso a cambiamenti nella comunità batterica che cresce con *Pseudo-nitzschia* (Bates 1998) ed

in particolare alla presenza di batteri DA-degradanti in coltura, ma si tratta di ipotesi non ancora dimostrate.

1.3.3.2 Tossicità e parametri fisici

Specie diverse in popolazioni naturali spesso dimostrano diverse correlazioni con parametri ambientali, suggerendo una successione stagionale delle specie o una specificità regionale. E' stata constatata infatti una grande variabilità nella crescita e nella tossicità tra diverse specie di *Pseudo-nitzschia* ma anche tra ceppi appartenenti alla stessa specie ed isolati nella stessa area geografica (Kudela et al., 2004a,b)

Esiste solo uno studio (Doucette et al., 2008) di esame degli effetti della salinità sulla produzione di acido domoico condotto con *P.multiseries*, in cui sia la divisione cellulare che la produzione di tossina risulta massima ad alte salinità (20-40 psu) e si abbassa di tre/quattro volte a 10 psu. Gli autori suggeriscono che quando è stata acclimatata a basse salinità, *P.multiseries* abbia deviato l'energia prodotta dalla fotosintesi dalla produzione di DA al mantenimento del bilancio osmotico, ma non ci sono ancora prove certe del ruolo dell'acido domoico come osmolita.

L'energia metabolica derivante dalla fotosintesi è essenziale per la produzione di acido domoico (Bates et al., 1991; Pan et al., 1998) e perciò una minima irradianza è necessaria a soddisfare questa richiesta di energia. L'irradianza quindi è un altro parametro che può influenzare la tossicità, e come descritto da Bates (1998) per *P. multiseries* il minimo di irradianza richiesta è $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ di fotoni. Colture di *P. australis* hanno prodotto da 24 a 130 volte più DA quando acclimatate a 115 rispetto a $12 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ di fotoni (Cusack et al., 2002). La stessa specie isolata nella Baja California (Messico) presentava lo stesso trend nello studio di Santiago-Morales et al. (2011). L'energia per la crescita cellulare compete con quella richiesta per la produzione di tossina, quest'ultima si attiva, infatti, quando la crescita si ferma, e potrebbe essere un modo per eliminare l'eccesso di energia fotosintetica quando le cellule non sono più in grado di crescere al meglio.

L'acido domoico viene prodotto sia in condizioni di irradianza continua sia sottoponendo le diatomee a diversi fotoperiodi. Fehling et al., (2005) hanno determinato come colture sottoposte ad un lungo fotoperiodo (18:6 luce:buio) oltre ad un tasso di divisioni cellulari maggiore producessero più acido domoico rispetto alle

colture cresciute con un fotoperiodo più corto (9:15 luce:buio) nonostante queste ultime ne rilasciassero di più nel mezzo di coltura.

La natura cosmopolita di molte *Pseudo-nitzschia* spp può essere spiegata in parte dalla loro ampia tolleranza alle diverse temperature, è, infatti, trovata in natura da -1,5 ad almeno 30°C. Le risposte di crescita, da esperimenti di laboratorio individuali, supportano gli intervalli di temperatura che si trovano nelle acque da cui le varie specie di *Pseudo-nitzschia* sono state isolate. Per quanto riguarda la tossicità invece non esistono molti studi che esaminino la relazione tra temperatura e produzione di acido domoico. Lundholm et al. (2004) hanno osservato una maggior concentrazione di DA nelle colture di *P. seriata* acclimatate a 4°C (1 - 33,6 pg/cell) rispetto a quelle cresciute a 15°C (0,31-1,6 pg/cell). Questo trend è stato anche osservato in *P. multistriata* (Amato et al., 2010) che presentava una maggior concentrazione di acido domoico cellulare (cDA) a 18°C (3 fg/cell) rispetto a quelle a 27°C (1 fg/cell). Al contrario la relazione tra temperatura e contenuto di DA era opposta in *P. multiseriata* (Lewis et al., 1993). In quest'ultima, infatti, sono stati trovati 0,16 pg/cell a 5°C e ben cento volte di più a 25°C (15 pg/cell).

Lo studio di Santiago-Morales et al. (2011), infine, ha rilevato una correlazione significativa tra concentrazione totale di DA (disciolto e cellulare) con la temperatura per solo uno dei due ceppi testati di *P. australis*; in questo caso l'acido domoico era maggiore all'aumentare della temperatura ma solo se veniva applicato un basso rapporto Si:NO₃, suggerendo una probabile sinergia tra l'effetto della temperatura e la limitazione da silice non ancora dimostrata.

In generale l'effetto della temperatura sulla produzione di questa tossina non è ancora del tutto chiaro o probabilmente è specie-specifico.

1.3.3.3 Tossicità e macronutrienti

Per crescere il fitoplancton necessita in misura maggiore di macronutrienti, tra i quali i principali sono carbonio, ossigeno, azoto, fosforo e anche silicio nel caso delle diatomee. Questi elementi sono i più abbondanti nelle cellule e sono necessari poiché formano le varie componenti strutturali delle cellule o servono all'osmoregolazione.

Inoltre esistono i così detti micronutrienti (rame, manganese, ferro, zinco ecc.) necessari al fitoplancton in quantità minime in quanto catalizzatori di reazioni

enzimatiche.

Studi condotti in campo hanno suggerito che una limitazione da macronutrienti può essere responsabile dell'attivazione della produzione di acido domoico da parte di *Pseudo-nitzschia* spp. Quando le cellule sono limitate da nutrienti, infatti, non sono più in grado di dividersi ma riescono ancora a fare fotosintesi e acquisire così energia. Questa energia può essere usata per la produzione di metaboliti secondari, come l'acido domoico.

Durante il bloom del Maggio 2003 di *P. australis* nelle acque costiere della California (Anderson et al., 2006) fu riportata una significativa correlazione negativa tra l'abbondanza cellulare e l'acido domoico particolato, e la concentrazione nell'acqua di acido silicico, nitrato e ortofosfato, supportando l'idea che la limitazione da macronutrienti e il conseguente rallentamento del tasso di divisioni sia il fattore responsabile dell'aumento di produzione di tossina.

Nel settembre 2007 è stato riportato un bloom di *P. australis* nella Baia di Veys (Normandia, Francia) con un'abbondanza cellulare pari a 38×10^3 cell/L ed una concentrazione di DA pari 7,1 ng/L (Klein et al., 2010). Nonostante la concentrazione di tossina fosse decisamente al di sotto dei limiti di legge la sua produzione è stata imputata ad un rapido cambiamento nei rapporti dei nutrienti in seguito a forti piogge. L'arricchimento delle acque soprattutto in fosfati ha causato una limitazione da silice e nitrati promuovendo la produzione di tossina.

Al contrario nella laguna costiera di Bizerte (Tunisia) il ritrovamento di concentrazioni di DA, tra 0,5-2,0µg/L, nell'Ottobre 2006 era dovuta principalmente alla specie *P. brasiliiana* e si presentò in acque ricche in nitrati e silicati (Sahraoui et al., 2012). In questo caso l'eutrofizzazione costiera si dimostra un fattore associato alla produzione di DA.

I primi studi condotti in coltura mostrarono allo stesso modo come la produzione di DA da parte di svariate specie di *Pseudo-nitzschia* fosse innescata da limitazione di silicati e fosfati.

Hangström et al. (2011) hanno confrontato la fisiologia cellulare e la produzione di tossina da parte di due ceppi di *P. multiseriis* provenienti da due latitudini diverse. In colture continue i due ceppi sono stati fatti crescere in condizione di carenza d'azoto e di fosforo. Le due carenze hanno influenzato sia il contenuto di azoto e fosforo

cellulare sia la produzione di tossina. Il fosforo intracellulare era 2-4 volte maggiore nelle colture cresciute in carenza di azoto. La concentrazione e la produzione di DA cellulare al giorno era significativamente maggiore in carenza di fosforo.

L'acido domoico essendo un amminoacido necessita di azoto per essere prodotto, di conseguenza la crescita in condizioni di limitazione da azoto non è favorevole alla sua produzione.

Vari studi si sono concentrati sull'effetto della concentrazione di azoto sulla produzione di tossina da parte di *Pseudo-nitzschia* spp, dimostrando, infatti, che una carenza di tale elemento risultava in una diminuzione di resa cellulare e non si rilevava alcuna produzione di acido domoico. Ci sono prove consistenti che substrati azotati alimentando la crescita potrebbero influenzare il tasso di crescita esponenziale e quello di produzione di DA di varie specie di *Pseudo-nitzschia*.

I primi studi, condotti da Bates et al. (1993), dimostrarono per la prima volta diversi tipi di crescita e di risposta della tossina ai vari substrati azotati. Alte concentrazioni di ammonio (NH_4^+), ad esempio, promuovevano una maggiore produzione di tossina rispetto alle stesse concentrazioni di nitrati (NO_3^-) durante la crescita stazionaria per due ceppi di *P. multiseriis*, mentre a concentrazioni più basse il rendimento cellulare e la produzione di DA erano equivalenti per entrambi i substrati azotati.

Studi più recenti hanno dimostrato differenti tassi di crescita esponenziale in funzione di diversi substrati azotati per *P. multiseriis* ed inoltre hanno segnalato come la tossicità durante la crescita esponenziale fosse inversamente relazionata al tasso di crescita; in altre parole i substrati azotati supportando una crescita più lenta produrrebbero cellule più tossiche. La variabilità intraspecifica riguardo all'uso di substrati azotati è stata solo recentemente testata per *P. multiseriis*, *P. fraudolenta* e *P. calliantha* (Thessen et al., 2009). L'unico trend osservato è stato un tasso di crescita maggiore in presenza di ammonio e uno più basso con urea, mentre il contenuto di DA non può essere predetto in funzione dei diversi substrati azotati a causa dell'alta variabilità inter- e intra-specifica.

1.3.4 *Pseudo-nitzschia multistriata*

La specie trattata in questa tesi è *P. multistriata*, per la prima volta descritta da Takano (1993) nelle acque giapponesi, ed in seguito identificata anche in Nuova Zelanda, Australia, Brasile, Uruguay, Francia atlantica, Grecia, Golfo del Messico, Golfo di Napoli, Korea, Portogallo e Spagna.

Dalla parte valvare le cellule di *P. multistriata* si presentano lineari nella parte centrale con margini che si assottigliano verso le estremità arrotondate. Dalla parte commessurale invece le estremità delle valve sono sigmoidi, dando alla colonia una caratteristica forma ondulata (Fig. 12).



Fig. 12: immagine al microscopio ottico in vista commessurale di una colonia di *P. multistriata*

P. multistriata era stata osservata in campioni di acqua marina raccolti dalla North Island e nelle acque a nord della South Island in Nuova Zelanda (Rhodes et al., 2000). Il bloom si verificò nel Dicembre 1997 (estate australe) con abbondanze cellulari maggiori di 10^6 cellule per litro, e blooms minori in estate e inverno tra il 1998 e il 1999. Dall'esame di cellule isolate e di campioni raccolti la specie non risultò tossica.

Vi sono altre segnalazioni di bloom di *P. multistriata*; nella parte nord-ovest del Mare del Giappone si presentò una fioritura di tre specie di *Pseudo-nitzschia* tra cui anche *P. multistriata* tra l'estate e l'autunno con abbondanze che superavano le 10^6 cellule per

litro (Orlova et al., 2008). In coltura però la suddetta specie non presentò tossicità al di sopra del limite di quantificazione (<2 ng/mL).

Nel Febbraio 2009 *P. multistriata* fu trovata per la prima volta nelle acque dell'Uruguay con una densità di 2×10^6 di cellule per litro (Mendez et al., 2012). Dal momento che non ci sono altre segnalazioni di questa specie a latitudini maggiori si pensa che l'Uruguay rappresenti il limite a sud della sua distribuzione biogeografica dell'Atlantico sud-occidentale.

Durante il periodo Luglio 2007 – Luglio 2008, la presenza di specie di *Pseudo-nitzschia* e la produzione di DA fu studiata in funzione dei parametri ambientali nella Baia di Veys (Normandia, Francia). *P. multistriata* comparve in Ottobre e in Novembre e la sua abbondanza fu correlata a basse temperature, alte concentrazioni di nitrati ma basse di ammoniaca (Klein et al., 2010).

Uno studio dello stesso tipo (Sahraoui et al., 2012) mostrò invece come *P. multistriata* nella Bizeerte Lagoon in Tunisia fosse negativamente correlata alla salinità e alla concentrazione di nitrati e positivamente correlata alla temperatura e alla generale torbidità dell'acqua.

Il primo caso di tossicità dovuto a *P. multistriata* è stato registrato nel Golfo di Napoli (Mar Mediterraneo) grazie ad un piano di monitoraggio del fitoplancton a lungo termine che ha luogo dal 1984. In occasione di tale ritrovamento diverse colture di *P. multistriata* sono state esaminate al microscopio elettronico a scansione per una conferma delle caratteristiche ultrastrutturali (Sarno & Dahlmann, 2000). Le cellule presentavano da 37 a 46 intrestriae in 10 mm, e da 23 a 38 fibulae. Due file di areolae circolari erano presenti in ogni interstria e in 1 mm vi erano circa 12 areolae, in linea con quanto descritto da Takano (1995).

Le colture furono poi raccolte nella tarda fase esponenziale e l'analisi del contenuto di acido domoico cellulare rivelò concentrazioni molto diverse tra i vari ceppi di *P. multistriata* ritrovati che andavano dal non individuabile a 0,645 pg/cell. Questi valori erano più bassi di quelli riportati in letteratura (Bates, 1998), ed, insieme alla bassa concentrazione raggiunta dalle cellule può spiegare il fatto che nessun evento di ASP si è verificato nel Golfo di Napoli.

P. multistriata viene ritrovata spesso nel Golfo di Napoli dalla tarda estate fino

all'autunno con abbondanze cellulari che non superano in genere le 10^5 cell/L (Zingone et al., 2006). Amato et al., (2010) analizzarono la presenza di acido domoico intracellulare (IcDA) in 26 colture di *P. multistriata*, tra queste 14 risultarono tossiche, con concentrazioni di DA per cellula che andavano da 0,1 a 285,5 fg/cell, confermando quindi un'alta variabilità intraspecifica. I valori di IcDA erano comparabili a quelli precedentemente osservati nella stessa specie nel Golfo di Napoli, ma più alti di quelli riscontrati in *P. galaxiae* probabilmente a causa della piccola taglia di quest'ultima rispetto a *P. multistriata*.

Fu, infatti, dimostrata anche la relazione tra IcDA e dimensione cellulare; il contenuto di tossina diminuì gradualmente da circa 3,5 fg/cell in cellule di circa 65 μm di lunghezza, a meno di 0,5 fg/cell in cellule lunghe appena 9 μm , dopo 15 mesi in colture semicontinue.

Per capire quali fossero le condizioni che stimolassero le cellule a produrre acido domoico, Amato et al. (2010) misurarono il contenuto di IcDA in tre fasi di crescita e in quattro diverse condizioni. L'acido domoico era presente a partire dalla fase esponenziale ed aumentava fino ad un massimo quando la crescita rallentava, come dimostrato per svariate altre specie di *Pseudo-nitzschia*. Applicando alle colture una bassa intensità luminosa ($30 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ di fotoni), una carenza di silice (solo 40 μM) e di fosforo (3 μM) le cellule mostrarono una maggior quantità di DA cellulare in fase stazionaria, con valori che andavano da 5 fg/cell fino a 25 fg/cell nella condizione di carenza di silice, rispetto a circa 3 fg/cell risultanti nelle condizioni standard di crescita. Al contrario una temperatura di 27°C sembrò inibire la produzione di IcDA (1 fg/cell) in tutte le fasi di crescita.

In generale quindi anche per *P. multistriata* si può concludere che la produzione di acido domoico raggiunge livelli più alti quando le concentrazioni di fosforo e silice e l'intensità luminosa sono basse. Condizioni ambientali in cui fosforo e silice scarseggiano ma l'azoto è ancora disponibile possono verificarsi in occasione di blooms fitoplanctonici in acque costiere eutrofizzate, acque che potrebbero quindi diventare "hot spots" per eventi di ASP.

Seguendo gli occasionali ritrovamenti di DA nei molluschi del Mar Adriatico, ha avuto inizio, nel 2006, uno screening di tossicità su diverse specie di *Pseudo-nitzschia*,

identificate sulla base delle caratteristiche morfometriche come *P. fraudolenta*, *P. pseudodelicatissima* e *P. multistriata*. In seguito furono analizzate anche le sequenze dell'rDNA nucleare dell'unità ribosomiale maggiore (LSU) ed in particolare il gene 28S conservato a livello interspecifico. Da quest'analisi risultò che i ceppi di *P. multistriata* provenienti da diverse aree geografiche, incluso l'Adriatico, si raggruppavano con i ceppi di *P. fraudolenta*, in linea con quanto dedotto su base morfometrica. L'analisi della tossicità per il ceppo di *P. multistriata* dell'Adriatico è stata eseguita su cellule raccolte in tarda fase stazionaria dopo averle fatte crescere a diverse temperature (16, 20 e 25°C) e in diverse condizioni di nutrienti (standard e carenza di fosforo). Mentre la crescita risultò del 40% più bassa a 16°C, la tossicità era significativamente più alta rispetto alle più alte temperature, con concentrazioni di DA che andavano da 0,003 a 0,010 pg/cell, comparabili nel complesso con quelle ottenute nel Golfo di Napoli (Pistocchi et al., 2012).

In aggiunta in mare nel caldo periodo Luglio – Agosto 2007 si riscontrò una fioritura di *P. multistriata*, che raggiunse un'alta concentrazione cellulare (circa 10^5 cell/L) e successivamente vennero individuate tracce di DA nei molluschi nel Novembre dello stesso anno. Questa è la prima segnalazione di produzione di acido domoico da parte di colture di *Pseudo-nitzschia* isolate nel Mar Adriatico, che può essere correlata alla presenza di tossina in allevamenti di molluschi.

2 SCOPO DELLA TESI

Come si evidenzia dall'introduzione le specie algali appartenenti al genere *Pseudo-nitzschia* spp, sono note sin dal 1987 come potenziali produttrici di acido domoico, agente responsabile dell'intossicazione ASP.

In Italia il decreto legge del 5 Ottobre 1978 ha imposto severi controlli al fine di scongiurare l'insorgere ed il proliferarsi delle biointossicazioni derivanti da Harmful Algae. Di conseguenza, vengono condotti dal Servizio Sanitario Regionale, monitoraggi sia sugli allevamenti di mitili che nell'acqua di mare rispettivamente per il controllo delle biotossine e dei popolamenti fitoplanctonici potenzialmente tossici.

Il Centro di Ricerche Marine di Cesenatico (Laboratorio di Riferimento Nazionale per le biotossine marine) ha il compito di effettuare tali analisi per le province di Ravenna, Forlì-Cesena e Rimini.

In Italia, ad oggi, livelli di acido domoico in quantità superiori ai limiti consentiti per legge (<20µg per grammo di peso fresco di parte edibile di mollusco) non sono mai stati registrati; tuttavia, le analisi svolte nel corso del monitoraggio, e che per legge devono essere eseguite con uno strumento sensibile quale l'HPLC e/o LC-MS, hanno evidenziato a volte un leggero innalzarsi dei livelli di questa tossina. Questo fatto ha quindi rivelato che in realtà nel Mare Adriatico sono presenti specie che sintetizzano acido domoico anche se, al momento, risultano essere in scarsa quantità o scarsamente produttrici poiché raramente i molluschi sono risultati contaminati.

In particolare nell'anno 2012 il monitoraggio delle aree marine prospicienti la Regione Emilia-Romagna ha rivelato la presenza di *Pseudo-nitzschia multistriata* a partire dal mese di Luglio al largo di Ravenna. Dai dati di monitoraggio per il contenuto di acido domoico nei mitili (stazioni Diga Nord e Diga Sud, Ravenna, Luglio 2012) si è potuto constatare che la concentrazione era rilevabile, ma comunque al sotto del limite di quantificazione (<LOQ).

In seguito a tale ritrovamento si è potuto procedere all'isolamento della specie algale per condurre esperimenti di laboratorio.

Le finalità di questa tesi sono state quelle di caratterizzare meglio la crescita e la

produzione di acido domoico nella specie *P. multistriata*, isolata nell'Alto Adriatico, e fatta crescere in colture batch, al fine di migliorare la comprensione ed eventualmente la previsione di fenomeni di intossicazione da ASP. Si può supporre infatti che, come avviene per altre specie, alcune condizioni ambientali potrebbero stimolare una produzione di acido domoico maggiore di quella osservata fino ad ora.

In particolare lo studio si è focalizzato sull'effetto che, temperatura e concentrazione di nutrienti hanno sulla crescita e sulla produzione di tossina da parte di *P. multistriata*, come già precedentemente indagato da Pistocchi et al. (2012) in modo altamente preliminare. In aggiunta come aspetto innovativo sono stati valutati parametri fisiologici quali consumo di nutrienti ed efficienza fotosintetica.

L'attività di ricerca si è basata su due esperimenti principali:

- Un esperimento preliminare, eseguito a 16°C esponendo le colture ad una leggera carenza di fosforo, come messa a punto delle condizioni di stress utili per osservare una risposta in termini di tossicità da parte di *P. multistriata*; questo si è reso necessario in quanto ogni specie fitoplanctonica risponde diversamente sia alle concentrazioni assolute di nutrienti che a variazioni del rapporto N/P.
- Un secondo esperimento in cui sono state applicate alle colture due diverse condizioni di temperatura (20 e 16°C) e una maggiore condizione di limitazione di fosforo.

3 MATERIALI E METODI

3.1 Isolamento della specie

Le colture di *P. multistriata* sono state allestite dopo l'isolamento di singole cellule o catene di cellule presenti nei campioni di acqua di mare provenienti da Ravenna (Mar Adriatico) e prelevati il 19 Luglio 2012.

I campioni naturali di fitoplancton sono stati raccolti al largo di Ravenna dalla Struttura Oceanografica Daphne dell'ARPA Emilia-Romagna, che si avvale di un battello oceanografico, Daphne II, con cui periodicamente viene effettuato il controllo ambientale dell'ecosistema marino costiero, per il monitoraggio e per la gestione integrata delle zone costiere (GIZC). Il prelievo del fitoplancton viene effettuato tramite bottiglie da 250 mL, situate alla base di un retino da fitoplancton, ossia un retino di nylon a forma conica con maglie da 20 μm seguendo dei transetti lungo la costa. Al momento del campionamento l'acqua contenente il fitoplancton viene trasferita direttamente dalla bottiglia di campionamento in bottiglie di plastica scura, per evitare che la luce danneggi le cellule. Tali bottiglie vengono conservate al fresco e al buio in contenitori termici fino all'arrivo in laboratorio.

Una goccia di campione, contenente la specie da isolare, viene posta al centro di una piastra Petri, attorno vengono poste altre gocce di acqua di mare sterile che serviranno per il "lavaggio" delle cellule da organismi indesiderati. Per prelevare la specie di interesse si usa una pipetta Pasteur, sterile e con filtro, la cui punta viene tirata in seguito a riscaldamento su fiamma.

La specie desiderata viene aspirata con la micropipetta e posta in una goccia d'acqua. L'operazione si ripete più volte fino a quando l'osservazione, a microscopio ottico rovesciato, dell'organismo evidenzia che non vi siano più cellule indesiderate. Le cellule isolate vengono quindi trasferite nelle celle di piastre "multiwell" precedentemente riempite con 1mL di terreno di coltura. Nei giorni seguenti viene controllata la divisione delle cellule e, raggiunta una certa densità, si procede all'inoculo in contenitori a volume maggiore per allestire colture algali monospecifiche.

3.2 Allestimento colture batch

Il terreno di coltura è stato preparato partendo da acqua di mare oligotrofica prelevata in superficie 10 miglia marine al largo di Cesenatico, anch'essa fornita dalla Struttura Oceanografica Daphne. L'acqua in questione viene filtrata con un sistema di filtrazione a vuoto, utilizzando filtri Millipore di cellulosa con maglie di 0.45µm, e portata alla salinità desiderata. La salinità in mare varia in base alla stagione (dal 34‰ fino ad un massimo del 40‰), per i nostri esperimenti si è scelta una salinità media del 35‰, applicata attuando una correzione in base alla seguente formula

$$X = \text{salinità finale (35‰)} * \text{volume finale (2000mL)} / \text{salinità iniziale}$$

Il valore ottenuto rappresenta l'acqua di mare da portare al volume di 2000 mL con acqua distillata. La misura della salinità iniziale e di quella finale è stata effettuata per mezzo di un salinometro a rifrazione (Atago S/10).

I bottiglioni di pirex contenenti l'acqua vengono poi sterilizzati a vapore in autoclave che, operando alla pressione di un'atmosfera, permette di raggiungere 120°C, per eliminare spore, funghi, batteri e virus.

Infine, sotto cappa sterile a flusso laminare, sono stati aggiunti macronutrienti (nitrati e fosfati), micronutrienti (metalli in traccia), un tampone per mantenere stabile il pH nella coltura e la Silice, una soluzione di vitamine e Selenio, in concentrazioni diverse a seconda del tipo di condizioni di crescita scelte.

Il terreno di coltura di base, utilizzato per la crescita dei ceppi algali, è il Medium f/2. Questo tipo di terreno è ampiamente utilizzato per fare crescere specie algali marine costiere, specialmente le diatomee, ed è stato scelto per il primo esperimento di crescita in coltura di *P. multistriata*. Le concentrazioni finali dei componenti principali di questo tipo di terreno sono le seguenti (Tabelle 13-15).

Macronutrienti	Concentrazioni [M]
NaNO ₃	8.82 x 10 ⁻⁴
NaH ₂ PO ₄ * H ₂ O	3.62 x 10 ⁻⁵
Na ₂ SiO ₃ * 9H ₂ O	1.06 x 10 ⁻⁴

Tab. 13: concentrazioni finali dei macronutrienti in terreno f/2

Metalli in traccia in soluzione madre	Concentrazioni [M]
FeCl ₃ * 6H ₂ O	1.17 x 10 ⁻⁵
Na ₂ EDTA * 2H ₂ O	1.17 x 10 ⁻⁵
MnCl ₂ * 4H ₂ O	9.10 x 10 ⁻⁷
ZnSO ₄ * 7H ₂ O	7.65 x 10 ⁻⁸
CoCl ₂ * 6H ₂ O	4.20 x 10 ⁻⁸
CuSO ₄ * 5H ₂ O	3.93 x 10 ⁻⁸
Na ₂ MoO ₄ * 2H ₂ O	2.60 x 10 ⁻⁸

Tab. 14: metalli in traccia in soluzione presenti nel terreno f/2

Vitamine in soluzione madre	Concentrazioni [M]
Diammina * HCl (vitamina B ₁)	2.96 x 10 ⁻⁷
Biotina (vitamina H)	2.05 x 10 ⁻⁹
Cyanocobalammina (vitamina B ₁₂)	3.69 x 10 ⁻¹⁰

Tab. 15: vitamine in soluzione presenti nel terreno f/2

Le modifiche effettuate al terreno per gli esperimenti hanno riguardato essenzialmente l'azoto e il fosforo. Sono state scelte delle concentrazioni più basse di quelle tipiche del terreno, che presenterebbe un rapporto azoto/fosforo (N/P) eccessivamente alto di circa 24, per ricreare una condizione più vicina a quella del Mare Adriatico e una condizione di carenza di fosforo. Precisamente sono state allestite con un rapporto N/P di 16 (colture di controllo con normale rapporto Redfield), di 116 (in carenza di fosforo) e di 290 (in carenza spinta di fosforo).

Le colture sono state avviate inoculando circa 3000 cellule di *P. multistriata* in beute autoclavate contenenti circa 1700 mL di terreno di coltura. Le beute sono poi state riposte all'interno di una camera termostatica (Fig. 16) settata ad una temperatura costante per tutta la durata dell'esperimento (16 e 20°C). La camera al suo interno è provvista inoltre di lampade fluorescenti che creano una intensità luminosa costante che era di circa $90 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$, ed in seguito abbassata a circa $60 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Il sistema di illuminazione è inoltre dotato di un temporizzatore in grado di regolare automaticamente l'alternanza buio e luce, che per i nostri esperimenti era di 12:12.



Fig. 16: camera di coltura, presso i Laboratori di biologia e fisiologia algale di Ravenna

3.3 Disegno sperimentale

Da un'accurata ricerca bibliografica, si è potuto notare come in definitiva gli studi effettuati in coltura su *P. multistriata* rivelano che la tossicità può essere influenzata maggiormente da temperatura e concentrazione di nutrienti.

Sono stati quindi scelti questi due fattori su cui valutare la crescita, il consumo di nutrienti, l'efficienza fotosintetica e la produzione di acido domoico.

- E' stata allestita una prima coltura di *P. multistriata* mantenuta a 20°C con un terreno f/2 standard, senza modificazioni di nutrienti, per osservare un' effettiva crescita e tossicità della specie in coltura.
- Un esperimento preliminare (Fig. 17) è stato allestito con colture di *P. multistriata* mantenute a 16°C di temperatura, e con due diversi rapporti N/P; una condizione di controllo (C) con un rapporto N/P di 16 (dato da nitrati in concentrazione di 580 μM e fosfati in concentrazione di 882 μM) ed una condizione di carenza di fosfati (-P) con un rapporto N/P di 116 (con nitrati 580 μM e fosfati 5 μM), ognuna in doppia replica. L'intensità luminosa nella camera era di circa 95 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

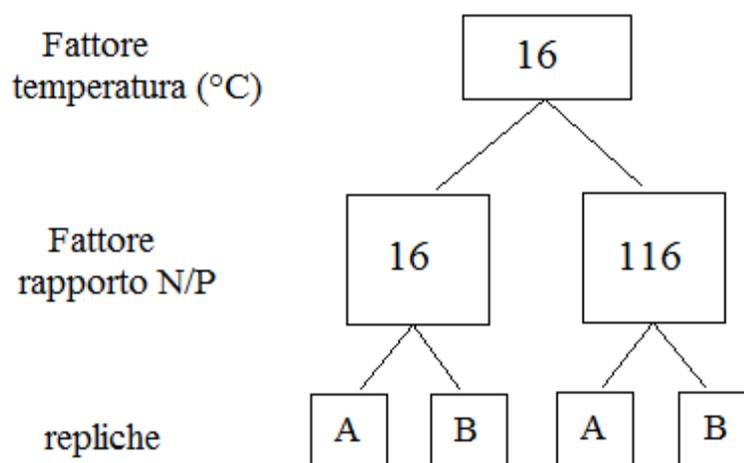


Fig. 17: schema a blocchi dell'esperimento preliminare con i relativi valori dei fattori abiotici esaminati; temperatura (in °C) e nutrienti disciolti (rapporto N/P)

- In base ai dati ottenuti dall'esperimento preliminare sono state decise le condizioni per il secondo esperimento (Fig. 18). Le colture di *P. multistriata* erano mantenute a due temperature diverse (16 e 20°C) e due rapporti N/P; una condizione di controllo (C) uguale all'esperimento precedente ed una condizione di carenza di fosfati (-P) ancora più spinta, tale per cui il rapporto N/P risultasse di 290 (ottenuto con nitrati in concentrazione di 580 μM e fosfati in concentrazione di 2 μM). L'intensità luminosa è stata abbassata a circa 65 μE m⁻² s⁻¹, in quanto dai dati dell'esperimento preliminare risultava una saturazione dei fotosistemi ad un'intensità luminosa minore.

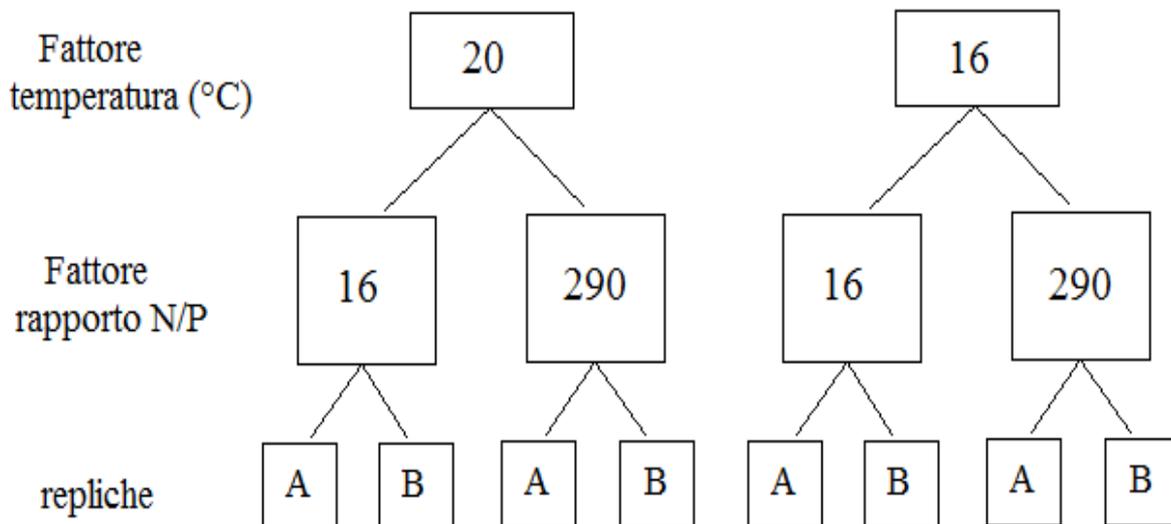


Fig. 18: schema a blocchi del secondo esperimento con i relativi valori dei fattori abiotici esaminati; temperatura (in °C) e nutrienti disciolti (rapporto N/P)

3.4 Valutazione della crescita algale

3.4.1 Curve di crescita

La crescita delle cellule algali in colture con volume limitato e nutrienti necessari, cresciute in adatte condizioni di luce, temperatura ed areazione presenta un andamento tipico sigmoidale, che comprende quattro fasi (Fig. 19):

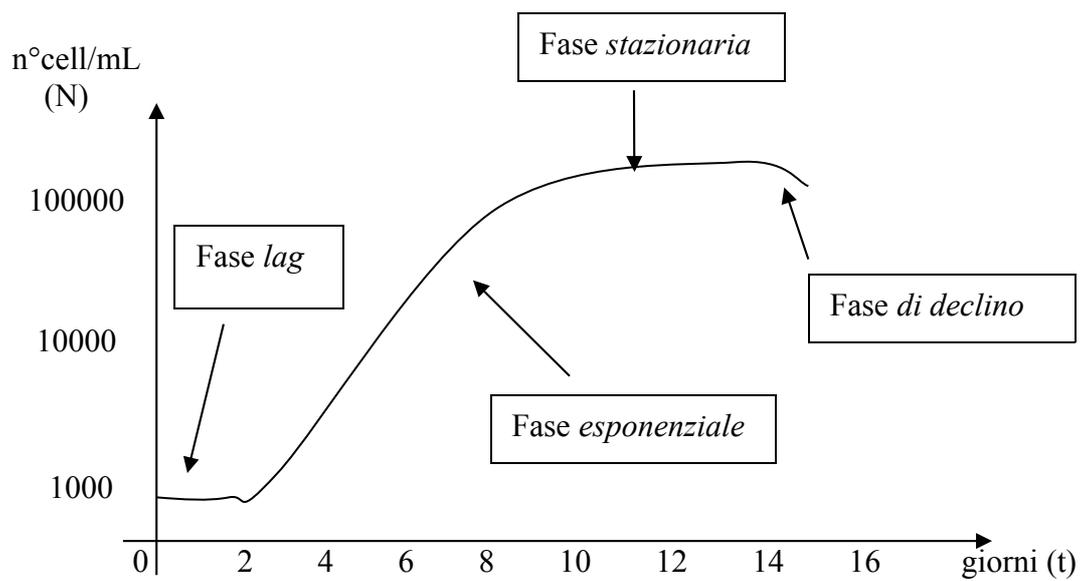


Fig. 19: esempio di curva di crescita

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

La curva di crescita può essere descritta dall'equazione:

$$\frac{dN}{dt} = kN$$

E' possibile calcolare la velocità di crescita specifica prendendo due punti della curva di crescita durante la fase esponenziale, quando mostra la massima pendenza. I due valori di N scelti, N₁ e N₂, corrispondono sull'asse delle ascisse al tempo misurato in giorni, rispettivamente t₁ e t₂, e sull'asse delle ordinate al numero di cellule su millilitro. Il tasso di crescita, μ, può essere misurato applicando la seguente formula:

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

3.4.2 Metodo Utermöhl

La creazione delle curve di crescita è stata effettuata grazie al metodo del conteggio delle cellule presenti in un determinato volume d'acqua, che prende il nome del ricercatore tedesco che lo propose (Utermöhl, 1931). Il conteggio è stato effettuato, circa ogni due giorni, per tutta la durata degli esperimenti. Viene prelevata dalle colture un'aliquota di 1 mL e posta in un apposito pozzetto circolare. Vengono aggiunte due gocce di un particolare fissante a base di iodio-ioduro, il LUGOL, che fa sì che le cellule in sospensione si depositino sul fondo del pozzetto, garantendo una misura più accurata. La conta è effettuata dopo circa 30 minuti, grazie ad un microscopio ottico rovesciato con un ingrandimento 32X. Le cellule algali presenti nel campione sono state contate su transetti di lunghezza pari al diametro della camera di sedimentazione (24 mm) e di larghezza pari al diametro del campo visivo, per un totale di tre transetti per campione.

Si procede calcolando la media delle alghe contate nei diversi transetti e si moltiplica per un fattore (F), pari a 30,4, calcolato in base al rapporto tra l'area della camera di sedimentazione (452,16mm²) e l'area del transetto osservato a 32X (14,88mm²).

$$\frac{\sum N^{\circ} cell}{N^{\circ} transetti} * 30,7 = N^{\circ} cell/ mL$$

In questo modo si ottiene il numero di cellule per millilitro, presente nel campione in esame. Ripetendo questa procedura dal giorno zero fino al giorno di raccolta della coltura, e mettendo in relazione il numero di cellule per millilitro con il tempo, si ottengono le curve di crescita.

3.5 Misura dell'attività fotosintetica

La misura dell'attività fotosintetica è stata effettuata tramite fluorimetro ad impulsi modulati (Pulse Amplitude Modulation, PAM) che consente di discriminare emissioni di fluorescenza da parte del fitoplancton, e quindi indirettamente la sua capacità fotosintetica. Infatti, l'energia assorbita dalla clorofilla può avere tre diversi destini;

- può essere usata per la fotosintesi (fotochimica);
- può essere dissipata come calore;
- può essere riemessa come fotoni di lunghezza d'onda più alta (fluorescenza).

Questi tre processi avvengono in competizione per cui l'aumento di uno porta alla diminuzione degli altri due, pertanto la fluorescenza, proveniente soprattutto dal fotosistema II (PS II) può dare informazioni sull'efficienza della fotochimica.

Il principio della misura della fluorescenza si basa sull'osservazione, fatta da Kautsky nel 1930, che trasferendo organismi fotosintetici dal buio alla luce essi mostrano un picco di fluorescenza che raggiunge un massimo in pochi secondi, seguito da una lenta discesa ad uno stato stazionario. La differenza tra la fluorescenza massima del picco (F_m) e la fluorescenza iniziale (F_0) rappresenta la fluorescenza variabile (F_v) o "effetto Kautsky", ed è sfruttata stimare la produzione primaria.

Nel PSII quando tutti i centri di reazione sono "chiusi", ossia quando in seguito alla fotoeccitazione i primi accettori di elettroni sono ridotti e non possono accettarne altri, l'efficienza della fotochimica diminuisce e aumenta la resa in fluorescenza. Questo aumento si traduce nel picco visibile al PAM. Al contrario quando tutti i centri di reazione sono "aperti" significa che è possibile il trasporto degli elettroni. La fase di lenta diminuzione della fluorescenza è, infatti, spiegata grazie al lento aumento dei processi fotosintetici (*quenching* fotochimico) e della dissipazione di parte dell'energia assorbita come calore (*quenching* non fotochimico).

Il fluorimetro PAM (PDA-100, Walz) ha la particolarità di emettere la luce necessaria per misurare la fluorescenza in maniera modulata, cioè accesa e spenta ad elevata frequenza ed il detector è in grado di ricevere solo la fluorescenza stimolata da tale luce.

Il campione di alghe su cui si devono effettuare le misure viene adattato al buio per 20

minuti circa, trascorsi i quali 3 mL della sospensione algale vengono posti in una cuvetta e inseriti nel fluorimetro. Inizialmente il campione viene illuminato con un raggio di luce (illuminazione di base, MB) che non è sufficiente a stimolare la fotosintesi ma può promuovere un segnale di fluorescenza. Si ottiene il livello minimo di fluorescenza (F_0) che si ha quando tutti i centri di reazione sono “aperti”, quindi disponibili per la fotosintesi. In seguito viene dato un flash di luce ad alta intensità (flash di luce saturante, SFL di circa $3000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$); questo riduce tutti gli accettori del PSII e la fluorescenza raggiunge il valore massimo (F_m) che si ottiene in assenza di fotochimica, nel campione adattato al buio.

Dal rapporto $(F_m - F_0) / F_m$ si può stimare l'efficienza massima della fotochimica del PSII (o *yield* massimo). Un valore attorno a 0,600 – 0,700 indica che la coltura è in buone condizioni mentre una diminuzione indica uno stato di sofferenza.

A questo punto viene fornita una luce attinica (AL) tale da consentire la fotosintesi; si può osservare un aumento transitorio di fluorescenza dovuto ad una fase di latenza prima dell'inizio della fissazione di carbonio durante i primi secondi di illuminazione. Fornendo una luce continua la fluorescenza diminuisce a causa dei processi fotochimici e di dissipazione di calore, fino a raggiungere un valore costante (F_t).

Applicando un secondo flash di luce saturante si ottiene un massimo di fluorescenza (F_m') più basso di F_m (picco di adattamento al buio).

La differenza tra F_m e F_m' riflette l'energia dissipata come calore (*quenching* non fotochimico).

Partendo da questi dati si possono ottenere i seguenti parametri:

- *quenching* fotochimico $qP = (F_m' - F_t) / (F_m' - F_0)$ che riflette lo stato redox di Q_A ;
- *quenching* non fotochimico $qN = (F_m - F_m') / (F_m - F_0)$ che riflette l'energia dissipata come calore;
- *yield* massimo potenziale del PSII $\phi = (F_m - F_0) / F_m$;
- *yield* effettivo del PSII $\phi = (F_m' - F_t) / F_m'$ che diminuisce proporzionalmente alla saturazione progressiva della fotosintesi sotto l'effetto dell'aumento di luminosità.

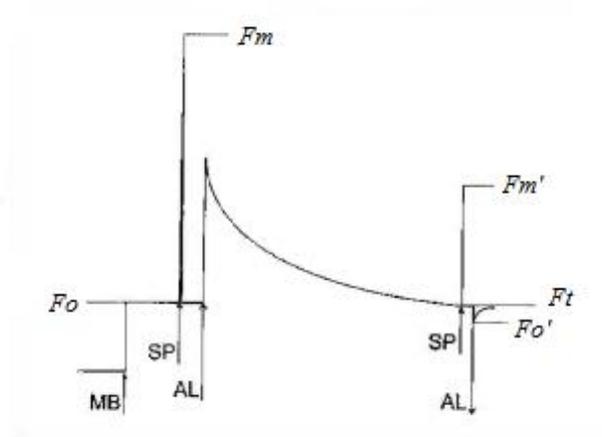


Fig. 20: fluorescenza emessa dalle alghe in seguito ai diversi impulsi luminosi somministrati.

Con il fluorimetro PAM è possibile creare due tipi di curve; la prima detta *light curve* in cui il fluorimetro emette impulsi saturanti ogni minuto e contemporaneamente fa aumentare la luce attinica di esposizione delle alghe, permettendo di valutare le risposte della fotosintesi alla luce, la seconda detta *induction curve* in cui la luce attinica è mantenuta costante e vengono emessi 14 impulsi saturanti fino al raggiungimento di un valore di rendimento in fluorescenza costante, dalla cui elaborazione si ottengono informazioni sulla funzionalità del fotosistema II.

3.6 Stima del biovolume

Data la già citata correlazione positiva lineare tra quantità di acido domoico accumulato dalle cellule e il loro volume è stata fatta anche una misura di biovolume.

Le dimensioni delle specie fitoplanctoniche variano su una scala di diversi ordini di grandezza (da 1 μm ad oltre 1 mm, Smayda, 1978) e in alcuni gruppi, essenzialmente nelle diatomee, esiste un'elevata variabilità intraspecifica della taglia cellulare, dovuta alle modalità di riproduzione vegetativa.

Il calcolo del biovolume totale del fitoplancton in un campione presuppone la conoscenza dell'abbondanza della specie e del loro volume medio individuale. La forma dei singoli taxa viene approssimata ad un solido noto o ad una composizione di solidi, per i quali si individuano le formule di calcolo del volume. Le misure necessarie

per calcolare il volume delle cellule vengono ottenute al microscopio grazie al software di analisi d'immagine NIS-element di Nikon.

In questi esperimenti la misura del biovolume è stata fatta circa ogni due giorni di coltura, per una media di 20 organismi misurati a campione. *Pseudo-nitzschia* spp viene approssimata da Sun et al., (2003) ad un prisma con base di parallelogramma il cui volume è dato dalla formula seguente

$$V=1/2*a*b*c$$

dove *a* rappresenta la lunghezza dell'asse apicale, *b* la lunghezza dell'asse transapicale e *c* la misura dell'asse peralvare.

Una delle dimensioni richieste per calcolare il volume non può essere misurata direttamente, a causa della prospettiva bidimensionale fornita dall'osservazione al microscopio. Il biovolume medio è stato quindi stimato dalla media di ogni dimensione.

3.7 Stima del carbonio organico particolato (POC)

Per la determinazione delle concentrazioni di POC il metodo attualmente più diffuso si basa su analizzatori elementali CHN (Fig. 21).

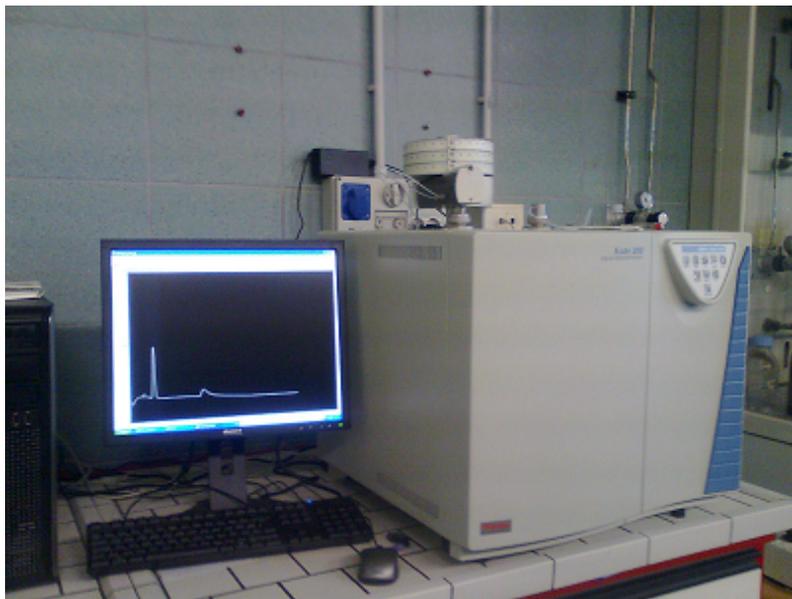


Fig. 21: analizzatore elementale CHN, presso i Laboratori di Biologia e Fisiologia Algale di Ravenna

Si tratta di analizzatori costituiti essenzialmente da: un autocampionatore, una colonna di combustione (reattore), una colonna di riduzione, un sistema di separazione gascromatografico, un'unità di rilevamento (detector), un sistema computerizzato di registrazione dei risultati analitici.

L'analisi del carbonio è stata limitata al giorno di raccolta delle colture, nella loro fase stazionaria. Una aliquota di 20 mL di coltura per ogni campione è stata filtrata con filtri WHATMAN GF/F (porosità 0,7 μm) precedentemente sciacquati con acqua distillata e calcinati in muffola a 550°C per 20 minuti. Questo passaggio è necessario ad eliminare le eventuali tracce di altri composti organici presenti sui filtri.

I filtri contenenti le cellule sono stati poi essiccati in stufa a 105° per 24 ore ed infine avvolti in pellicola di stagno per l'analisi.

L'autocampionatore provvede ad immettere ogni campione, nel reattore di combustione (un tubo verticale in quarzo riempito con appositi catalizzatori e rame metallico) mantenuto ad una temperatura compresa tra 970°C e 1050°C ed attraverso il quale fluisce una corrente costante di elio. Dopo l'introduzione del campione, la corrente di elio è temporaneamente arricchita con ossigeno puro per produrre una combustione flash. Queste condizioni permettono di bruciare totalmente la porzione organica, convertendo quindi le molecole nei rispettivi prodotti di combustione. La miscela dei gas ottenuti è fatta passare sui catalizzatori per una totale ossidazione a N_2 , CO_2 , H_2O , e quindi su rame nella colonna di riduzione per rimuovere l'eccesso di ossigeno e ridurre gli ossidi di azoto presenti a N_2 . Infine la miscela di gas risultante viene sospinta dal gas carrier (He) in una colonna cromatografica dove i singoli componenti sono eluiti individualmente come N_2 , CO_2 e H_2O fino ad un rilevatore di conducibilità termica (TCD).

La concentrazione degli elementi viene determinata in riferimento ad una retta di calibrazione costruita con sostanze a composizione % nota (nel nostro caso è stato utilizzato lo standard BBOT 2,5 bis 5-ter-butylbenzoxazol- 2-yl-thiophene).

Ottenuta la concentrazione di carbonio per ogni cellula è possibile calcolare la biomassa moltiplicandola per l'abbondanza cellulare.

3.8 Analisi dei nutrienti

Al fine di valutare se esistesse una diversa assunzione dei principali macronutrienti da parte delle cellule di *P. multistriata* in funzione delle diverse condizioni di crescita, sono state monitorate le concentrazioni di nitrati e fosfati disciolti durante tutto il periodo di coltura. Un bilancio di azoto e fosforo totali è stato poi possibile grazie all'ulteriore analisi delle componenti organiche nel giorno di raccolta delle cellule.

Per le analisi di nitrati e fosfati disciolti venivano prelevate aliquote di coltura ogni due giorni circa, e filtrate con filtri GF/C WHATMAN, di maglia 1,2 µm, per eliminare le cellule in sospensione, e riposte all'interno di falcon sigillate alla temperatura di -20°C fino al momento dell'analisi.

Il principio con cui si basano le analisi dei nutrienti in campioni di acqua marina, è la trasformazione, attraverso una reazione chimica, della sostanza da analizzare, in un altro composto che potrà essere misurato colorimetricamente all'interno del range di lunghezze d'onda dello spettro visibile.

3.8.1 Fosfati disciolti

Per quanto riguarda l'analisi del fosforo reattivo (P-PO₄) il metodo prevede la preparazione di un reattivo misto, contenente una soluzione di molibdato ammonico (15 g in 500 ml di acqua distillata), una soluzione di acido solforico (28 ml di acido solforico al 96 % in 180 ml di a.d.), una soluzione di acido ascorbico (27 g in 500 ml di a.d.) e una di tartrato di potassio e antimonile (0,34 g in 250 ml di a.d.), aggiunte nella proporzione 2:5:2:1. Ogni campione viene opportunamente diluito per non superare il limite di quantificazione del metodo dato dallo standard. L'aggiunta di 5 mL di reattivo misto al campione innesca la reazione che si basa sul fatto che il molibdato reagisce con l'ortofosfato del campione in ambiente acido, riducendosi ad un composto blu (Fig. 22). L'intensità del colore blu è proporzionale alla quantità di ortofosfato nel campione e viene letta tramite spettrofotometro alla lunghezza d'onda di 885 nm dopo 10 minuti dall'inizio della reazione. L'assorbanza del campione viene poi confrontata con una curva di calibrazione dei fosfati:

$$\text{P-PO}_4 \text{ (mg/L)} = (\text{ABS-intercetta})/\text{pendenza}$$

Otteniamo la concentrazione di fosfati totali in mg/L da moltiplicare per la diluizione apportata.



Fig. 22: reazione colorimetrica per l'analisi dei fosfati

3.8.2 Nitrati disciolti

La determinazione di azoto nitrico (N-NO₃) nei nostri campioni è stata fatta mediante riduzione con cadmio. Il nitrato viene ridotto a nitrito in modo pressoché quantitativo (90-95%) facendo percolare l'acqua da analizzare attraverso una colonna di cadmio metallico granulare, precedentemente ramato con Solfato di Rame, ad un pH iniziale di 5,5. Successivamente si misura per via spettrofotometrica, a 543 nm, l'assorbanza del prodotto colorato (Fig. 23) che si ottiene a pH 1,5-2 dalla diazotazione con solfanilammide (SA) dell'acido nitrico formatosi e dalla successiva copulazione con N-(1-naftil)-etilendiammina (NEDA).

Per la determinazione dei nitrati, occorre sottrarre ai valori di assorbanza ottenuti per i campioni il rispettivo valore del bianco, costituito da sola acqua di mare sintetica, e procedere alla determinazione del fattore F, dato dal rapporto tra la concentrazione in ppm dello standard utilizzato (0,14 ppm) e la differenza di assorbanza tra lo standard e il bianco.

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

Per un'efficienza di lettura del 100% il fattore dovrebbe avere un valore intorno a 0,31, poiché la colonna di cadmio si disattiva man mano che la si usa o se resta inoperosa per molto tempo. La concentrazione dei nitrati si ottiene infine correggendo l'assorbanza dei campioni per i valori del bianco e per il volume in mL di acqua in esame usata per l'analisi, e moltiplicandola per il fattore F.

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

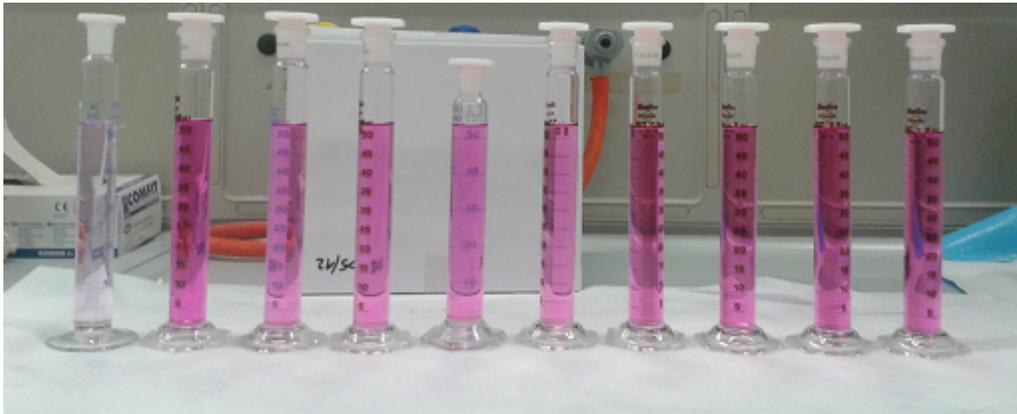


Fig. 23: reazione colorimetrica per l'analisi dei nitrati

3.8.3 Nutrienti assimilati

L'analisi di azoto e fosforo organici all'interno delle cellule è stata effettuata unicamente nel giorno di raccolta delle colture con due diversi metodi.

Per misurare l'azoto totale particolato (PTN) è stato utilizzato l'analizzatore elementare CHN, come già descritto, contemporaneamente all'analisi per il carbonio.

L'analisi del fosforo intracellulare invece è stata effettuata con metodo colorimetrico, proposto da Menzel & Corwin (1965), che prevede l'idrolisi acida del fosforo organico dai composti.

Una aliquota di 20 mL di coltura è stata prelevata in doppia replica da ogni campione il giorno della raccolta e filtrata con filtri WHATMAN GF/F (porosità 0,7 µm). I filtri sono stati poi imbevuti con 8 mL di soluzione 5% di persolfato di potassio ($K_2S_2O_8$) all'interno di matracci in borosilicato. Questi ultimi sono stati sigillati il più possibile con tappi di vetro e pellicola trasparente ed autoclavati a 120°C per 30 minuti. Una volta raffreddati i matracci sono stati riempiti fino al volume di 50 mL con acqua distillata ed è stato aggiunto il reattivo misto per la reazione colorimetrica, già descritta, di analisi dei fosfati (par. 3.5).

3.9 Quantificazione del contenuto di acido domoico

Le analisi per la quantificazione del contenuto di acido domoico nelle cellule di *P. multistriata* sono state svolte presso il Centro di Ricerche Marine di Cesenatico, Laboratorio Nazionale di Riferimento per le Biotossine Marine.

L'analisi sulle cellule di *P. multistriata* è stata eseguita con un metodo in cromatografia liquida - spettrometria di massa LC-MS/MS. Tale metodo è in grado di rilevare la presenza di acido domoico e del suo isomero, acido epi-Domoico, fino a un limite di rilevabilità assoluto di 0.01 ng iniettati in colonna. Considerando la preparazione dei campioni tale limite di quantificazione è 0.05 fg/cell.

3.9.1 Preparazione e purificazione dei campioni

Le cellule di *P. multistriata* nelle colture sono state raccolte nella loro fase stazionaria, in quanto in letteratura è riportata spesso una maggiore produzione di DA quando le divisioni rallentano a causa delle limitazioni da nutrienti. Il giorno di raccolta è stato diverso per ogni esperimento, in quanto la crescita in coltura non è sempre uguale.

Per l'estrazione del contenuto cellulare l'intero volume di ogni beuta è stato centrifugato a 5000 rpm per 15 minuti separando le cellule dal medium. I pellet finali sono stati mantenuti in provette con 7 mL di soluzione di metanolo (MeOH) al 90% al buio e alla temperatura di 4°C fino al momento dell'analisi chimica. Il metanolo rappresenta il solvente d'estrazione per la tossina. L'estrazione poi è eseguita tramite sonicazione, per mezzo di un sonicatore ad asta (Ultrasonic® Liquid Processor, modello XL2020), per un tempo minimo di 20 minuti ad impulsi da 20% a 70%. Verificata al microscopio

l'avvenuta rottura delle alghe (Fig.24), i campioni sono stati centrifugati per 10 minuti a 4500rpm ed il surnatante è stato portato ad un volume noto con la stessa soluzione estraente.

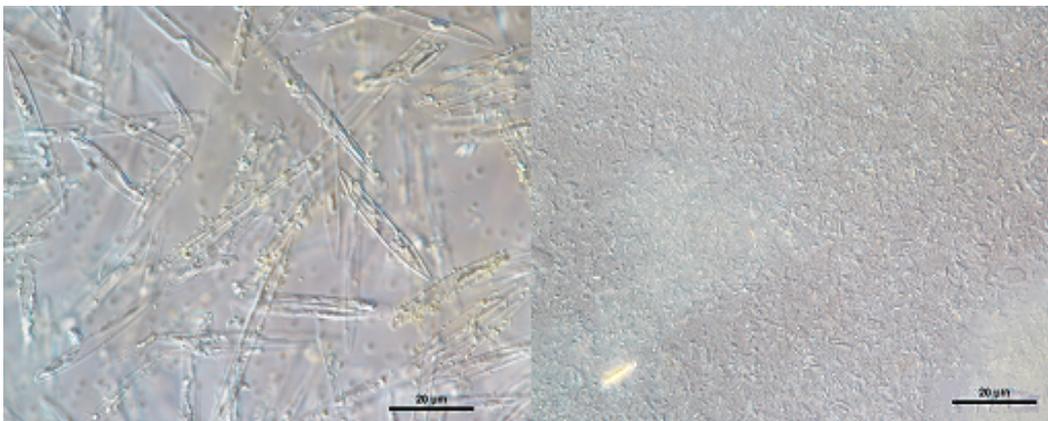


Fig. 24: a sinistra le cellule di *P. multistriata* ancora intatte, a destra nel campione sonicato non si notano più i frustuli

Dell'estratto così ottenuto ne sono stati prelevati 5 mL sui quali è stata eseguita una procedura di *clean-up* per purificare i campioni ed eliminare eventuali interferenti. A tale scopo l'estratto è stato portato a secco in bagno caldo ed in seguito risospeso in 5 mL di soluzione di MeOH al 50%.

La procedura di *clean up* consiste in un'estrazione in fase solida (Solid Phase Extraction, SPE) tramite scambio anionico grazie a cartucce LC-SAX (Supelco, Inc., Bellefonte, USA), metodica descritta da Quilliam et al. (1995). Queste ultime sono composte da un'ammina quaternaria alifatica legata alla superficie della silice. L'ammina è una base forte, ed esiste come catione carico positivamente che scambia, o attrae, specie anioniche presenti nella soluzione con cui è messa a contatto. L'isolamento del composto anionico di interesse avviene fin quando il pH è mantenuto al valore in cui sia l'ammina che il composto sono carichi. L'eluizione del composto ricercato avviene quindi tramite una soluzione avente un pH che neutralizza entrambi i gruppi funzionali, distruggendo la forza elettrostatica che li lega.

La procedura comprende un condizionamento delle cartucce tramite il passaggio di 6 mL di MeOH al 100% e 3 mL di acqua bidistillata. Sono stati poi caricati, in sequenza,

5 mL del campione, 5 mL di acqua di lavaggio e 0,5 mL di soluzione di Acetonitrile. L'acido domoico è stato infine eluito (1 goccia al secondo) con 2 mL di tampone citrato e raccolto in una provetta tarata a 2 mL. La soluzione così ottenuta è stata resa omogenea, agitando con cura, prima di prelevarne un'aliquota (1 mL) da destinare all'analisi cromatografica (LC-MS).

3.9.2 Cromatografia liquida associata a spettrometria di massa (LC-MS/MS)

Per l'analisi chimica delle tossine ASP è stato utilizzato un metodo sviluppato dal Centro Ricerche Marine, utilizzando un cromatografo liquido (Agilent 1290 LC) accoppiato a un triplo quadrupolo 6460 con Jet Stream ESI (Agilent Technologies, USA) (Fig. 25).



Fig. 25: strumento per LC-MS/MS presso il Centro Ricerche Marine di Cesenatico

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

inversa C18 (50x2,00 mm), termostata a 30 °C. La fase mobile è costituita da una soluzione acquosa polare (acqua, acido formico 50mM, ammonio idrossido 4mM) e una soluzione organica (MeOH 95,4%, acido formico 2,3 mM, ammonio idrossido 5,1 mM). Si utilizza un'eluizione a gradiente durante la quale le percentuali di fase mobile A e fase mobile B variano nel tempo, con un flusso pari a 300 µL/min. Il volume di campione iniettato è di 5 µL.

La spettrometria di massa consente di misurare le masse molecolari e di determinare quindi la formula di struttura di composti sconosciuti, anche avendone a disposizione piccole quantità. A differenza delle tecniche spettroscopiche, essa è un metodo d'analisi distruttivo la molecola cioè non rimane intatta dopo l'analisi e, per poter essere osservata e misurata nelle sue proprietà di massa, deve essere prima volatilizzata e ionizzata, in una componente dello spettrometro detta sorgente di ionizzazione. La ionizzazione è avvenuta per elettrospray (ESI).

Gli ioni sono separati in base al rapporto massa/carica (m/z). Si ritrova lo ione non frammentato (ione molecolare) ed i frammenti caratteristici della molecola con valore di m/z inferiore, poiché ogni molecola si frammenta in modo caratteristico nei suoi legami più deboli. Gli ioni così frammentati passano attraverso tre quadrupoli collegati. Il quadrupolo, opportunamente attraversato da corrente continua e radiofrequenza crea un campo elettrico statico ed alternato in grado di accelerare gli ioni e di separarli in base al rapporto m/z .

Il primo quadrupolo seleziona uno o più ioni precursori, il secondo funziona da cella di collisione, il terzo seleziona uno o più ioni prodotto. Questi ioni vengono raggruppati per produrre uno spettro ricostruito per ciascun composto. Si ottiene, infatti, un cromatogramma che riporta sull'asse delle ascisse il tempo necessario agli ioni ad uscire dalla colonna (tempo di ritenzione caratteristico del composto) e sull'asse delle ordinate il rapporto m/z . Per quanto riguarda l'acido domoico il metodo considera un tempo di ritenzione di circa 6,8 minuti. Sono state monitorate tre transizioni: m/z 312>266, m/z 312>161 e m/z 312>248.

Ogni campione di estratto dalle colture è stato iniettato nello strumento in tripla replica, per consentire una successiva analisi di significatività, eseguita tramite software STATISTICA (StatSoft).

Le concentrazioni di DA sono state calcolate in confronto a soluzioni di DA a concentrazione nota, il cui range andava da 0,02 a 4 $\mu\text{g/mL}$, e infine riferite al numero di cellule alla raccolta.

4 RISULTATI E DISCUSSIONE

4.1 Presenza e tossicità di *P. multistriata* in Adriatico

Nell'anno 2012 il monitoraggio delle aree marine prospicienti la Regione Emilia-Romagna ha rivelato la presenza di *Pseudo-nitzschia* spp a partire dal mese di Luglio, le cui abbondanze cellulari per litro in alcune delle principali stazioni campionate sono riportate di seguito (Fig. 26).

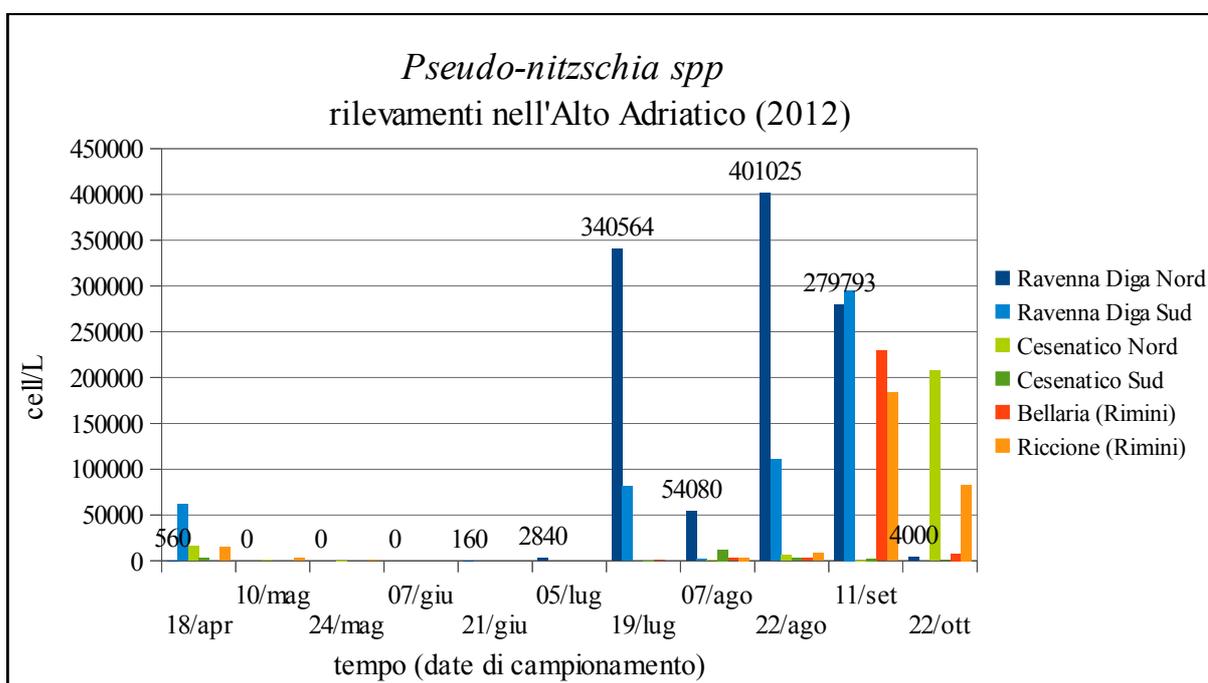


Fig. 26: abbondanze di *Pseudo-nitzschia* spp rilevate durante il monitoraggio effettuato da Aprile ad Ottobre 2012

Si può notare un picco di abbondanza di *Pseudo-nitzschia* spp nelle stazioni di campionamento al largo di Ravenna a partire dal mese di, con un'abbondanza di circa 340.564 cell/L. Discreti livelli di *Pseudo-nitzschia* spp si registrano comunque anche negli allevamenti al largo di Cesenatico e Rimini tra Settembre ed Ottobre.

Grazie all'osservazione al microscopio ottico dei campioni fitoplanctonici, prelevati nelle stazioni Diga Nord e Diga Sud, si è potuto identificare la specie *Pseudo-nitzschia multistriata*.

Questo ritrovamento di fioritura maggiore di *P. multistriata* nella tarda estate e di bloom minori in autunno è in accordo con quanto descritto da Rhodes et al., (2000) per il ceppo della Nuova Zelanda e da Zingone et al., (2006) nel Golfo di Napoli, mentre è opposto a quanto detto da Klein et al., (2010) in quanto in Normandia la fioritura appare solo ad Ottobre. Anche l'ordine di abbondanza raggiunto in coltura conferma quanto si ritrova in letteratura.

Da un campione prelevato il 19 Luglio è stato effettuato un isolamento di *P. multistriata* e si è proceduto all'inoculo dell'alga in un medium f/2 standard; la coltura è stata fatta crescere alla temperatura di 20°C ottenendo al 10° giorno un numero di cellule totali pari a circa 183.275.000. L'analisi in LC-MS/MS di un estratto di tale coltura ha rivelato la presenza di acido domoico (Fig. 27) ma con concentrazioni al di sotto del limite di quantificazione (<LOQ).

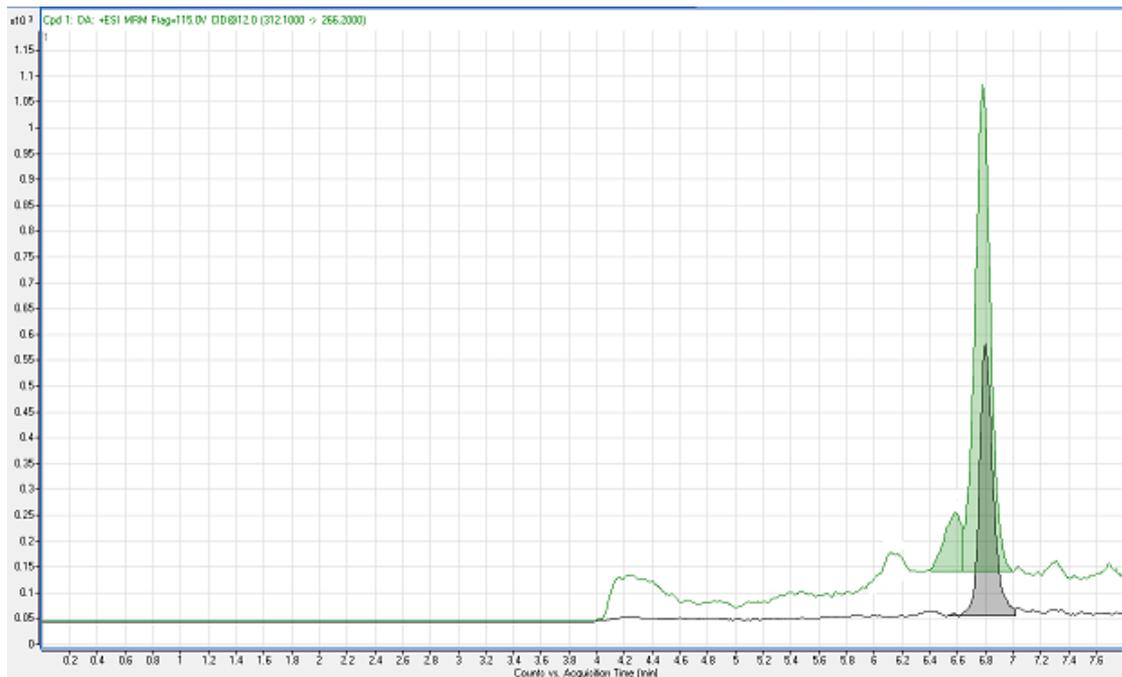


Fig. 27: cromatogramma (grigio) ottenuto dall'analisi LC-MS della prima coltura di *P. multistriata* isolata il 19 Luglio 2012, confrontata con lo standard di DA 0,07 ng/LC (verde)

Come si nota in Fig. 27 infatti, il nostro campione restituisce un picco più basso di quello dato dallo standard di DA alla concentrazione più bassa. I valori di concentrazione ottenuti non sono perciò quantificabili correttamente, nonostante lo strumento abbia rilevato la presenza di tossina.

Quindi l'alga isolata è in grado di produrre acido domoico, ma in quantità decisamente basse tali da non causare un evento d'intossicazione nell'uomo nell'area d'isolamento. Lo studio successivo è stato quindi effettuato per capire se in caso di variazione delle condizioni ambientali questa specie possa essere in grado di aumentare la produzione della tossina rappresentando un pericolo per la salute umana.

4.2 Esperimento preliminare – Effetto della bassa temperatura (16°C) e della carenza di fosforo su crescita e tossicità di *P. multistriata*

4.2.1 Valutazione della crescita

La crescita di *P. multistriata* è stata valutata in colture mantenute alla temperatura di 16°C, ad una intensità luminosa di 95 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$, e con due diversi rapporti N/P; una condizione di controllo (C) con un rapporto N/P di 16 ed una condizione di carenza di fosfati (-P) con un rapporto N/P di 116.

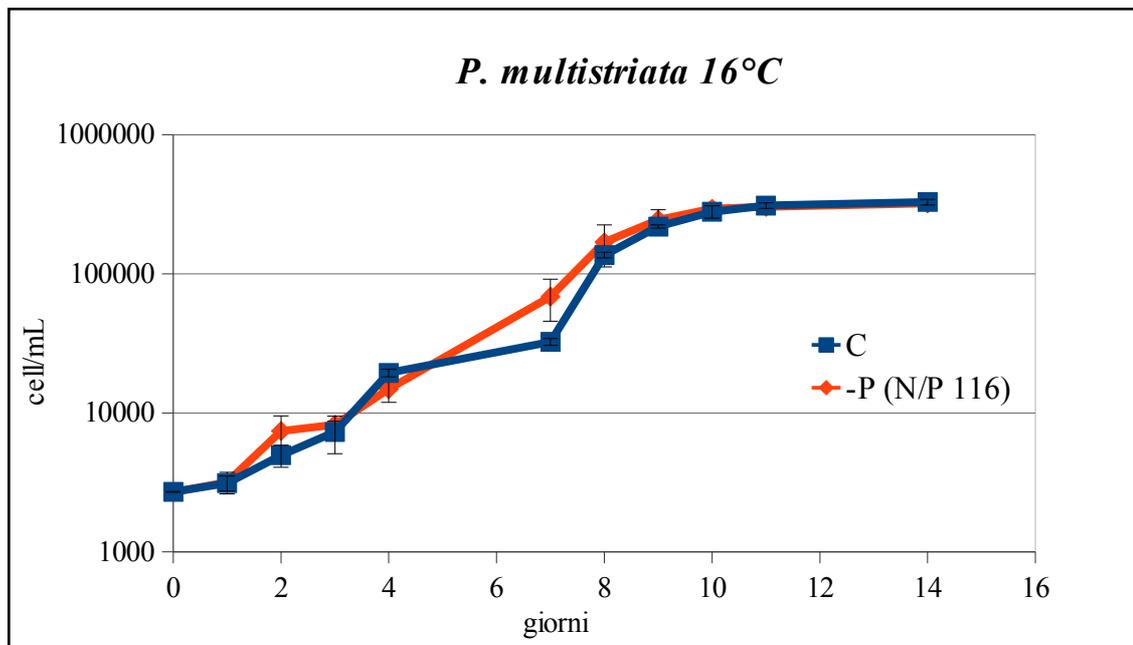


Fig. 28: curve di crescita di *P. multistriata* a 16°C

Dalle curve di crescita mostrate in Fig. 28 si può notare come l'alga sia cresciuta piuttosto bene anche ad una temperatura inferiore a quelle calde tipiche di Luglio (circa 25 °C), quando è stata effettivamente trovata. Questo può essere spiegabile grazie al dimostrato ampio range di tolleranza di temperatura da parte di *Pseudo-nitzschia* spp. Le fluttuazioni delle curve sono probabilmente riconducibili alle problematiche del metodo del conteggio, soprattutto quando le colture raggiungono numeri di cellule elevati, tanto da richiedere una diluizione del campione.

Il tasso di crescita (μ), calcolato sulla fase esponenziale, è circa 0,5 d⁻¹ per entrambe le condizioni di nutrienti. L'alga, inoltre, raggiunge abbondanze cellulari di circa 3,2x10⁵ cell/mL in entrambe le condizioni, dimostrando che la carenza di fosforo, applicata in questo primo esperimento, non ha avuto effetti sulla crescita. Questo è opposto a quanto si riscontra in Anderson et al. (2002) riguardo la correlazione positiva tra eutrofizzazione ed aumento di abbondanza di *Pseudo-nitzschia*.

4.2.2 Misura dell'efficienza fotosintetica

Sulle stesse colture su cui è stata valutata la crescita sono state anche fatte misure di efficienza fotosintetica. Di seguito sono riportati i grafici relativi al rendimento quantico o *yield* massimo (Fig. 29), misurato dopo adattamento delle alghe al buio, e al rendimento quantico o *yield* effettivo (Fig. 30), misurato dopo esposizione alla luce.

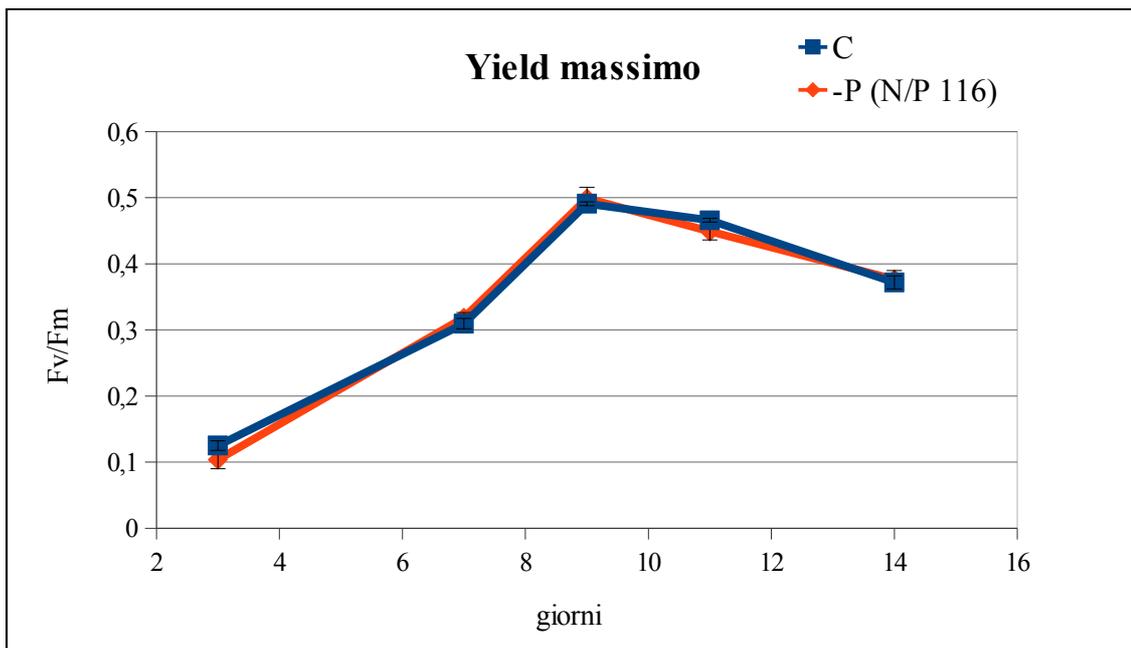


Fig. 29: *yield* massimo misurato durante la crescita della coltura preliminare di *P. multistriata* a 16°C

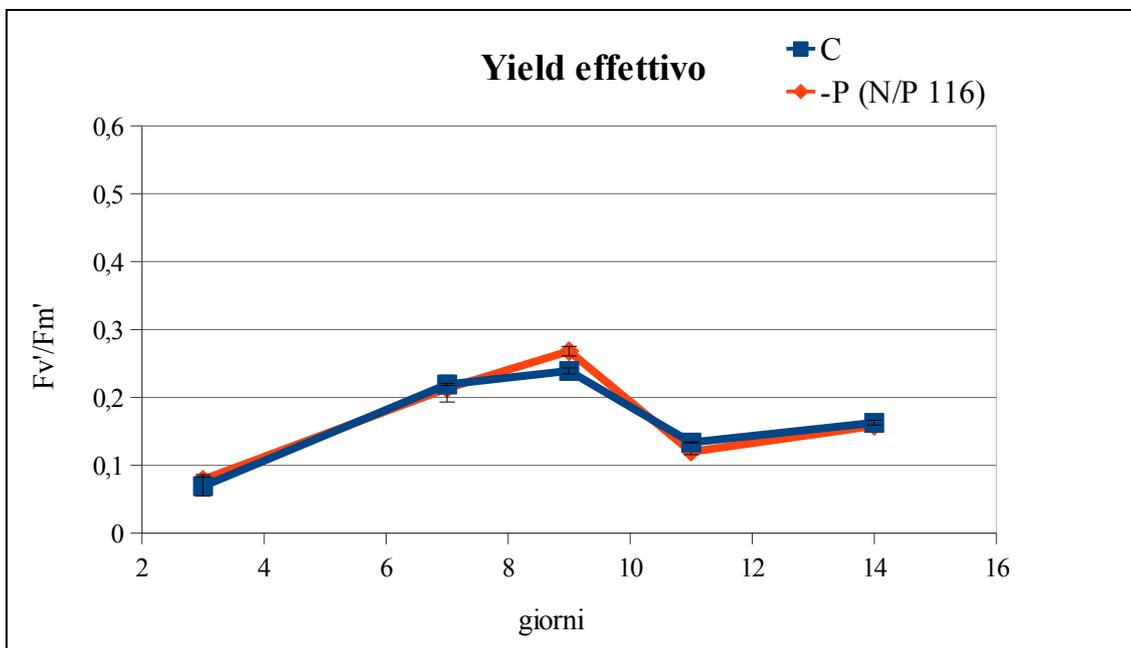


Fig. 30: *yield* effettivo misurato durante la crescita della coltura preliminare di *P. multistriata* a 16°C

I dati di rendimento quantico supportano chiaramente quanto osservato nelle curve di crescita; le colture mantenute a 16°C presentano un buon rendimento fotosintetico fino al giorno 9 quando quest'ultimo inizia a diminuire in corrispondenza dell'entrata nella fase stazionaria, probabilmente dovuta all'esaurimento di un macronutriente. Inoltre il fatto che le curve abbiano lo stesso andamento evidenzia che la carenza di fosforo applicata non ha effetto neanche sull'efficienza fotosintetica.

4.2.3 Stima del biovolume e carbonio cellulare

E' stato stimato il volume cellulare medio per ogni campione circa ogni due giorni durante la crescita. Mediamente le cellule presentavano un volume che andava da 325 a 407 μm^3 , ma soprattutto all'interno di ogni campione si nota un'ampia eterogeneità nella dimensione delle cellule (Fig. 31).



Fig. 31: foto al microscopio ottico della coltura preliminare di *P. multistriata* a 16°C

Complessivamente le colture di controllo presentano un biovolume minore dell'8,5%, rispetto alle colture in carenza di fosforo. Questo viene confermato dall'analisi del carbonio cellulare, o POC (Tab. 32). La misura del carbonio organico particolato infatti, rivela una quantità di C leggermente maggiore (circa del 12,5%) nella coltura cresciuta in carenza di fosfati.

colture	biovolume medio (μm^3)	POC ($\mu\text{g} \cdot 10^6 \text{cell}$)
C	318,6	35,9
-P (N/P 116)	348,4	41,2

Tab. 32: differenze tra biovolume medio e carbonio cellulare tra le due condizioni di coltura a 16°C

Questo è in accordo con quanto dimostrato da Pan et al. (1996 a) ossia che una limitazione da macronutrienti porta le cellule del fitoplancton ad un aumento nel contenuto cellulare di carbonio, risultante dall'accumulo di quest'ultimo al cessare delle divisioni cellulari.

4.2.4 Assimilazione dei nutrienti

Non sono molti gli studi relativi al consumo fisiologico dei nutrienti da parte di alghe del genere *Pseudo-nitzschia* in coltura, e in particolare per la specie *P. multistriata* questo è il primo studio riguardante tale parametro. Di seguito sono riportati i grafici relativi al consumo di nitrati (Fig. 33) e fosfati (Fig. 34) delle colture preliminari a 16°C.

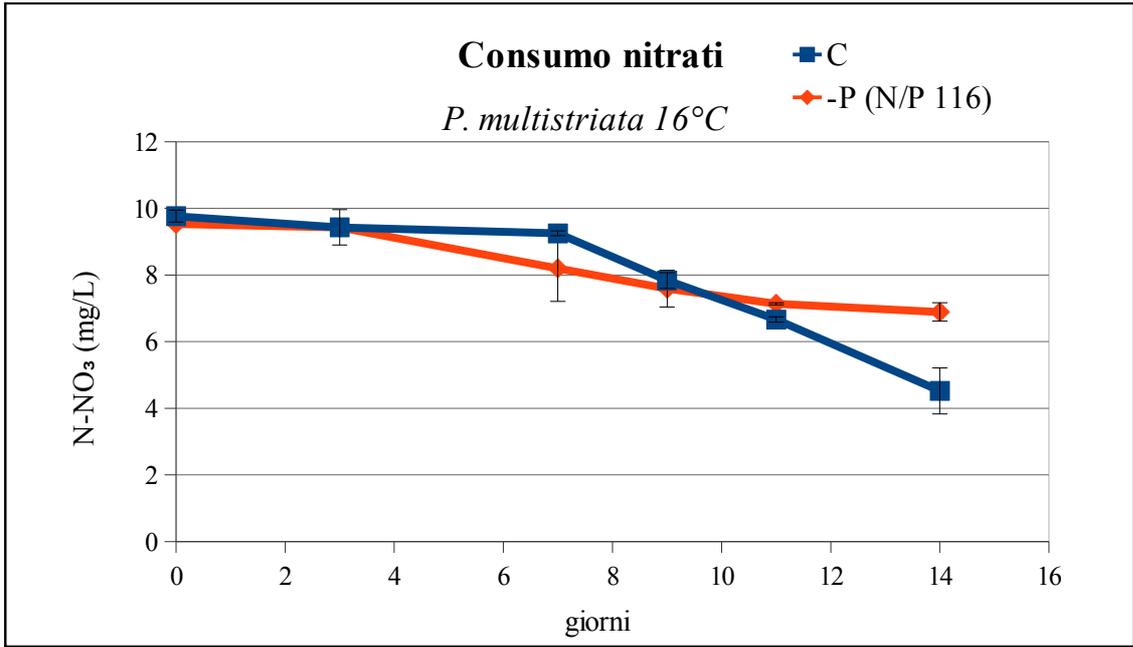


Fig. 33: consumo di nitrati a 16°C

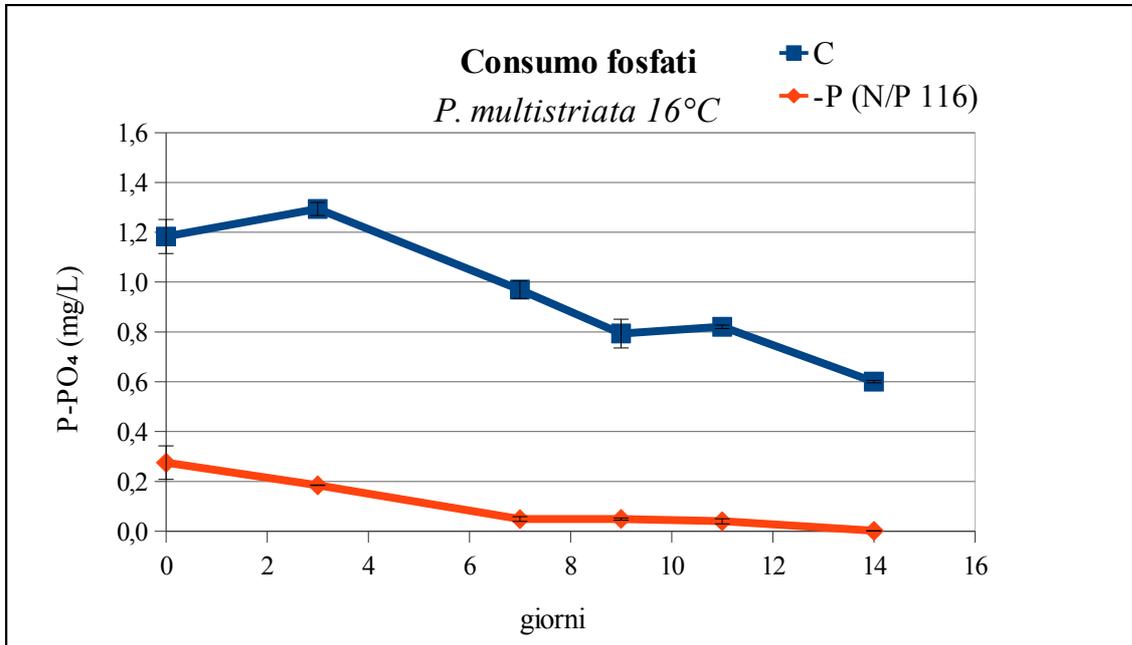


Fig. 34: consumo di fosfati a 16°C

Per quanto riguarda i nitrati (Fig. 33), inizialmente presenti nel terreno di coltura alla concentrazione di circa 9,7 mg/L, il consumo è lento e non completo per entrambe le condizioni di rapporto N/P. Si nota un consumo di nitrati finale minore per la coltura in carenza (-P), sebbene la significatività di questo dato sia dubbia in quanto la misura dei nutrienti disciolti in acqua non risulta molto precisa.

Per quanto riguarda i fosfati (Fig. 34), le colture hanno un consumo ovviamente molto diverso, infatti, solo la coltura in carenza di fosfati arriva al consumo completo di questi ultimi.

Complessivamente questi andamenti sono in disaccordo con quanto si riscontra normalmente in campo; la fioritura delle diatomee avviene, infatti, solitamente in primavera e autunno, quando le acque marine sono ricche in nutrienti. In questo caso invece le cellule di *P. multistriata* non sembrano necessitare di elevate concentrazioni di macronutrienti, come evidenziato anche dalle alte concentrazioni di nitrati ancora presenti nel terreno di coltura il giorno di raccolta delle cellule (Fig. 35).

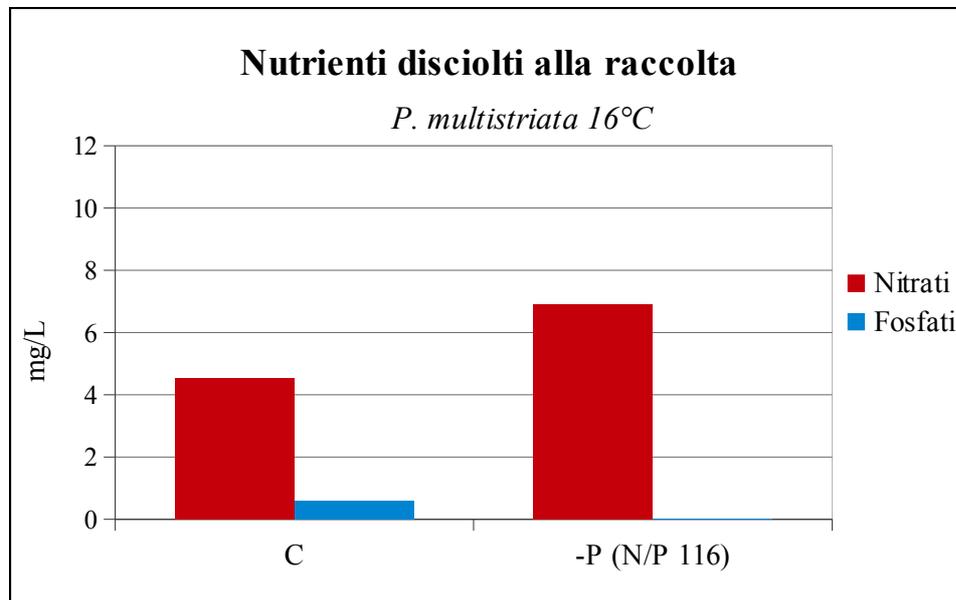


Fig. 35: concentrazioni di nitrati e fosfati presenti nelle terreno di coltura l'ultimo giorno

Sembra infatti che i nitrati nel terreno non siano stati completamente consumati e che la coltura in carenza di fosfati, tra le due, sia quella che ne abbia assimilati meno.

Di seguito è riportato il grafico delle componenti organiche di azoto e fosforo all'interno delle cellule, misurate mediante analizzatore elementare CHN il giorno della raccolta delle alghe (Fig. 36).

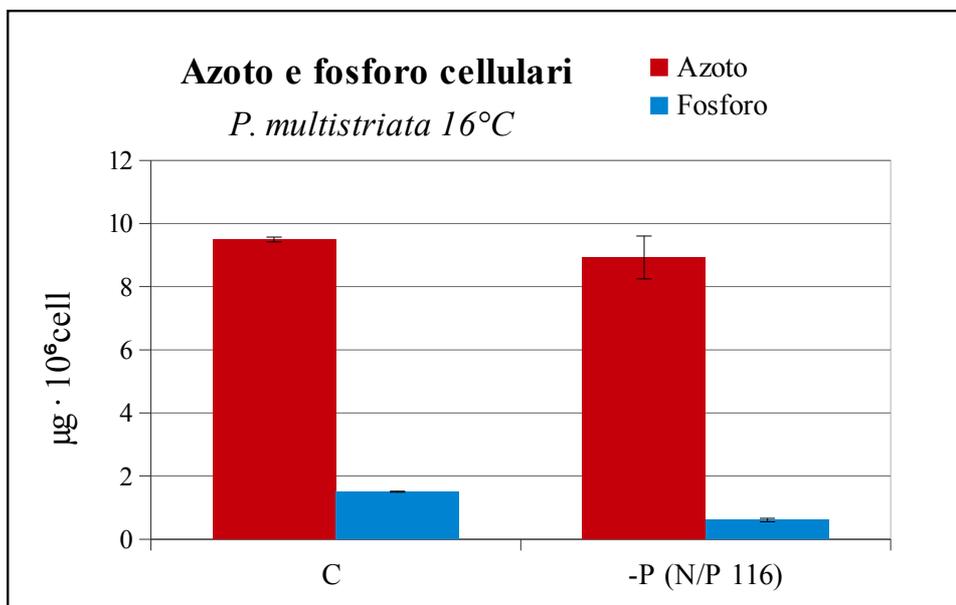


Fig. 36: concentrazioni di azoto e fosforo all'interno delle cellule misurati l'ultimo giorno di coltura

Al contrario di quanto evidenziato dall'analisi dei nutrienti disciolti, l'ammontare di azoto organico nelle cellule mostra solo una leggera differenza tra i due trattamenti.

Questo è in disaccordo con quanto dimostrato da Hangström et al. (2011), nel cui lavoro il ceppo di *P. multiseri* mostra una quantità di azoto intracellulare maggiore in condizioni di carenza di fosfati.

In generale inoltre, il rapporto cellulare N:P si presenta maggiore nelle colture cresciute in carenza di fosfati (N:P di 14,7 contro un N:P di 6,3 per le colture di controllo).

4.2.5 Quantificazione di acido domoico intracellulare

L'analisi del contenuto di DA nelle cellule è stata effettuata l'ultimo giorno di coltura, dopo 4 giorni di crescita stazionaria. I valori di concentrazione di DA, sopra al limite di quantificazione, espressi in pg/cell e confrontati con i valori misurati nella prima

coltura di *P. multistriata* allestita a 20°C subito dopo l'isolamento, sono riportati nel grafico seguente (Fig. 37).

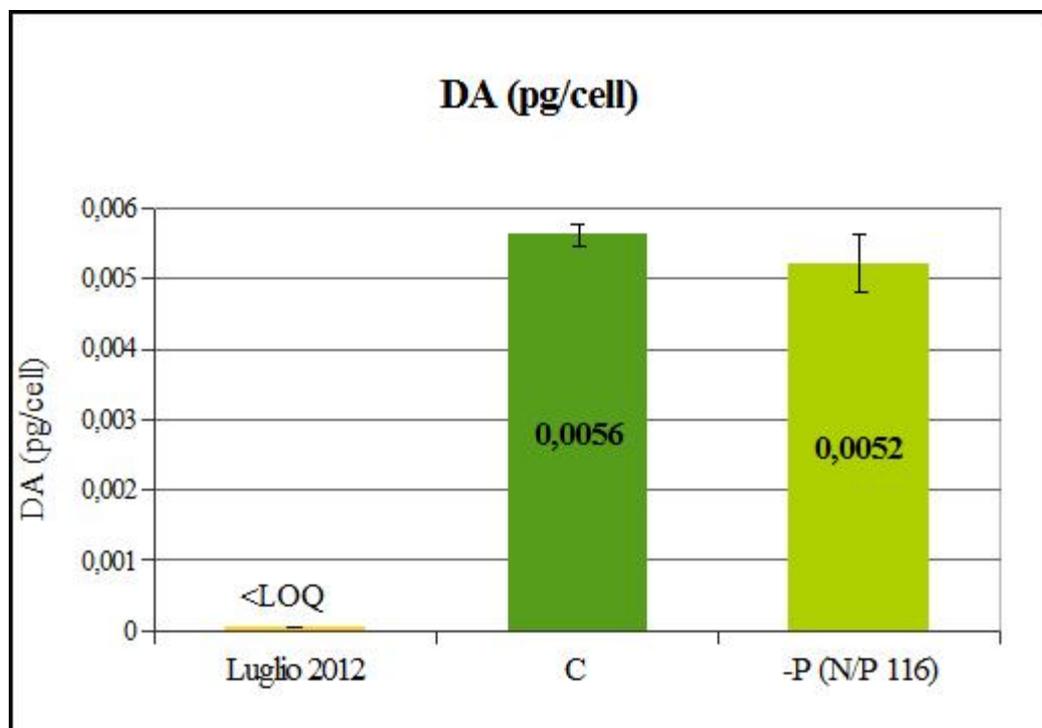


Fig. 37: contenuto di acido domoico nelle colture preliminari di *P. multistriata* a 16°C, e nella coltura dopo isolamento (denominata "Luglio 2012")

L'analisi con LC-MS ha dato segnale positivo per entrambe le colture, in particolare la quantità di DA prodotta dalle cellule mantenute a 16°C risulta significativamente maggiore (ANOVA ad una via, Newman-Keuls test, $p < 0,001$) di quella prodotta dalle cellule appena isolate e mantenute a 20°C. Allo stesso tempo però non sembra esserci alcun effetto evidente, sulla produzione di DA, dovuto alla carenza di fosfati.

Alla luce di questi risultati si è compreso che la bassa temperatura può avere un effetto rilevante sulla produzione di acido domoico, mentre la carenza di fosforo applicata non è risultata un fattore di stress per le colture. Si è deciso pertanto di allestire un secondo esperimento diminuendo ulteriormente la carenza di fosfati, mantenendo l'esposizione a 16°C e verificando l'effetto della bassa temperatura tramite confronto con colture mantenute a 20°C.

4.3 Effetto di variazioni di temperatura e nutrienti su crescita e tossicità di *P. multistriata*

4.3.1 Valutazione della crescita

In questo secondo esperimento è stata valutata la crescita di *P. multistriata* in colture mantenute a 20 e 16°C, e con due diversi rapporti di nutrienti; una condizione di controllo (C) uguale all'esperimento precedente ed una condizione di carenza di fosfati (-P) ancora più spinta e tale per cui il rapporto N/P risultasse pari a 290. Anche l'intensità luminosa è stata modificata e portata a $65\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$, in quanto dai dati dell'esperimento preliminare risultava una saturazione dei fotosistemi ad una intensità luminosa minore.

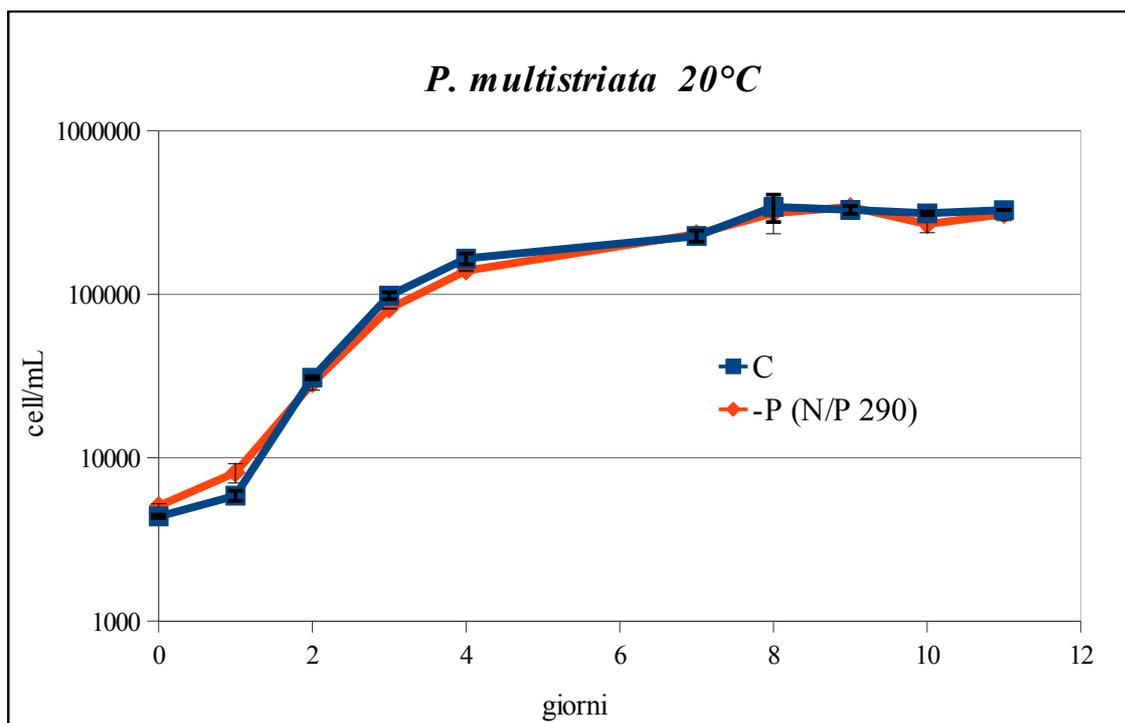


Fig. 38: curve di crescita di colture di *P. multistriata* a 20°C

Dalle curve in Fig. 38, si nota che la microalga a 20°C presenta una fase esponenziale molto corta e già dal giorno 4 di coltura la crescita rallenta e si mantiene pressoché stabile fino al giorno di raccolta, che in questo caso è stato anticipato al giorno 11.

Il tasso di crescita (μ), calcolato sulla fase esponenziale, risulta, infatti, più alto rispetto alle colture preliminari, e va da 1.4 d^{-1} per le colture di controllo, a 1.15 d^{-1} per le colture in carenza di fosfati.

La coltura a 20°C raggiunge abbondanze cellulari di circa $3,2 \times 10^5 \text{ cell/mL}$ in entrambe le condizioni nutrizionali, abbondanza paragonabile a quella osservata nell'esperimento preliminare a 16°C . Questo è in disaccordo con quanto precedente descritto in Pistocchi et al. (2012) dove la crescita di un ceppo di *P. multistriata*, anch'essa isolata nel Nord Adriatico, mostrava una crescita inferiore del 40% a 16°C rispetto a temperature più alte di 20 e 25°C .

Le due condizioni di rapporto N/P non mostrano differenze di crescita, provando che anche a 20°C la carenza di fosforo, applicata in questo secondo esperimento, non ha avuto effetti sulla crescita.

Di seguito sono riportate le colture di *P. multistriata* mantenute alla temperatura di 16°C (Fig. 39).

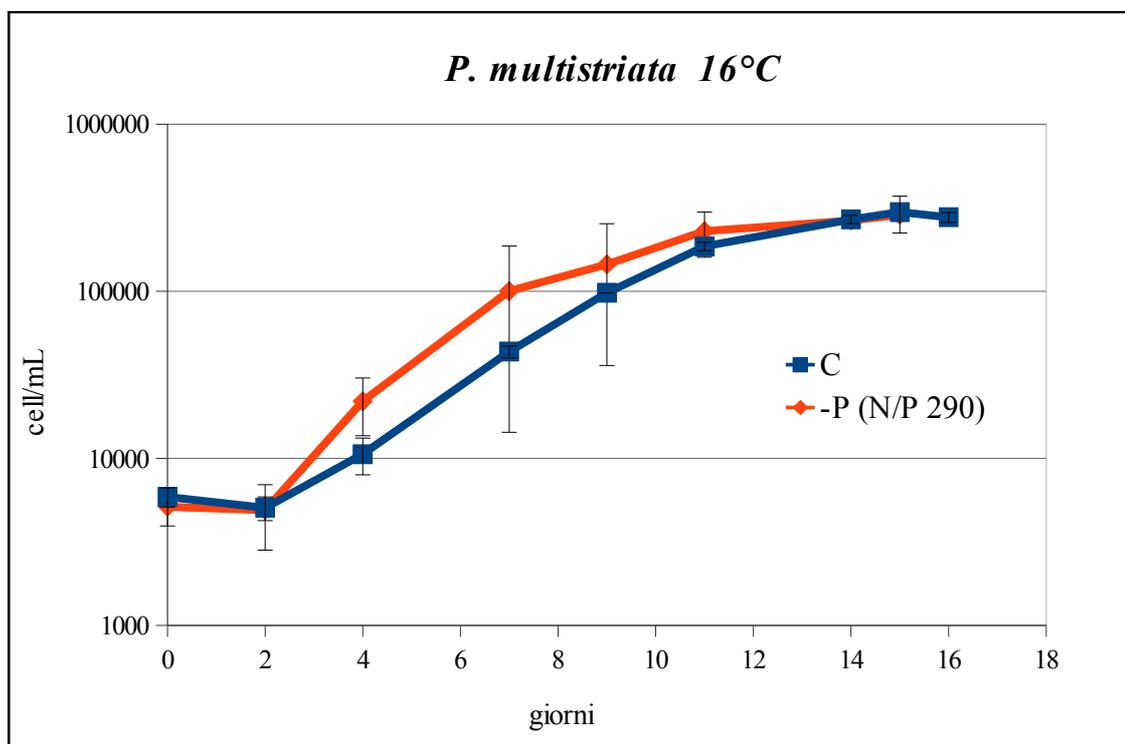


Fig. 39: curve di crescita di colture di *P. multistriata* a 16°C

I grafici mostrano una crescita delle cellule simile a quella ottenuta nell'esperimento preliminare alla stessa temperatura. La fase esponenziale è più prolungata di quella osservata a 20°C, che va ad esempio dal giorno 2 al giorno 11 per la coltura di controllo. Diversa è la crescita che si osserva per le colture in carenza di fosfati, ma non è considerata significativa a causa dell'alto coefficiente di variabilità tra le repliche effettuate. E' noto, infatti, che in coltura la crescita delle microalghe può non essere omogenea ma influenzata da svariati fattori esterni e/o interni, spesso non del tutto controllabili.

Il tasso di crescita a 16°C è di 0.4 d⁻¹ nei controlli e 0.6 d⁻¹ nelle colture in carenza, complessivamente più basso rispetto a quelle misurate a 20°C, ma comparabile a quello descritto nell'esperimento preliminare. Le abbondanze cellulari ottenute sono infatti le stesse ottenute negli esperimenti precedenti (2,8 – 3,2 x10⁵ cell/mL).

Anche in questo caso la bassa concentrazione di fosfati presenti nel terreno delle colture -P non ha influenzato significativamente la crescita di *P. multistriata*.

I parametri di crescita misurati nei diversi esperimenti sono riassunti in Tab. 40.

Condizioni di coltura		Tasso di crescita μ (day ⁻¹)	Cellule totali (cell/mL)
16°C	C	0,54	3,2 x10 ⁵
	-P (N/P 116)	0,56	3,2 x10 ⁵
20°C	C	1,41	3,2 x10 ⁵
	-P (N/P 290)	1,15	3,1 x10 ⁵
16°C	C	0,4	2,8 x10 ⁵
	-P (N/P 290)	0,6	2,9 x10 ⁵

Tab. 40: tasso di crescita e numero massimo di cellule raggiunto, nelle varie condizioni di coltura applicate

4.3.2 Misura dell'efficienza fotosintetica

Durante la crescita, ed in particolare nei giorni più significativi delle varie fasi di crescita, sono stati misurati i rendimenti quantici (Figg. 41-42) delle alghe dopo adattamento al buio (*yield* massimo) e alla luce (*yield* effettivo).

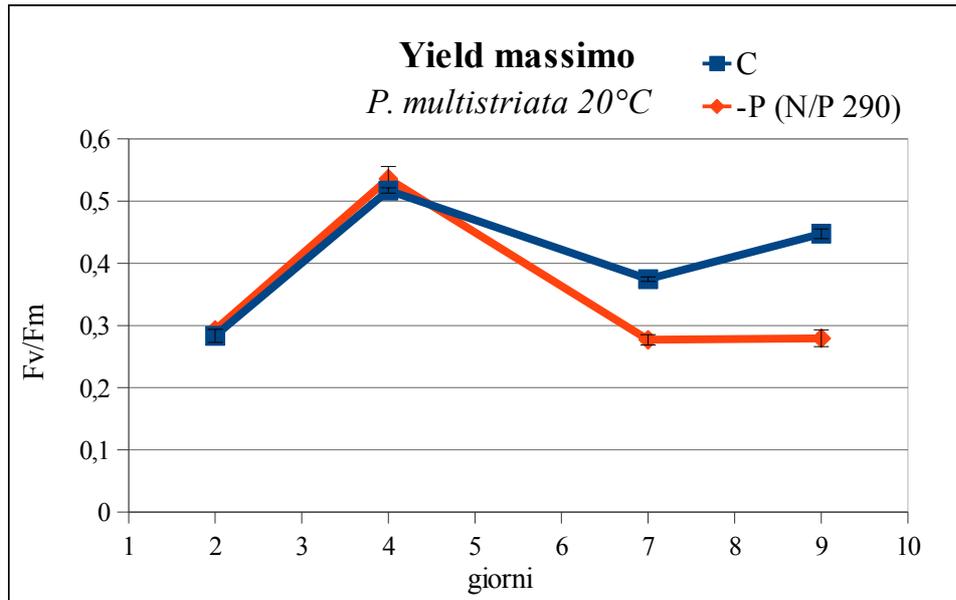


Fig. 41: *yield* massimo misurato durante la crescita di *P. multistriata* a 20°C

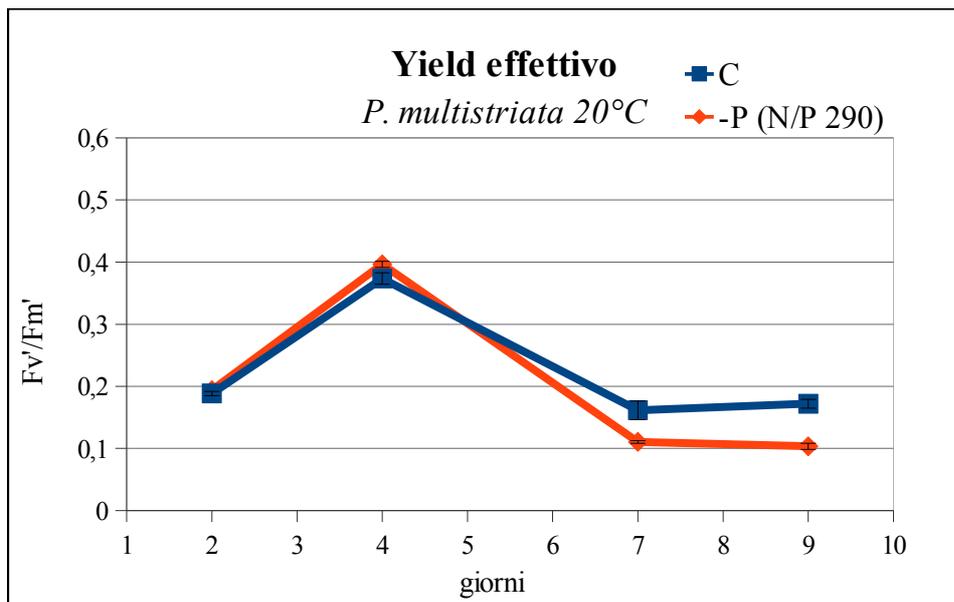


Fig. 42: *yield* effettivo misurato durante la crescita di *P. multistriata* a 20°C

Le curve dei rendimenti quantici massimi ed effettivi delle colture a 20°C confermano l'andamento delle curve di crescita viste precedentemente. Lo *yield* infatti aumenta fino al giorno 4 quando cessa la crescita esponenziale, per poi calare quando la crescita rallenta. A differenza dell'esperimento precedente, però, in questo caso si nota un

leggero abbassamento dello *yield* delle colture in carenza di fosforo, in fase di crescita stazionaria, rispetto ai controlli. Le cellule sembrano quindi meno efficienti fotosinteticamente a causa della limitazione da fosforo.

Di seguito sono riportati invece i grafici dei rendimenti quantici delle colture mantenute a 16°C (Figg.43-44).

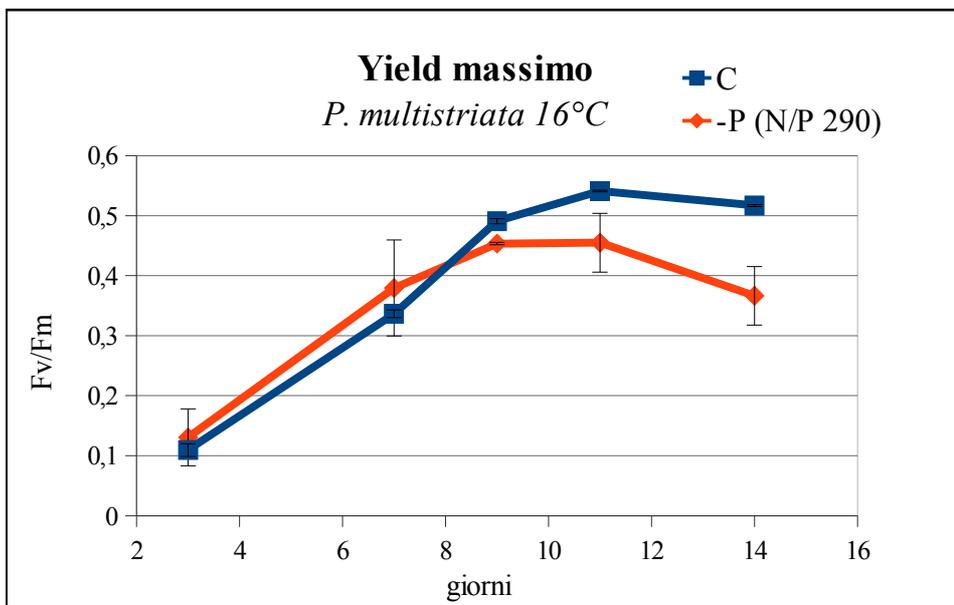


Fig. 43: *yield* massimo misurato durante la crescita di *P. multistriata* a 16°C

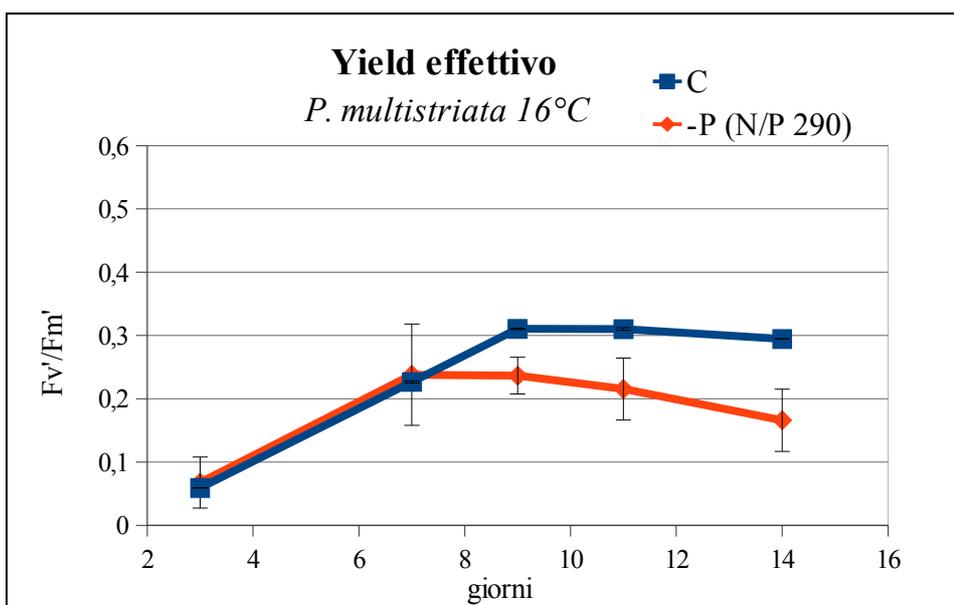


Fig. 44: *yield* effettivo misurato durante la crescita di *P. multistriata* a 16°C

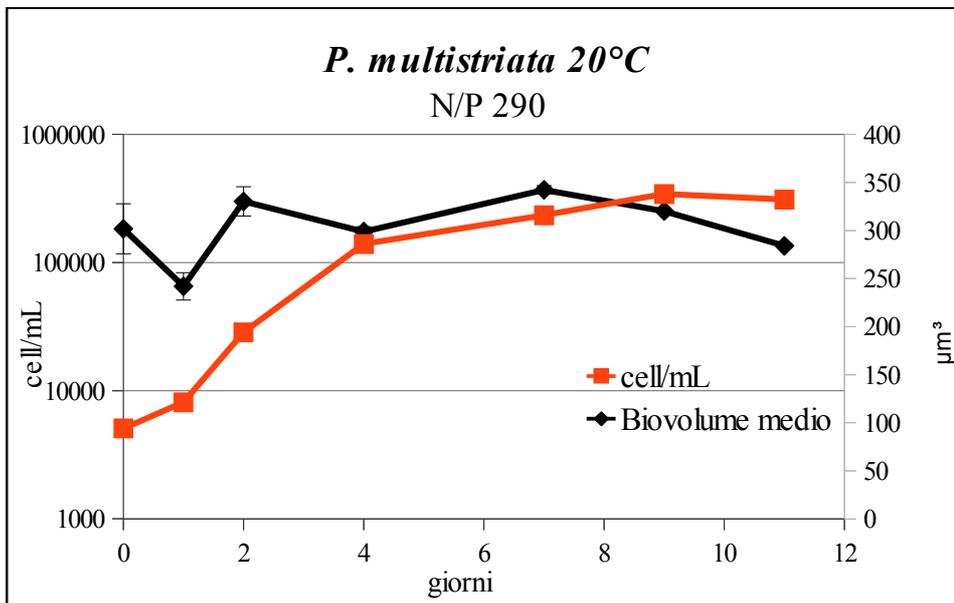
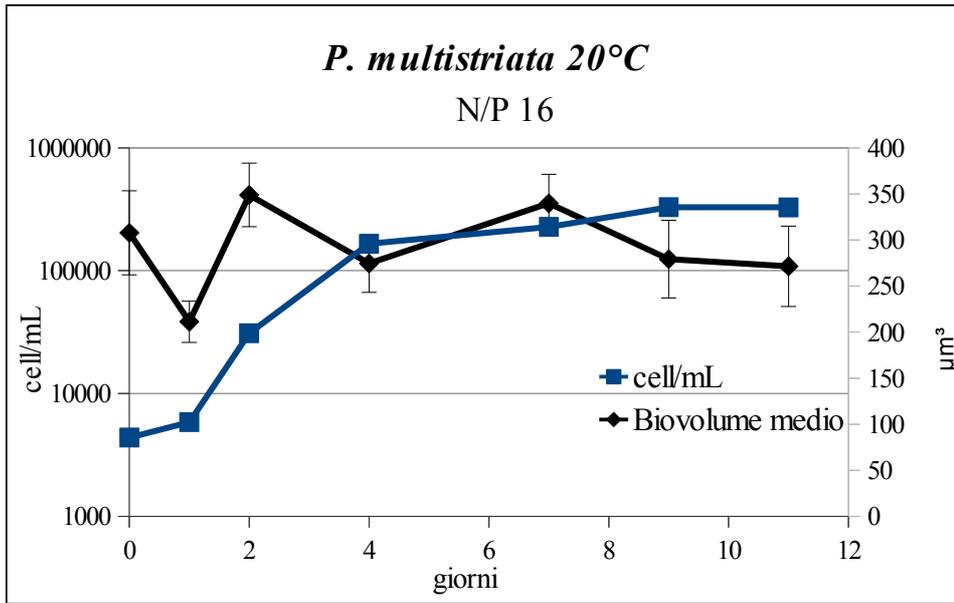
Anche in queste colture si osserva un andamento parallelamente alla crescita in quanto il rendimento quantico massimo ed effettivo, misurati in entrambe le condizioni di nutrienti, raggiungono un massimo intorno al giorno 9 per poi diminuire evidenziando un sintomo di una sofferenza delle cellule corrispondente all'inizio della fase stazionaria.

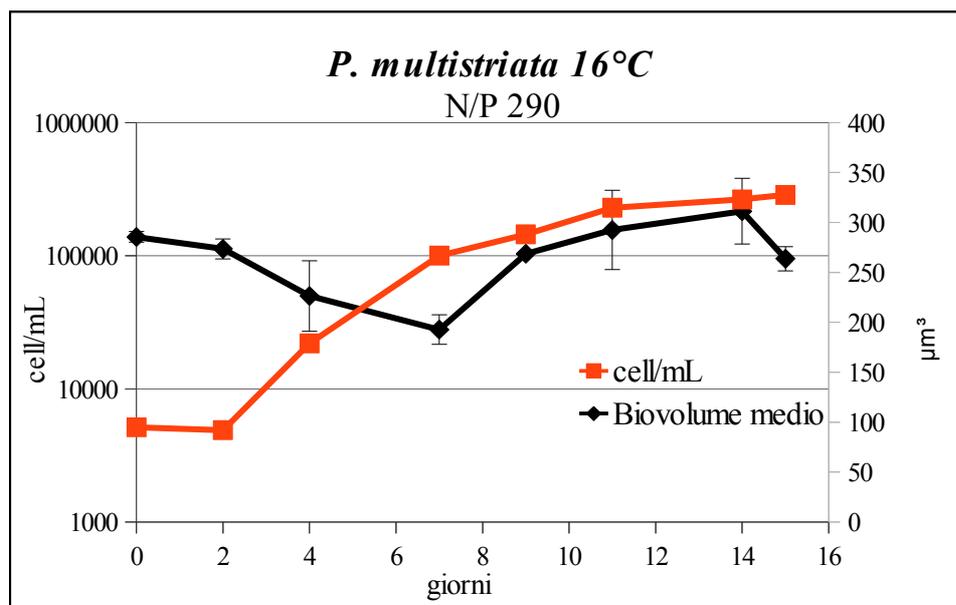
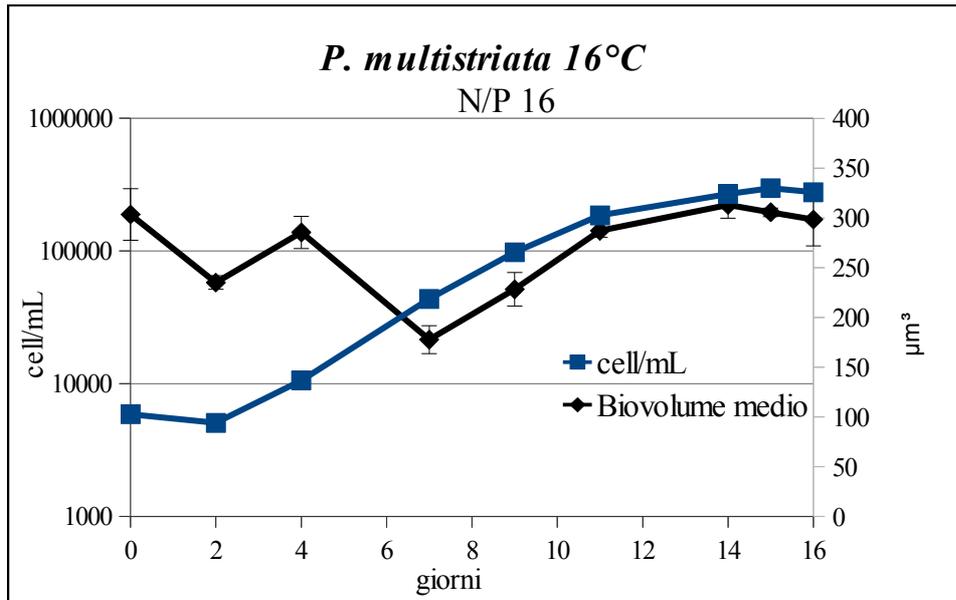
Questo secondo esperimento a 16°C mostra, però, un andamento del rendimento quantico molto diverso rispetto a quello osservato nell'esperimento preliminare. Si nota infatti una differenza tra le colture di controllo e quelle in carenza dopo il giorno 7. Questo risultato dimostra che esiste un effetto negativo dato dalla limitazione prolungata di fosforo sulle capacità fotosintetiche delle cellule di *P. multistriata* al contrario di quanto evidenziato dall'andamento della crescita.

Complessivamente si nota che i rendimenti fotosintetici maggiori si hanno nelle colture mantenute a 20°C. Questo è in accordo con quanto detto in Lelong et al. (2012), ossia che il range di temperatura preferibile da ogni specie di *Pseudo-nitzschia* è quello che si riscontra nel luogo e periodo di isolamento.

4.3.3 Stima del biovolume e carbonio cellulare

Il biovolume medio è stato stimato, a entrambe le temperature, circa ogni due giorni, ottenendo i seguenti andamenti messi a confronto singolarmente con le rispettive curve di crescita (Figg. 45-48).





Figg. 45-48: andamenti del biovolume medio in relazione con le curve di crescita

E' possibile notare come a 20°C (Figg. 45 e 46) le diatomee presentino un andamento molto eterogeneo del volume cellulare medio durante la crescita in entrambe le condizioni di nutrienti. ma non vi sono particolari differenze tra le due condizioni di rapporti N/P.

Le colture a 16°C (Figg. 47 e 48) mostrano l'andamento tipico delle cellule in coltura, ossia un progressivo calo del volume cellulare durante la crescita esponenziale, che poi

tende ad innalzarsi a causa del rallentamento delle divisioni in fase stazionaria. Anche in questo caso non si osservano differenze significative tra le due condizioni di nutrienti.

In generale il calo di biovolume dovuto alle numerose divisioni cellulari si osserva quando le colture sono in chiara fase di crescita esponenziale, a 20°C nel giorno 1 e a 16°C nel giorno 7. Questo andamento conferma una più lenta crescita di *P. multistriata* alla temperatura di 16°C.

Da un confronto con i biovolumi medi all'ultimo giorno di coltura dell'esperimento preliminare (Fig. 49) si può notare, infine, un leggero calo del volume delle cellule a causa del prolungato periodo in coltura. In particolare i biovolumi medi vanno da 307 μm^3 del giorno 0, a circa 270 μm^3 nell'ultimo giorno di coltura; il rimpicciolimento delle cellule è dovuto alla particolare riproduzione vegetativa che le caratterizza.

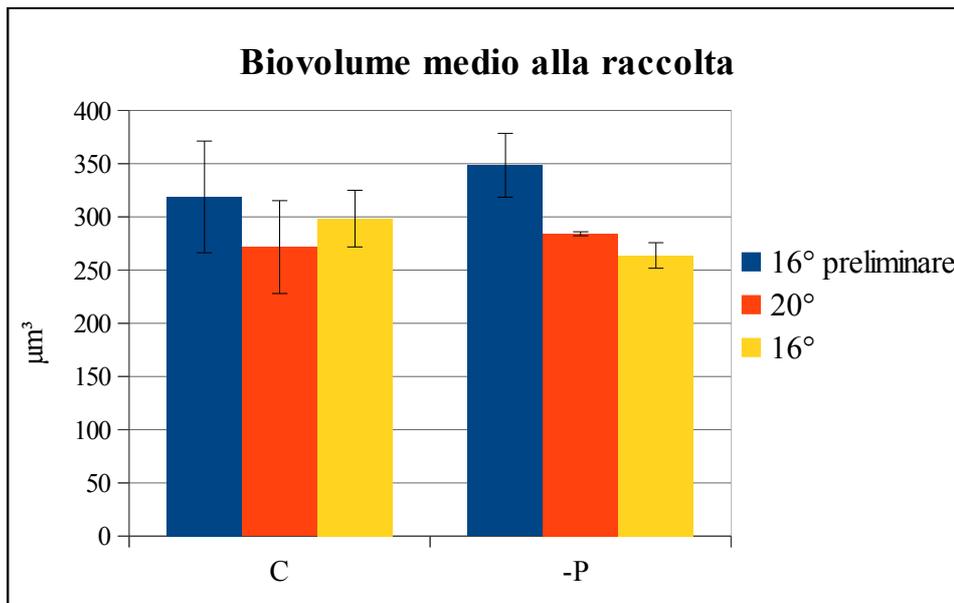


Fig. 49: biovolume medio dell'ultimo giorno di coltura nei tre esperimenti

Di seguito (Fig. 50) è riportata l'analisi del carbonio organico particolato ad entrambe le temperature, e confrontata con quella svolta nell'esperimento preliminare a 16°C.

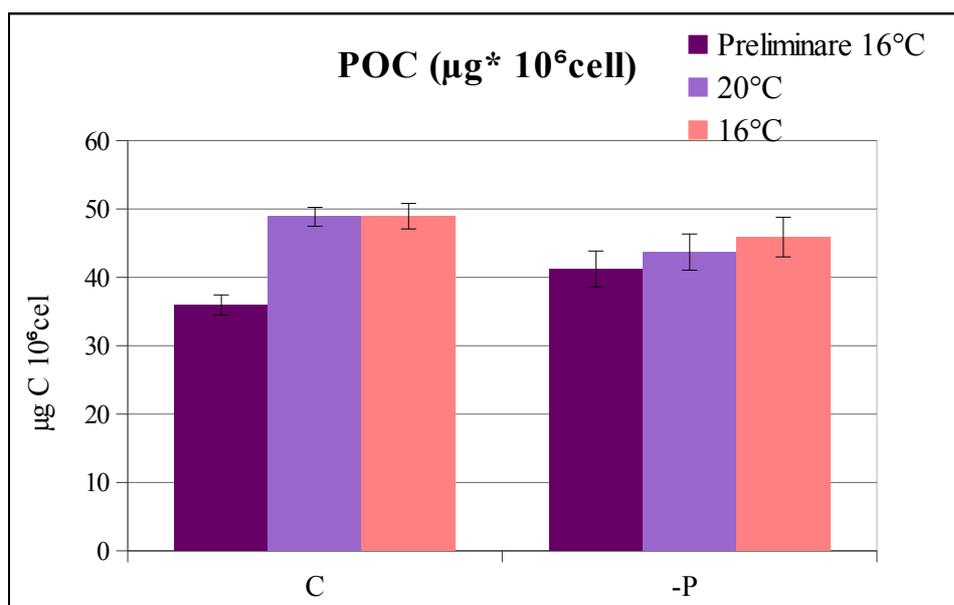


Fig. 50: analisi del carbonio organico al CHN in relazione all'esperimento preliminare

In questo secondo esperimento al contrario dell'esperimento preliminare si osserva una maggiore concentrazione di carbonio organico nelle colture di controllo rispetto a quelle in carenza, in accordo con quanto dimostrato da Hangström et al. (2011), il quale confrontando l'effetto di diversi livelli di carenza di P in un ceppo di *P. multiseriata* proveniente dal Brasile, evidenziava una minor quantità di carbonio per cellula in condizioni di carenza meno spinta. Nel nostro caso questo dato è in accordo con la minore efficienza fotosintetica osservata in carenza di fosforo.

In generale si osserva inoltre un aumento di POC rispetto all'esperimento preliminare. Questo è probabilmente spiegato dall'aggiustamento di intensità luminosa apportato in questo secondo esperimento. Il rendimento fotosintetico misurato alla luce nell'esperimento preliminare era infatti piuttosto basso, forse a causa della luce non adatta alla specie.

4.3.4 Assimilazione dei nutrienti

I risultati dell'analisi del consumo di nitrati e fosfati da parte delle cellule di *P. multistriata* ad entrambe le temperature, sono riportati di seguito come andamento delle concentrazioni, in mg/L, dei nutrienti disciolti durante il periodo di coltura (Figg. 51-52).

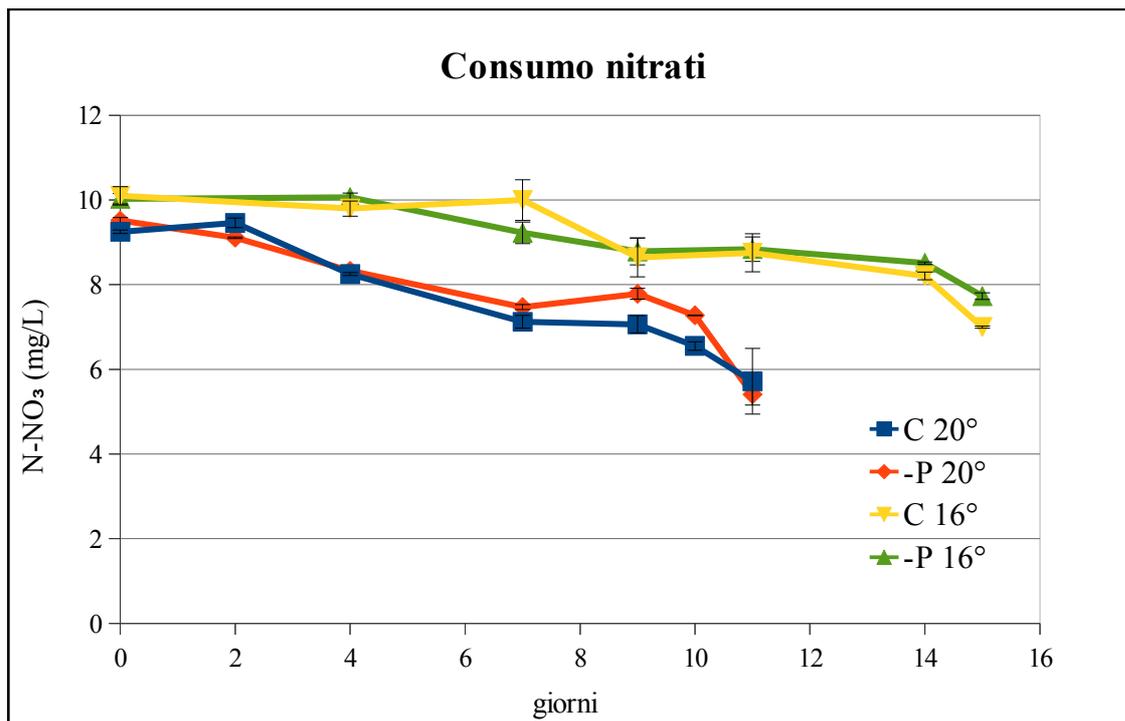


Fig. 51: consumo di nitrati a 20°C (curve blu e arancio) e 16°C (curve gialla e verde)

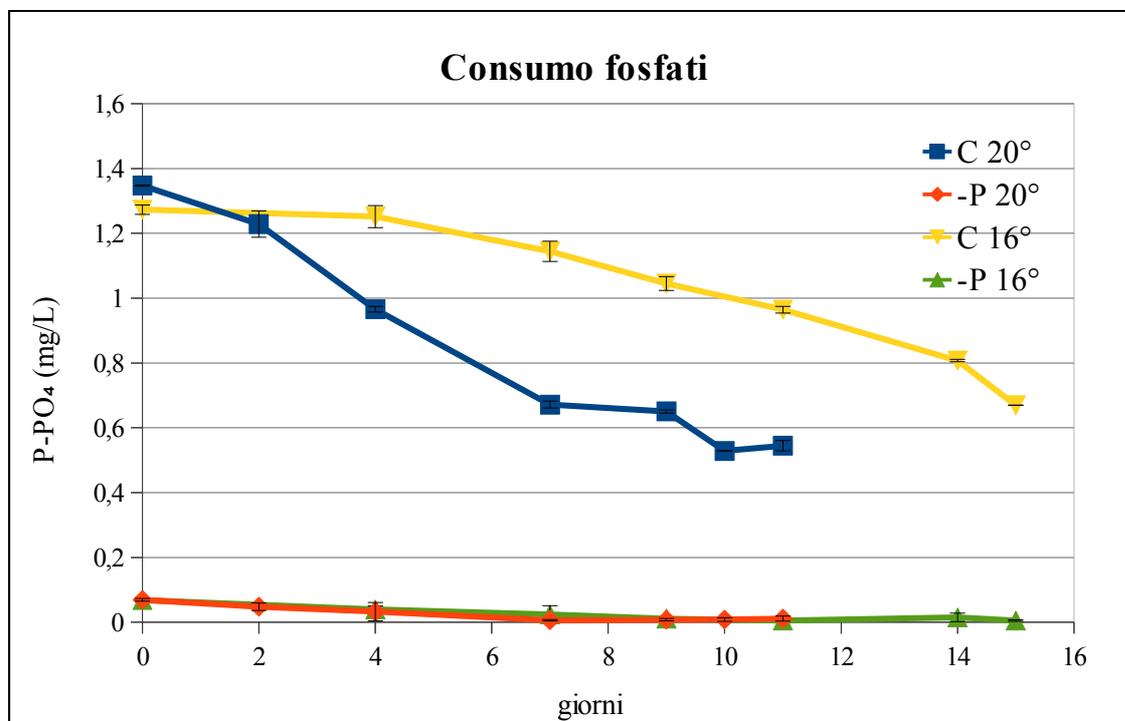


Fig. 52: consumo di fosfati a 20°C (curve blu e arancio) e 16°C (curve gialla e verde)

Dalla Fig. 51 si può notare come le colture cresciute a 16°C presentino un consumo di nitrati più lento rispetto a quelle cresciute a 20°C. Questo supporta quanto detto riguardo al tasso di crescita; le cellule mantenute a 20°C presentano un tasso di crescita specifico decisamente maggiore che si traduce in un uptake di nutrienti più rapido durante la crescita esponenziale.

Allo stesso tempo non vi sono differenze evidenti tra le due condizioni di rapporto N/P nel consumo di nitrati. Probabilmente infatti la differenza riscontrata nell'esperimento preliminare a 16°C era dovuta ad un ampio margine di errore causato dalla alta diluizione apportata per l'analisi.

E' inoltre interessante notare come tutte le colture analizzate non arrivano al consumo completo dei nitrati presenti in coltura. Questo è in accordo con quanto detto per l'esperimento preliminare, ossia che la specie studiata non necessita di alte concentrazioni di nitrati per raggiungere abbondanze cellulari consistenti.

La Fig. 52, mostra la progressiva diminuzione nella concentrazione dei fosfati nel terreno di coltura. Mentre nelle colture con un alto rapporto N/P (colture in carenza) i fosfati sono consumati rapidamente, le colture di controllo presentano due diversi andamenti di consumi a seconda della temperatura a cui sono sottoposte. In quelle mantenute a 16°C si osserva il costante assorbimento di fosfati da parte delle colture, che utilizzano queste sostanze per la crescita. L'andamento del consumo dei fosfati per le colture a 20°C presenta un pattern ben diverso; le curve sono caratterizzate da un veloce utilizzo nei primi giorni, per poi rallentare dal giorno 7 in avanti, sebbene non raggiungano il consumo completo.

Di seguito sono riportati i grafici di azoto e fosforo cellulari (Figg.53 e 54) nelle colture ad entrambe le temperature, misurati l'ultimo giorno.

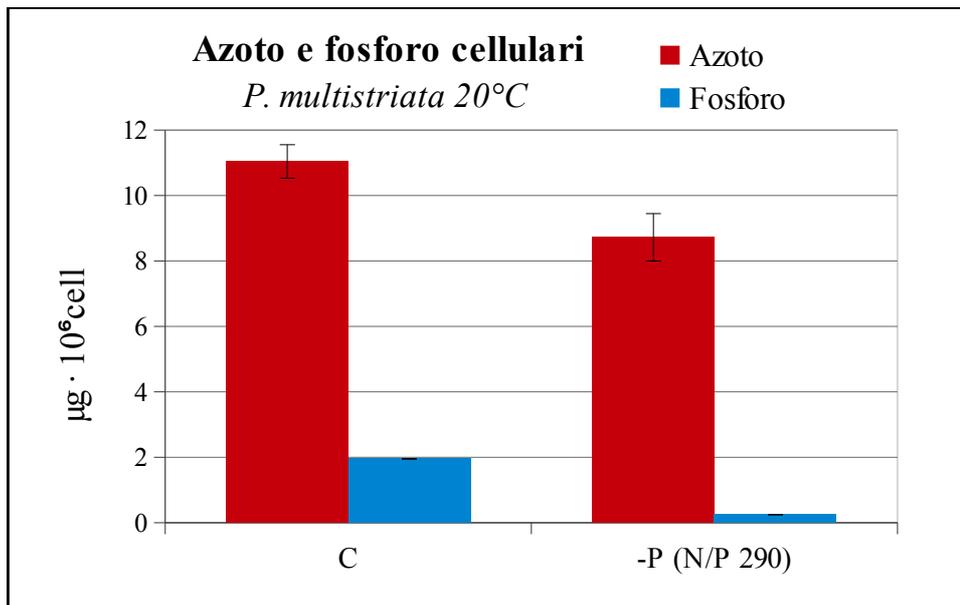


Fig. 53: concentrazioni di azoto e fosforo cellulari a 20°C misurati l'ultimo giorno di coltura

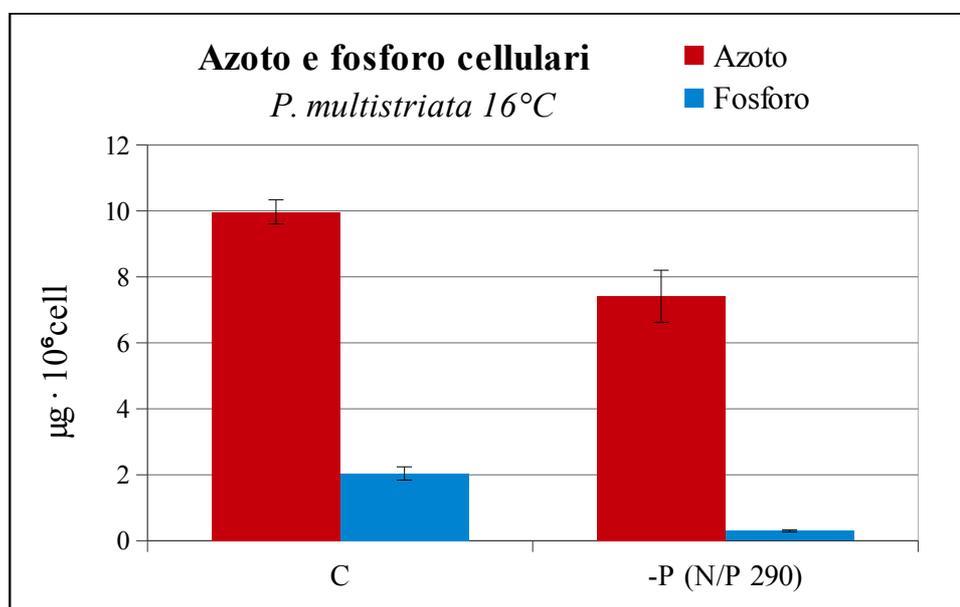


Fig. 54: concentrazioni di azoto e fosforo cellulari a 16°C misurati l'ultimo giorno di coltura

Ad entrambe le temperature applicate le cellule di *P. multistriata* sembrano assimilare una quantità maggiore di azoto in condizioni di rapporto basso N/P. Quindi in condizioni di carenza di fosforo le cellule non sembrano assumere più azoto se questo è fornito in eccesso rispetto alle concentrazioni di fosforo. Il rapporto di concentrazione cellulare tra azoto e fosforo (Tab. 55) risulta infatti maggiore, come precedentemente visto nell'esperimento preliminare, in condizioni di carenza di fosforo. Inoltre tale rapporto è leggermente maggiore nelle colture mantenute a 20°C, a dimostrazione del fatto che ad una temperatura a loro più idonea le cellule di *P. multistriata* hanno una assimilazione di nutrienti più efficiente.

Condizioni di coltura		Rapporto N/P cellulare ($\mu\text{g} \cdot 10^6 \text{ cell}$)
Preliminare 16°C	C	6,30
	-P (N/P 116)	14,70
20°C	C	5,65
	-P (N/P 290)	35,76
16°C	C	4,90
	-P (N/P 290)	25,26

Tab. 55: rapporti di concentrazione cellulare N/P nelle varie condizioni

4.3.5 Quantificazione di acido domoico intracellulare

La quantificazione del contenuto di acido domoico cellulare delle colture di *P. multistriata*, ad entrambe le temperature, è stata effettuata solo l'ultimo giorno. Le colture a 16°C sono state raccolte al giorno 16, mentre la raccolta di quelle a 20°C è stata anticipata al giorno 11, poiché queste ultime erano già in crescita rallentata dal giorno 4.

I risultati relativi al contenuto di DA in tutte le colture analizzate per questa tesi sono riportate in tabella 56, e sono confrontati in Fig. 57.

Colture		DA (pg/cell)
Luglio 2012		<LOQ
16°C	C	0,00562
	-P (N/P 116)	0,00522
20°C	C	<LOQ
	-P (N/P 290)	<LOQ
16°C	C	<LOQ
	-P (N/P 290)	0,00138

Tab. 56: acido domoico (DA) contenuto nelle differenti colture allestite per *P. multistriata*; i valori sono riferiti alla somma di acido domoico ed epi-domoico.

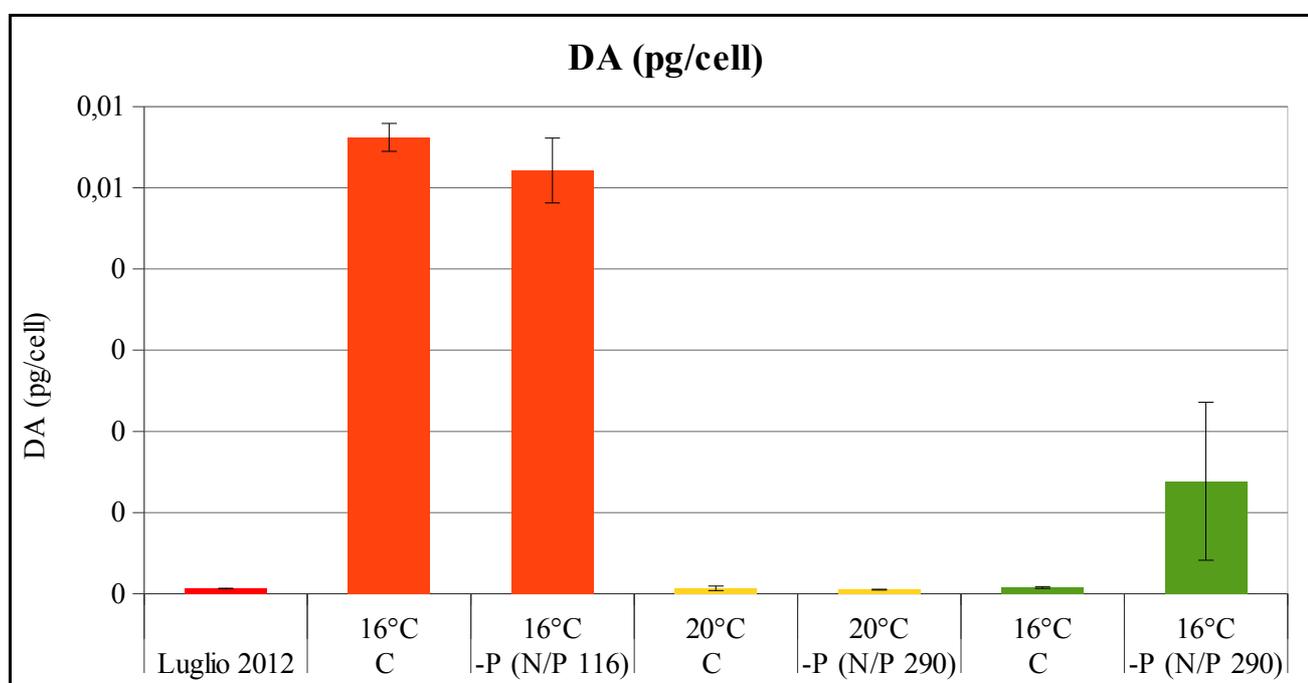


Fig. 57: confronto tra le quantità di DA prodotte alle varie condizioni

L'analisi con LC-MS rivela la presenza di tossina in tutte le colture, ma la quantificazione in funzione degli standard scelti è possibile solo per alcune colture. L'unico valore di DA cellulare considerato significativamente diverso, per quanto riguarda le colture di questo secondo esperimento, è quello della coltura in carenza di fosforo a 16°C (ANOVA ad una via, Newman-Keuls test, $p < 0,001$), che in ogni caso presentava una concentrazione molto più bassa di DA, rispetto alle colture

dell'esperimento preliminare, pari a 0,0013 pg/cell.

Come è noto in bibliografia, la specie in questione può produrre acido domoico o meno; i ceppi della Nuova Zelanda, ad esempio, non hanno portato a valori positivi (Rhodes et al., 2000); il ceppo isolato dal Golfo di Napoli, invece, è risultato tossico (Orsini et al., 2002). Il contenuto della tossina registrato dalle nostre analisi è risultato basso rispetto ai valori riscontrati in altre *Pseudo-nitzschia* spp tossiche (Bates, 1998) ma dello stesso ordine di grandezza di quelli rilevati da Orsini et al. (2002) nei ceppi di *P. multistriata* del Golfo di Napoli.

L'aumento della produzione di tossina nelle colture cresciute alla temperatura più bassa non trova molti riscontri in letteratura in quanto non sono molte le specie su cui sono stati effettuati studi paragonabili a questo. È significativo, però, il fatto che la maggior parte dei bloom tossici dovuti al genere *Pseudo-nitzschia*, si siano verificati soprattutto nei mesi autunnali o invernali in varie parti del mondo.

Per quanto riguarda la carenza di fosforo, la presenza di maggiori quantità di DA in colture carenti di questo nutriente è stata precedentemente riportata da Pan et al. (1996a) e può essere spiegabile dal fatto che le cellule in condizioni limitanti non riescano più a dividersi e l'energia acquisita tramite fotosintesi venga dissipata tramite la produzione di metaboliti secondari quali l'acido domoico (Pan et al. 1996a).

In conclusione, dai dati ottenuti in entrambi gli esperimenti svolti per questa tesi, la presenza contemporanea di due fattori di stress non sembra aver determinato dei risultati di tossicità molto chiari, probabilmente per la difficoltà da parte di questa specie di dare risposte riproducibili di crescita al variare delle condizioni applicate in coltura.

Per altre specie è stato infatti visto che la produzione di tossine può dipendere notevolmente dalla velocità di crescita e da altri fattori come ad esempio la durata della fase stazionaria. In questo studio invece, sia le colture a 16°C che quelle a 20°C, eseguite in tempi diversi, hanno mostrato risultati di tossicità differenti.

5 CONCLUSIONI

Nel presente studio sono state analizzate crescita, assimilazione di nutrienti e produzione di tossina da parte della diatomea *P. multistriata*, isolata nell'Adriatico Nord-Occidentale, in funzione di temperatura e rapporto tra azoto e fosforo disciolti.

La microalga è risultata crescere bene in colture batch, raggiungendo le stesse abbondanze sia a 20 che a 16°C. Nonostante questo si è potuto notare come a 20°C la crescita sia decisamente più veloce e di conseguenza anche il consumo di nutrienti, mentre a 16°C la diatomea presenta una fase esponenziale prolungata di qualche giorno. Questo fa ipotizzare che il range preferenziale di temperatura per *P. multistriata* sia attorno ai 20°C, in accordo con il fatto che la fioritura nelle acque del Nord Adriatico si è presentata in tarda estate.

Al contrario della maggior parte delle diatomee, *P. multistriata* non ha dimostrato di necessitare di alte concentrazioni di nutrienti per poter raggiungere abbondanze cellulari consistenti. Il consumo di macronutrienti in coltura è risultato ancora più basso e lento alla temperatura di 16°C.

L'ammontare di azoto per cellula il giorno della raccolta è risultato minore nelle colture cresciute in condizioni di carenza di fosforo, inoltre il rapporto C:N è risultato simile nelle due condizioni di nutrienti; questo fa ipotizzare che la citata diatomea assuma poco azoto quando è fornito in eccesso rispetto ai suoi bisogni. In mare risulta quindi importante considerare soprattutto il rapporto tra i macronutrienti in relazione alle fioriture microalgali.

L'alga isolata è risultata produttrice di acido domoico, sebbene in quantità decisamente basse. La produzione di acido domoico è risultata maggiore in condizioni di temperatura più basse, rispetto alla temperatura rilevabile al momento e luogo di isolamento. Al momento dell'isolamento la quantità di tossina nelle cellule è risultata molto bassa, tale da non causare un evento di intossicazione nell'uomo. Al contrario se la diatomea è posta in condizioni di coltura a temperature stressanti viene prodotta una maggior quantità di DA. Questo risultato è stato osservato in entrambi gli esperimenti allestiti per questa tesi, ed era già stato precedentemente osservato da Pistocchi et al.

(2012), dimostrando una effettiva correlazione tra bassa temperatura e produzione di DA per la specie *P. multistriata*. L'unica eccezione si riscontra nel caso della coltura di controllo allestita per il secondo esperimento, la quale seppure mantenuta alla stessa temperatura di 16°C, non presenta le concentrazioni di DA rilevate nell'esperimento preliminare. Questo è difficilmente spiegabile tuttavia è da rilevare che le risposte di crescita e tossicità del genere *Pseudo-nitzschia* in coltura sono difficilmente riproducibili, e possono dipendere da svariati parametri, come il tasso di crescita, la durata della fase stazionaria o la presenza di batteri.

La produzione di tossina è stata inoltre maggiore in condizioni di media carenza di fosforo (5 µM), applicate nell'esperimento preliminare. Questo è opposto a quanto dimostrato da Sun et al. (2011) dove un ceppo di *P. multiseriis* è risulato produrre 30-40 volte più DA con concentrazioni limitanti di fosforo (0,5 µM) invece che con concentrazioni medie di fosforo (20 µM).

In questo lavoro mentre nelle colture dell'esperimento preliminare il fattore condizionante la produzione di DA è stata la temperatura, nel secondo esperimento alla stessa bassa temperatura ciò che innesca una maggior produzione di DA sembra essere la limitante concentrazione di fosforo. Tuttavia non è possibile affermare che la concentrazione 5 µM di fosforo, applicata nell'esperimento preliminare e opposta alla concentrazione 2 µM applicata nel secondo esperimento, sia responsabile dell'avvenuta maggior produzione di DA, in quanto possono essere intervenuti altri fattori come ad esempio la progressiva perdita di tossicità in coltura della microalga. E' noto infatti, (Bates, 1998), che la tossicità può declinare esponenzialmente dopo un lungo periodo in coltura, a causa della riduzione del volume della cellula.

In questo caso il biovolume delle colture preliminari risulta leggermente maggiore ma non tale da spiegare una così alta differenza di tossicità tra i due esperimenti.

E' stata inoltre dimostrata una effettiva produzione di acido domoico durante la fase di crescita stazionaria per le colture di *P. multistriata* allestite, sebbene non sia stato possibile il confronto con le altre fasi di crescita. Ulteriori studi sono necessari al fine di valutare il momento di maggior produzione di DA in coltura da parte della suddetta diatomea. Questo sarà possibile solo grazie all'allestimento di colture con volumi di acqua decisamente maggiori a quelli applicati in questo esperimento, al fine di ottenere

un adeguato numero di cellule, in tutte le fasi di crescita, tale da rilevare la presenza della tossina.

Durante questo studio non è stato possibile valutare un eventuale rilascio di tossina nel medium da parte delle cellule, in quanto la salinità dell'acqua interferisce con l'analisi in LC-MS. Sarebbe opportuno mettere a punto un metodo di concentrazione e desalinizzazione dell'acqua di mare per l'analisi di DA disciolto. Tale approfondimento può essere realizzato con riferimento al lavoro svolto da Wang et al. (2012).

6 BIBLIOGRAFIA

- Amato, A., Orsini, L., D'Alelio, D., Montresor, M., 2005. Life cycle, size reduction patterns, and ultrastructure of the pennate planktonic diatom *Pseudo-nitzschia delicatissima* (Bacillariophyceae). *J. Phycol.* 41, 542–556.
- Amato, A., Ludeking, A., Kooistra, W.H.C.F., 2010. Intracellular domoic acid production in *Pseudo-nitzschia multistriata* isolated from the Gulf of Naples (Tyrrhenian Sea Italy). *Toxicon* 55, 157–161.
- Andersen, R.A., 1992. Diversity of eukaryotic algae. *Biodiversity and Conservation* 1, 267- 292.
- Anderson, D.M., Glibert, P.M., Burkholder, J.M., 2002. Harmful algal blooms and eutrophication: Nutrient sources, composition, and consequences. *Estuaries* 25, 704–726.
- Anderson, C.R., Brzezinski, M.A., Washburn, L., Kudela, R., 2006. Circulation and environmental conditions during a toxigenic *Pseudo-nitzschia australis* bloom in the Santa Barbara Channel, California. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 327, 119–133.
- Baden, H. A., Sarma, S. P., Kapust, R. B., Byrd, R. A. & Waugh, D. S. (1998). *J Biol Chem* 273:17109–17114.
- Bates, S.S., de Freitas, A.S.W., Milley, J.E., Pocklington, R., Quilliam, M.A., Smith, J.C., Worms, J., 1991. Controls on domoic acid production by the diatom *Nitzschia pungens* f. multiseries in culture: nutrients and irradiance. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 48, 1136–1144.
- Bates, S.S., Worms, J., Smith, J.C., 1993. Effects of ammonium and nitrate on growth and domoic acid production by *Nitzschia pungens* in batch culture. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 50, 1248–1254.

- Bates, S.S., 1998. Ecophysiology and metabolism of ASP toxin production. In: Anderson, D.M., Cembella, A.D., Hallegraeff, G.M. (Eds.), *Physiological Ecology of Harmful Algal Blooms*. Springer-Verlag, Berlin, pp. 405–426.
- Bates S.S., Hiltz M.F. & LE' Ger C. 1999. Domoic acid toxicity of large new cells of *Pseudo-nitzschia multiseriata* resulting from sexual reproduction. In: *Proceedings of the Sixth Canadian Workshop on Harmful Marine Algae* (Ed. by J.L. Martin & K. Haya), pp. 21–26. Canadian Technical Report of Fisheries and Aquatic Sciences 2261.
- Bates, S.S., Trainer, V.L., 2006. The Ecology of Harmful Diatoms. In: *Ecological Studies*, Vol. 189. *Ecology of Harmful Algae* (ed:Granéli,E., e Jefferson T. Turner); Springer-Verlag Berlin Heidelberg. pp. 81-93.
- Boni L., Ceredi A., Guerrini F., Milandri A., Pistocchi R., Poletti R., Pompei M., 2001. Toxic *Protoceratium reticulatum* (Peridinales, Dinophyta) in the North-Western Adriatic Sea (Italy) in: *Harmful Algal Blooms 2000*. Hallegraeff G.M., Blackburn S.I., Bloch C.J., Lewis R.J. (eds.). Intergov. Oceangr. Comm., Paris 137-40
- Boni, L., Pistocchi, R., Guerrini, F., Cangini, M., Pompei, M., Cucchiari, E., Romagnoli, T., 2005. *Microalghe tossiche del Medio ed Alto Adriatico- Guida per Acquacoltori e Operatori Sanitari*. Casa editrice, Fernandel, Ravenna.
- Caroppo C., Congestri R., Bracchini L., Albertano P., 2005. On the presence of *Pseudo-nitzschia calliantha* Lundholm, Moestrup et Hasle and *Pseudo-nitzschia delicatissima* (Cleve) Heiden in the Southern Adriatic Sea (Mediterranean Sea, Italy). *J. Plank. Res.*, 27: 763-774.
- Ciminiello P., Dell'Aversano C., Fattorusso E., Forino M., Magno S., Tartaglione L., Cangini M., Pompei M., Guerrini F., Boni L., Pistocchi R., 2006. Toxin profile of *Alexandrium ostenfeldii* (Dinophyceae) from the Northern Adriatic Sea revealed by liquid chromatography-mass spectrometry. *Toxicon* 47: 597-604.

- Cusack, C.K., Bates, S.S., Quilliam, M.A., Patching, J.W., Raine, R., 2002. Confirmation of domoic acid production by *Pseudo-nitzschia australis* (Bacillariophyceae) isolated from Irish waters. *J. Phycol.* 38: 1106–1112.
- Davidovich, N.A., Bates, S.S., 1998. Sexual reproduction in the pennate diatoms *Pseudo-nitzschia multiseriata* and *P. pseudodelicatissima* (Bacillariophyceae). *J. Phycol.* 34: 126–137.
- Doucette G.J., King K.L., Thessen A.E. & Dortch Q. 2008. The effect of salinity on domoic acid production by the diatom *Pseudo-nitzschia multiseriata*. *Nova Hedwig, Beiheft 133*: 31–46.
- Fehling J., Davidson K., Bolch C.J. & Bates S.S. 2004. Growth and domoic acid production by *Pseudo-nitzschia seriata* (Bacillariophyceae) under phosphate and silicate limitation. *Journal of Phycology* 40: 674–683.
- Fehling, J., Davidson, K., Bates, S.S., 2005. Growth dynamics of non-toxic *Pseudonitzschia delicatissima* and toxic *P. seriata* (Bacillariophyceae) under simulated spring and summer photoperiods. *Harmful Algae* 4: 763–769.
- Fryxell G.A., Reap M.E. & Valencic D.L., 1990. *Nitzschia pungens* Grunow f. *multiseriata* Hasle: observations of a known neurotoxic diatom. *Nova Hedwigia, Beiheft 100*: 171–188.
- Ghirardelli E., (1981), *il nostro universo La vita nelle acque*, Utet
- Hache' S., 2000. Determination d'un signal (pheromone) produit par la diatome' e toxique *Pseudo-nitzschia multiseriata* ayant un role dans la communication sexuelle. Honours Thesis. Universite' de Moncton, Moncton, NB. 29 pp.
- 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.
- Hallegraeff G.M., 2010. Ocean climate change, phytoplankton community

responses, and Harmful Algal Blooms: a formidable predictive challenge. *J. Phycol.*, 46: 220-235.

- Hampson DR, Wenthold RJ., 1988. A kainic acid receptor from frog brain purified using domoic acid affinity chromatography. *J Biol Chem* 263: 2500-2505
- Hangström J.A., Granéli E., Moreira M.O.P., Odebrecht C., 2011. Domoic acid production and elemental composition of two *Pseudo-nitzschia multiseries* strains, from the NW and SW Atlantic Ocean, growing in phosphorus- or nitrogen-limited chemostat cultures. *Journal of plankton research* 33: 297-308.
- Hasle G.R., 1995. *Pseudo-nitzschia pungens* and *P. multiseries* (Bacillariophyceae): nomenclatural history, morphology and distribution. *Journal of Phycology* 31: 428-435.
- Heisler J., Glibert P.M., Burkholder J.M., Anderson D.M., Cochlan W., Dennison W.C., Dortch Q., Gobler C.J., Heil C.A., Humphries E., and others. 2008. Eutrophication and harmful algal blooms: A scientific consensus. *Harmful Algae* 8: 3–13.
- Hiltz M., Bates S.S., Kaczmarska I., 2000. Effect of light: dark cycles and cell apical length on the sexual reproduction of the pennate diatom *Pseudo-nitzschia multiseries* (Bacillariophyceae) in culture. *Phycologia* 39: 59–66.
- Honsell G., Dell'Aversano C., Vuerich F., Sosa S., Tartaglione L., Tubaro A., 2006. *Pseudo-nitzschia* and ASP in the Northern Adriatic Sea. 12th International Conference on Harmful Algae; 4-8 Settembre 2006, Copenhagen, Denmark.
- Hustedt, F., 1958. Diatomeen aus der Antarktis und dem Südatlantik. *Deutsche antarktische Expedition, 1938/39* 2, 103-191.
- Iverson F., Truelove J., Nera E., Tryphonas L., Cambell J., Lok E., 1989. Domoic acid poisoning and mussel-associated intoxication: preliminary investigations into the response of mice and rats to toxic mussel extract. *Food and Chemical Toxicology* 27: 377-384.

- Jeffery B., Barlow T., Moizer K., Paul S., Boyle C., 2004. Amnesic shellfish poison. *Food and Chemical Toxicology* 42, 545-557
- Klein C., Claquin P., Bouchart V., Le Roy B., Veron B., 2010. Dynamics of *Pseudonitzschia* spp. and domoic acid production in a macrotidal ecosystem of the Eastern English Channel (Normandy, France). *Harmful Algae* 9: 218–226.
- Kudela R., Cochlan W., Roberts A., 2004a. Spatial and temporal patterns of *Pseudonitzschia* spp. in central California related regional oceanography. In: Steidinger, K.A., Landsberg, J.H., Tomas, C.R., Vargo, G.A. (Eds.), *Harmful Algae 2002*. Florida and Wildlife Conservation Commission. Florida Institute of Oceanography, and Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO, 347–349.
- Kudela R., Roberts A., Armstrong M., 2004b. Laboratory analyses of nutrient stress and toxin production in *Pseudo-nitzschia* spp. from Monterey Bay, California. In: Steidinger, K.A., Landsberg, J.H., Tomas, C.R., Vargo, A.G.A. (Eds.), *Harmful Algae 2002*. Florida and Wildlife Conservation Commission, Florida Institute of Oceanography, Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO, St. Pete Beach, FL, USA, 136–138.
- Lelong L. A., Hegaret H., Soudant P. and S. S. Bates 2012. *Pseudo-nitzschia* (Bacillariophyceae) species, domoic acid and amnesic shellfish poisoning: revisiting previous paradigms. *Phycologia* 51, 168–216.
- Lewis N.I., Bates S.S., McLachlan J.L., Smith J.C., 1993. Temperature effects on growth, domoic acid production, and morphology of the diatom *Nitzschia pungens* *P. multiseriata*. In: Smayda, T.J., Shimizu, Y. (Eds.), *Toxic Phytoplankton Blooms in the Sea*. Elsevier Science, New York, NY, 601–606.
- Lundholm N., Moestrup O., Hasle G.R., Hoef-Emden K., 2003. A study of the *Pseudo-nitzschia pseudodelicatissima/cuspidata* complex (Bacillariophyceae): what is *P. pseudodelicatissima*? *J. Phycol.* 39: 797–813.
- Lundholm N., Hansen P.J., Kotaki Y., 2004. Effect of pH on growth and domoic

acid production by potentially toxic diatoms of the genera *Pseudo-nitzschia* and *Nitzschia*. Mar. Ecol. Prog. Ser. 273: 1–15.

- Lundholm, N., 2011. Bacillariophyta. IOC-UNESCO Taxonomic Reference List of Harmful Micro Algae.
- Mafra L.L. JR., Bricelj V.M., Ouellette C., Le'Ger C. & Bates S.S. 2009a. Mechanisms contributing to low domoic acid uptake by oysters feeding on *Pseudo-nitzschia* cells. I. Filtration and pseudofeces production. Aquatic Biology 6: 201–212.
- Martin J.L., Haya K., Burridge L.E., Wildish D.J., 1990. *Nitzschia pseudodelicatissima* — a source of domoic acid in the Bay of Fundy, eastern Canada. Marine Ecology Progress Series 67: 177– 182.
- Masò M., Garcés E. (2006) - Harmful microalgae blooms (HAB); problematic and conditions that induce them. Marine Pollution Bulletin, 53: 620-630.
- Mendez S.M., M. Ferrario, A.O. Cefarelli, 2012. Description of toxigenic species of the genus *Pseudo-nitzschia* in coastal waters of Uruguay: morphology and distribution. Harmful Algae 19: 53-60.
- Mos L. 2001. Domoic acid: a fascinating marine toxin. Environmental Toxicology and Pharmacology 9: 79–85.
- Munday R., Holland P.T., McNabb P., Selwood A.I. & Rhodes L.L. 2008. Comparative toxicity to mice of domoic acid and isodomoic acids A, B and C. Toxicon 52: 954–956.
- National Research Council, 2000. Clean Coastal Waters – Understanding and reducing the effects of nutrient pollution. National Academy Press, Washington, D.C.
- Nixon S.W., 1995. Coastal marine eutrophication: A definition, social causes, and future concerns. Ophelia 41: 199–219.
- Orsini L., Sarno D., Procaccini G., Poletti R., Dahlmann J., Montresor M.,

2002. Toxin *Pseudo-nitzschia multistriata* (Bacillariophyceae) from the Gulf of Naples: morphology, toxin analysis and phylogenetic relationships with other *Pseudo-nitzschias* specie. *Eur. J. Phycol.*, 37: 247-257.
- Orsini L., Procaccini G., Sarno D., Montresor M., 2004. Multiple rDNA ITS-types within the diatom *Pseudo-nitzschia delicatissima* (Bacillariophyceae) and their relative abundances across a spring bloom in the Gulf of Naples. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 271: 87–98.
 - Pan Y., Subba Rao D. V. and Mann K. H. (1996a). Changes in domoic acid production and cellular chemical composition of the toxigenic diatom *Pseudo-nitzschia multiseriata* under phosphate limitation. *J. Phycol.*, 32: 371–381.
 - Pan Y., Bates S.S. & Cembella A.D. 1998. Environmental stress and domoic acid production by *Pseudo-nitzschia*: a physiological perspective. *Natural Toxins* 6: 127–135.
 - Pan Y.L., Parsons M.L., Busman M., Moeller P.D.R., Dortch Q., Powell C.L. & Douchette G.J. 2001. *Pseudo-nitzschia* sp. cf. *pseudodelicatissima* – a confirmed producer of domoic acid from the northern Gulf of Mexico. *Marine Ecology Progress Series* 220: 83–92.
 - Penna A., Casabianca S., Perini F., Bastianini F., Riccardi E., Pigozzi S., Scardi M., 2012. Toxic *Pseudo-nitzschia* spp. in the northwestern Adriatic Sea: characterization of species composition by genetic and molecular quantitative analyses. *J. Plankton Res* 0: 1–15.
 - Peragallo H., Peragallo M. 1987-1908. Diatomées marines de France et des districts maritimes voisins. Micrographe-Editeur, Grezsur Loig.
 - Perl T.M., L. Bedard, T. Kosatsky, J.C. Hockin, E.C Todd, R.S Remis, 1990. An outbreak of toxic encephalopathy caused by eating mussels contaminated with domoic acid. *New England Journal of Medicine* 322: 1775-1780.
 - Pistocchi R., Cangini M., Totti C., Urbani R., Guerrini F., Romagnoli T., Sist P., Palamidesi S., Boni L., Pompei M., 2005. Relevance of the Dinoflagellate

Gonyaulax fragilis in mucilage formations of the Adriatic Sea. *Sci Tot Env* 307-316

- Pistocchi R. et al., 2012. Toxin Levels and Profiles in Microalgae from the North-Western Adriatic Sea—15 Years of Studies on Cultured Species. *Mar. Drugs* 10:140-162.
- Quilliam M. A., Xie M. and Hardstaff W. R., 1995. Rapid extraction and cleanup for liquid chromatographic determination of domoic acid in unsalted seafood. *J. AOAC Int.* 78: 543–554.
- Reynolds C. (2007) - Chapter 8. Phytoplankton ecology and aquatic ecosystems mechanisms and management. In: *Ecology of phytoplankton*. Cambridge University Press, Cambridge: 387- 436.
- Rhodes L., White D., Syhre M., Atkinson M., 1996. *Pseudo-nitzschia* species isolated from New Zealand coastal waters: domoic acid production in vitro and links with shellfish toxicity. In: Yasumoto, T., Oshima, Y., Fukuyo, Y. (Eds.), *Harmful and Toxic Algal Blooms*, Intergov. Oceanogr. Comm. UNESCO, Paris, 155–158.
- Rhodes L.L., Adamson J., Scholin C., 2000. *Pseudo-nitzschia multistriata* (Bacillariophyceae) in New Zealand. *N Zeal. J. Mar. Freshwater Res.* 34: 463–467.
- Rines J.E.B., Donaghay P.L., Deksheniaks M.M., Sullivan J.M., Twardowski M.S., 2002. Thin layers and camouflage: hidden *Pseudo-nitzschia* spp. (Bacillariophyceae) populations in a fjord in the San Juan Islands, Washington, USA. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 225: 123–137.
- Sahraoui I., Grami B., Bates S.S., Bouchouicha D., Chikhaoui M.A., Mabrouk H.H., Hlaili A.S., 2012. Response of potentially toxic *Pseudo-nitzschia* (Bacillariophyceae) populations and domoic acid to environmental conditions in a eutrophied, SW Mediterranean coastal lagoon (Tunisia). *Estuarine, coastal and shelf science* 102-103:95-104.

- Santiago-Morales I.S., Garcia-Mendoza E., 2011. Growth and domoic acid content of *Pseudo-nitzschia australis* isolated from northwestern Baja California, Mexico, cultured under batch conditions at different temperatures and two Si:NO₃ ratios. *Harmful Algae* 12: 82–94.
- Sarno D., Dahlman J., 2000. Production of domoic acid in another species of *Pseudo-nitzschia*: *P. multistriata* in the Gulf of Naples (Mediterranean Sea). *Harmful Algae News (IOC)* 21, p.5
- Sawant P.M., Weare B.A., Holland P.T., Selwood A.I., King K.L., Mikulski C.M., Doucette G.J., Mountfort D.O. & Kerr D.S. 2007. Isodomoic acids A and C exhibit low KA receptor affinity and reduced in vitro potency relative to domoic acid in region CA1 of rat hippocampus. *Toxicon* 50: 627–638.
- Sawant P.M., Tyndall J.D.A., Holland P.T., Peake B.M., Mountfort D.O. & Kerr D.S. 2010. In vivo seizure induction and affinity studies of domoic acid and isodomoic acids-D, -E and -F. *Neuropharmacology* 59: 129–138.
- Sierra Beltran A., Palafox-Uribe M., Grajales-Montiel J., Cruz-Villacorta A., Ochoa J.L., 1997. Sea bird mortality at Cabo San Lucas, Mexico: evidence that toxic diatom blooms are spreading. *Toxicon* 35: 447–453.
- Sournia A., 1995. Red tide and toxic marine phytoplankton of the world ocean: an inquiry into biodiversity. In: P. Lassus, G. Arzul, E. Erard, P. Gentien, C. Marcaillou (eds.), *Harmful marine algal blooms*. Paris: Lavoisier, Intercept Ltd, pp. 103-112.
- Takano H. (1993). Marine diatom *Nitzschia multistriata* sp. nov. common at inlets of Southern Japan. *Japanese Journal of Diatomology* 8: 39-41.
- Takano H. 1995. *Pseudo-nitzschia multistriata* (Takano) Takano, a new combination for the pennate diatom *Nitzschia multistriata* Takano. *Diatom, The Japanese Journal of Diatomology* 10: 73–74.

- Tasker R.A., Connel B.J., Strain S.M., 1991. Pharmacology of systemically administered domoic acid in mice. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* 69: 378-382.
- Teitelbaum J., Carpenter S. & Cashman N.R. 1990. Neurologic sequelae after ingestion of mussels contaminated with domoic acid. *New England Journal of Medicine* 323: 1632–1633.
- Thessen A.E., Bowers H.A. & Stoecker D.K. 2009. Intra- and interspecies differences in growth and toxicity of *Pseudo-nitzschia* while using different nitrogen sources. *Harmful Algae* 8: 792–810.
- Thompson S., 2000. The role of bacteria in mediating the sexual reproduction of the domoic-acid-producing diatom *Pseudo-nitzschia multiseriis* (Hasle) Hasle. Special Topics Thesis. Mount Allison University, Sackville, NB. 49 pp.
- Trainer V.L., Hickey B.M., Horner R.A., 2002. Biological and physical dynamics of domoic acid production off the Washington coast. *Limnol. Oceanogr.* 47: 1438– 1446.
- Trainer V.L., Wells M.L., Cochlan W.P., Trick C.G., Bill B.D., Baugh K.A., Beall B.F., Herndon J., Lundholm N., 2009b. An ecological study of a massive bloom of toxigenic *Pseudo-nitzschia cuspidata* off the Washington State coast. *Limnol. Oceanogr.* 54: 1461–1474.
- Trainer V.L., Pitcher G.C., Reguera B., Smayda T.J., 2010. The distribution and impacts of harmful algal bloom species in eastern boundary upwelling systems. *Prog. Oceanogr.* 85: 33–52.
- Trainer V.L., Bates S.S., Lundholm N., Thessen A.E., Adams N.G., Cochlan W.P. & Trick C.G. 2012. *Pseudo-nitzschia* physiological ecology, phylogeny, toxicity, monitoring and impacts on ecosystem health. *Harmful Algae*.
- Tryphonas L., Truelove J., Iverson F., 1990b. Acute parenteral neurotoxicity of domoic acid in cynomolgus monkeys (*M. fascicularis*). *Toxicology and Pathology* 18: 297-303.

- Tweddle J.F., Strutton P.G., Foley D.G., O'Higgins L., Wood A.M., Scott B., Everroad R.C., Peterson W.T., Cannon D., Hunter M., Forster Z., 2010. Relationships among upwelling, phytoplankton blooms, and phycotoxins in coastal Oregon shellfish. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 405: 131–145.
- Vasas V., Lancelot C., Rousseau V., Jordan F., 2001 - Eutrophication and overfishing in temperate nearshore pelagic food webs: a network perspective. *Marine Ecology - Progress Series*, 336: 1-14.
- Vila M., Garcés E., Masò M., 2001. Potentially toxic epiphytic dinoflagellate assemblages on macroalgae in the NW Mediterranean. *Aquat. Microb. Ecol.* 26: 51-60.
- Walsh J.J., Tomas C.R., Steidinger K.A., Lnese J.M., Chen F.R., Weisberg R.H., Zheng L., Landsberg J.H., Vargo G.A., Heil C.A., 2011. Imprudent fishing harvests and consequent trophic cascades on the West Florida shelf over the last half century: A harbinger of increased human deaths from paralytic shellfish poisoning along the south eastern United States, in response to oligotrophication? *Continental Shelf Research*, 31: 891-911.
- Wang Z., Maucher-Fuquay J., Fire S. E., Mikulski C. M., Haynes B., Doucette G. J., Ramsdell J. S., 2012. Optimization of solid-phase extraction and liquid chromatography–tandem mass spectrometry for the determination of domoic acid in seawater, phytoplankton, and mammalian fluids and tissues. *Analytica Chimica Acta*, 715: 71– 79.
- Wekell J.C., Gauglitz E.J., Jr. Barnett H.J., Hatfield C.L., Eklund M., 1994. The occurrence of domoic acid in razor clams (*Siliqua patula*), Dungeness crab (*Cancer magister*), and anchovies (*Engraulis mordax*). *Journal of Shellfish Research* 13: 587–593.
- Zingone A., & Enevoldsen H.O., 2000. The diversity of harmful algal blooms: a challenge for science and management. *Ocean and Coastal Management* 43: 725–748.
- Zingone A., Siano R., D'Alelio D., Sarno D., 2006. Potentially toxic and

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

7 RINGRAZIAMENTI

In primo luogo vorrei ringraziare la Prof.ssa Rossella Pistocchi per avermi fatto scoprire un campo di ricerca veramente affascinante e per avermi proposto, fin dall'inizio, progetti nuovi (tirocinio, tesi triennale e magistrale) riuscendo a capire i miei interessi ed indirizzandomi verso di essi. Lo stesso vale per tutti i componenti del laboratorio di algologia, a cominciare dalla mia correlatrice Dr.ssa Franca Guerrini per avermi preso sotto la sua ala ed avermi insegnato tanto. Grazie a Laura, Giulia, Silvana, Matilde e Flavio per avermi sempre consigliato ed avermi fatta sentire sempre parte del gruppo. Grazie anche ad Adriano, che con la sua spontaneità mi ha spesso riportato al sorriso.

Ringrazio anche tutto lo staff del Centro Ricerche Marine di Cesenatico per l'aiuto con le analisi chimiche, ed in particolare grazie alla mia correlatrice esterna Elena Riccardi che mi ha sempre spinto all'ottimismo.

