

UNIVERSITA' DI BOLOGNA

SCUOLA DI SCIENZE

Corso di laurea specialistica in BIOLOGIA MARINA

**Struttura filogenetica della comunità batterica  
associata ad *Ostreopsis cf. ovata* in colture batch e  
dinamiche di crescita**

Tesi di laurea in: Ecologia Microbica Marina

Relatore

Prof.ssa Silvana Vanucci

Presentata da

Simone Giani

Correlatore

Dott.re Flavio Guidi

(III sessione)

Anno Accademico 2013/2014



*"Alla mia amata nonna Piera...  
che tu possa sempre essere orgogliosa di me"*



## Indice

<b>1-PREMESSA E SCOPO DELLA TESI</b> .....	7
<b>2-INTRODUZIONE</b> .....	9
<b>2.1 HABs: Harmful Algal Blooms</b> .....	9
<b>2.2 Specie oggetto dello studio: <i>Ostreopsis cf. ovata</i></b> .....	11
<b>2.3 La famiglia delle palitossine</b> .....	15
<b>2.4 Interazioni batteri-microalghe</b> .....	17
2.4.1 <i>Alcuni aspetti delle associazioni batteri-microalghe</i> .....	18
2.4.2 <i>Principali gruppi tassonomici in associazione con le dinoflagellate tossiche</i> .....	20
2.4.3 <i>Alcuni aspetti delle relazioni batteri-virus</i> .....	23
2.4.3.1 <i>Controllo bottom-up e top down della comunità batterica</i> .....	25
<b>3-MATERIALI E METODI</b> .....	27
<b>3.1 Allestimento delle culture batch</b> .....	27
<b>3.2 Analisi dei macronutrienti</b> .....	29
3.2.1 <i>Determinazione dell'azoto ammoniacale con kit Hach Lange, metodo al reattivo di Nessler</i> .....	29
3.2.2 <i>Determinazione del fosforo reattivo</i> .....	30
3.2.3 <i>Determinazione dell'azoto nitrico</i> .....	31
<b>3.3 Valutazione della crescita algale</b> .....	32
3.3.1 <i>Conteggio e suddivisione in classi dimensionali</i> .....	32
3.3.2 <i>Curva di crescita in colture batch</i> .....	33
<b>3.4 Stima delle abbondanze batteriche e virali totali con colorazione SYBR Gold</b> .....	34
<b>3.5 Stima della frazione batterica altamente attiva tramite doppia colorazione con CTC e DAPI</b> .....	35
<b>3.6 Analisi filogenetica delle comunità batteriche</b> .....	36
3.6.1 <i>Raccolta ed estrazione del DNA batterico</i> .....	36
3.6.2 <i>Quantificazione del DNA</i> .....	37
3.6.3 <i>Amplificazione del DNA batterico</i> .....	37
3.6.4 <i>Purificazione</i> .....	38
3.6.5 <i>Next generation sequencing e analisi bioinformatica delle sequenze</i> .....	39
3.6.6 <i>Analisi downstream sulle comunità batteriche e analisi statistiche</i> .....	41
<b>4-RISULTATI E DISCUSSIONI</b> .....	43
<b>4.1 Nutrienti e rapporto N/P</b> .....	43
<b>4.2 Curve di crescita di <i>Ostreopsis cf. ovata</i> e dimensioni cellulari</b> .....	44
<b>4.3 Curve di crescita dei batteri totali e dei batteri CTC<sup>+</sup></b> .....	46

<b>4.4 Pattern temporale dei virus .....</b>	<b>49</b>
<b>4.5 Analisi molecolare della comunità batterica tramite Ion torrent: struttura filogenetica e dinamiche temporali .....</b>	<b>50</b>
<i>4.5.1 Struttura filogenetica della comunità batterica totale e free living nella coltura madre di O. cf. ovata .....</i>	<i>53</i>
<i>4.5.2 Variazione temporale della comunità batterica associata ad O. cf. ovata nelle diverse fasi di crescita.....</i>	<i>53</i>
<b>5-CONCLUSIONI .....</b>	<b>65</b>
<b>6-BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>67</b>
<b>7-RINGRAZIAMENTI.....</b>	<b>83</b>

## 1-PREMESSA E SCOPO DELLA TESI

Estese fioriture (blooms) attribuibili a dinoflagellate bentoniche tossiche appartenenti al genere *Ostreopsis*, in passato confinate nelle regioni costiere tropicali e subtropicali degli oceani Atlantico, Pacifico, Indiano e del Mar dei Caraibi affette dalla sindrome della ciguatera, sono attualmente osservate anche in regioni temperate quali il Mar Mediterraneo, su areali sempre più vasti e con frequenza ed intensità sempre maggiori. Lungo le aree costiere del Mediterraneo i blooms di *Ostreopsis* sono per la maggior parte originati dalla specie *Ostreopsis cf. ovata*, abitualmente epifita di macroalghe ma in grado di svilupparsi su molteplici substrati come coralli, rocce, sedimenti molli, fanerogame, angiosperme marine e invertebrati in acque riparate e poco profonde, formando biofilms mucilluginosi di color brunastro. Cellule di *O. cf. ovata* sono spesso ritrovate anche in campioni planctonici dove a volte raggiungono abbondanze considerevoli in seguito alla ri-sospensione dal substrato bentonico alla colonna d'acqua sovrastante. *O. cf. ovata* è in grado di sintetizzare sia in ambiente che in cultura potenti tossine quali composti palitossina-simili che comprendono diversi tipi di ovatossine e mascarenotossine. Le fioriture di *O. cf. ovata* hanno pesanti ripercussioni sulla salute umana causando intossicazioni sia tramite inalazione che per contatto; impatti importanti si osservano anche sulle comunità bentoniche (e.g. bivalvi, gasteropodi, cirripedi, echinodermi) causando forti stress e mortalità massive.

I danni sanitari e gli impatti ecologici ed economici legati alle fioriture algali tossiche nel corso degli anni hanno spinto le autorità e la comunità scientifica ad indirizzare l'attività di ricerca all'identificazione delle condizioni ambientali e dei fattori ecologici che innescano o regolano le dinamiche degli bloom tossici; tra quest'ultimi, le interazioni tra microalghe e batteri sono in misura sempre maggiore oggetto di studio.

Le interazioni microalghe-batteri possono essere di tipo positivo (e.g. simbiosi, mutualismo) o negativo (e.g. competizione per i nutrienti, attività algicida), interferendo sul metabolismo algale ed essere quindi implicate direttamente o indirettamente, nella crescita dell'alga, nella produzione, degradazione e/o modificazione delle tossine algali. Ad oggi, per quanto concerne *O. cf. ovata* è stato osservato, in colture batch, un effetto riconducibile a parziale competizione per i nutrienti tra l'alga ed i batteri, oltre ad un'azione da parte di quest'ultimi sulla degradazione delle tossine extracellulari, senza

comunque fornire alcuna informazione sulla tassonomia dei batteri in associazione con l'alga.

Scopo della seguente tesi è stato lo studio della struttura filogenetica della comunità batterica associata ad *O. cf. ovata* in colture batch e la valutazione delle dinamiche successionali della stessa in relazione alle differenti fasi di crescita della microalga (oltre che in relazione alle dinamiche di abbondanza virale), al fine di evidenziare ed ipotizzare particolari interazioni tra l'alga e specifici taxa batterici. Lo studio filogenetico è stato effettuato tramite l'ausilio di metodiche molecolari di sequenziamento di next generation (Ion Torrent).

## 2-INTRODUZIONE

### 2.1 HABs: Harmful Algal Blooms

Con il termine HABs (Harmful Algal Blooms) sono indicate fioriture di microalghe direttamente o indirettamente pericolose per la salute umana e per l'ecosistema (Anderson, 1992; Hallegraeff, 1993). Negli ultimi anni si è assistito ad un aumento di frequenza degli eventi, pertanto sforzi volti all'investigazione delle cause scatenanti questi fenomeni sono stati effettuati dalla comunità scientifica. Delle 4000 specie di microalghe marine identificate, circa 200 tra cui diatomee, dinoflagellate, aptofite, rafidofite, cianofite e pelagofite causano eventi negativi di cui circa 80 (soprattutto dinoflagellate) sono produttrici di tossine (Zingone and Enevoldsen, 2000; Smayda and Reynolds, 2003). Tuttavia il numero delle specie dannose scoperte è in continuo aumento.

Un bloom fitoplanctonico dannoso (noto anche come “red tide”) consiste nell'incremento repentino della popolazione di microalghe che raggiunge una elevata concentrazione (e.g.  $10^4$ - $10^5$  cell mL<sup>-1</sup>) in un intervallo di tempo relativamente variabile (1-3 settimane; Maso and Garcés, 2006). I blooms possono essere dannosi in seguito all'elevata biomassa o alla produzione di tossine a seconda delle specie algali coinvolte; la sinergia di entrambi i fattori è talvolta riscontrata. Le specie produttrici di tossine causano danni alla salute umana (i.e. biointossicazioni) talvolta mortali principalmente tramite consumo di molluschi o pesci tropicali da parte dell'uomo, o tramite aerosol (problemi respiratori, irritazione della pelle), mentre elevate biomasse possono determinare effetti negativi sull'ecosistema (e.g. ipossia, anossia) e sulle attività ricreative (Garcés et al., 1999).

Le tossine prodotte da specie algali nocive comprendono un ampio spettro di composti organici con differenti pesi molecolari (da alcune centinaia ad oltre 1.000 Da) e solubilità. Tali molecole vengono prodotte principalmente da organismi fitoplanctonici e fitobentonici ma anche da batteri, coinvolti nella produzione e/o modificazione di queste molecole. I vettori più comuni delle biointossicazioni sono i molluschi bivalvi, in quanto organismi filtratori in grado di accumulare quantità elevate di tossine.

Una prima suddivisione può essere fatta in base alla solubilità (i.e. biotossine idrosolubili e liposolubili; Poletti et al., 2003). Per molto tempo le biotossine sono state

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

Ad oggi tale classificazione è piuttosto discussa, in quanto alcuni composti sono stati erroneamente inseriti in un gruppo solo per la loro presenza in concomitanza di altre tossine note, nonostante presentino differenti sintomi e chimica delle molecole. Per tale motivo si ritiene più opportuno suddividere le biotossine in gruppi che si basano sulla loro struttura chimica (Toyofuku, 2006; Tubaro et al., 2007): Saxitoxin group (STX); Okadaic acid group (OA); Pectenotoxin group (PTX); Yessotoxin group (YTX); Domoic acid group (DA); Brevetoxin group (BTX); Azaspiracid group (AZA); Ciguatera group e Cyclic imine group.

Le tossine sono metaboliti secondari che differiscono per struttura, composizione atomica e attività funzionale (Granéli and Flynn, 2006). Il tasso di sintesi delle tossine dipende dal metabolismo dei metaboliti primari che sono loro precursori. A loro volta, la sintesi dei metaboliti primari varia in funzione della disponibilità di nutrienti, del ciclo cellulare e delle fasi del ciclo vitale (Flynn and Flynn, 1995). In generale, variazioni nel contenuto cellulare di tossine sono associati con stress fisiologici o con l'entrata dell'alga in fase di crescita stazionaria (Anderson 1994; Flynn et al., 1994, 1996; Johansson and Granéli 1999a, 1999b; Granéli et al., 1998; Edvardsen et al., 1990, cited in Granéli et al., 1998).

I fattori abiotici e biotici che inducono o regolano la produzione di tossine in molte specie sono ancora largamente sconosciuti (Katircioglu et al., 2004).

## 2.2 Specie oggetto dello studio: *Ostreopsis cf. ovata*

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

Le dinoflagellate bentoniche appartenenti alla famiglia Ostreopsidaceae fanno parte delle comunità microalgali bentoniche sia in aree temperate che tropicali (Faust et al., 1996). Come le dinoflagellate planctoniche, si presume che anche le dinoflagellate bentoniche siano mixotrofe e auxotrofe per il fabbisogno vitaminico, il genere *Ostreopsis* è rappresentato da nove specie, distribuite principalmente nelle aree tropicali, spesso in associazione con *Gambierdiscus toxicus*. Nel Mar Mediterraneo sono state ritrovate solo due specie, *Ostreopsis siamensis* e *Ostreopsis cf. ovata* rispettivamente negli anni '70 e '90 (Taylor, 1979; Tognetto et al., 1995). L'assenza di un regolare programma di monitoraggio delle comunità microfite bentoniche lungo le coste del Mediterraneo non permette di valutare se e quando queste specie sono state introdotte nel Mediterraneo (ad esempio con acque di zavorra) o se erano già presenti a basse densità. Comunque sia, è evidente che nell'ultima decade i blooms di *Ostreopsis* spp. sono divenuti più frequenti, intensi e largamente distribuiti in molte aree del Mediterraneo (Vila et al., 2001; Aligizaki and Nikolaidis, 2006) suscitando l'interesse della comunità scientifica e delle autorità di gestione. Di conseguenza studi tassonomici, genetici, ecologici e tossicologici su *Ostreopsis* spp., si sono intensificati durante questo periodo (Vila et al., 2001; Penna et al., 2005; Turki, 2005; Aligizaki and Nikolaidis, 2006; Ciminiello et al., 2006, 2008; Riobò et al., 2006; Aligizaki et al., 2008; Guerrini et al., 2009; Ledreux et al., 2009; Vanucci et al., 2012a; Pezzolesi et al., 2014; Accoroni et al., 2014).

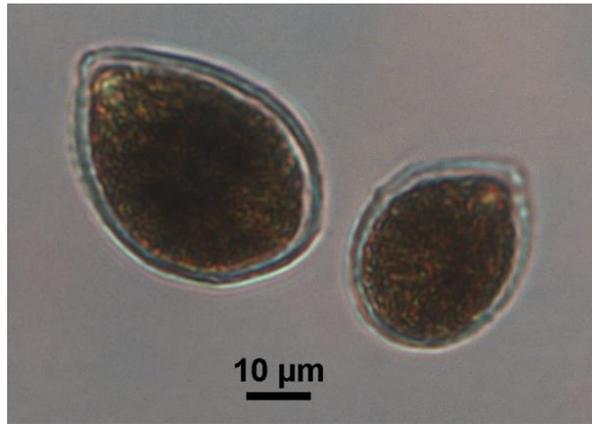


Fig. 1.1- *Ostreopsis cf. ovata* osservata al microscopio ottico.

Il genere *Ostreopsis* (Dinophyceae, Ostreopsidaceae, Gonyaulacales) è stato descritto nel 1901 con la specie *O. siamensis* Schmidt (1901). Questo genere non ha ricevuto grande attenzione fino a quando gli studi tassonomici di Fukuyo (1981) hanno permesso di descrivere altre due specie: *O. ovata* Fukuyo (1981) and *O. lenticularis* Fukuyo (1981). Da allora altre sei nuove specie di *Ostreopsis* sono state aggiunte: *O. heptagona* Norris, Bomber and Balech (1985), *O. mascarenensis* Quod (1994), *O. labens* Faust and Morton (1995), *O. marinus* Faust (1999), *O. belizeanus* Faust (1999), e *O. caribbeanus* Faust (1999). La tassonomia delle specie di *Ostreopsis* è basata su caratteri morfologici, come il tipo di incisioni tecali, la forma e la dimensione (Penna et al., 2005). La tassonomia del genere *Ostreopsis* però ancora non risulta essere chiara (Vila et al., 2001; Rhodes et al., 2000). Nel Mar Mediterraneo sono state trovate solo due specie, *O. cf. ovata* e *O. siamensis*, quasi tutte in coste rocciose, e *O. cf. ovata* (Fig. 1.1) risulta essere la specie più comune e abbondante (Accoroni et al., 2011; Mangialajo et al., 2011; Vila et al., 2011; Battocchi et al., 2010; Totti et al., 2010; Aligizaki and Nikolaidis, 2006; Turki et al., 2006; Penna et al., 2005). E' stato dimostrato che le dimensioni delle cellule di *Ostreopsis* spp. possono variare nelle diverse fasi di crescita sia in condizioni naturali che in condizioni sperimentali (Guerrini et al., 2010; Aligizaki and Nikolaidis, 2006). Tuttavia nonostante la presenza di diverse classi di dimensioni e morfologia appartenenti al genere *Ostreopsis* (Rossi et al., 2010; Aligizaki and Nikolaidis, 2006; Penna et al., 2005; Pin et al., 2001), fino ad ora sono state condotte raramente analisi morfologiche intraspecifiche.

Le specie appartenenti al genere *Ostreopsis* sono importanti nell'ambiente marino di coral reef sia subtropicale che tropicale, ma sono presenti anche nelle aree temperate,

dove sono aumentate notevolmente negli ultimi dieci anni (Penna et al., 2012; Shears and Ross, 2012; Laza-Martinez et al., 2011; Mangialajo et al., 2011; Rhodes, 2011).

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

Le cellule di *O. cf. ovata* hanno una forma paragonabile ad una goccia, ovali e assottigliate nella parte ventrale e appiattite in senso antero-posteriore. L'epiteca e l'ipoteca sono uguali in grandezza e la disposizione e la forma delle placche sono fondamentali nel riconoscimento (Fig. 1.2, 1.3). L'arrangiamento della teca è: Po, 3', 7'', 6c, 6s, 5''', 1p, 2'''' (Faust and Gulladze, 2002).

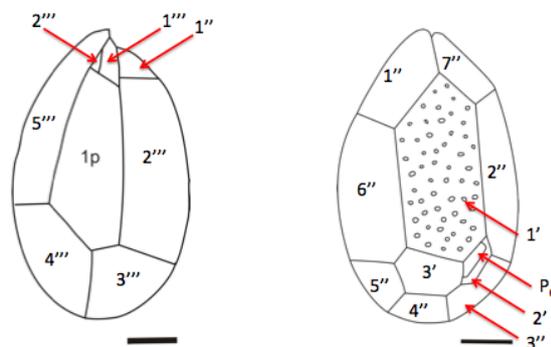


Fig. 1.2. Diagramma schematico di ipoteca e epiteca di *Ostreopsis ovata*. Scala barra = 10  $\mu\text{m}$  (Tomas et al., 1997).

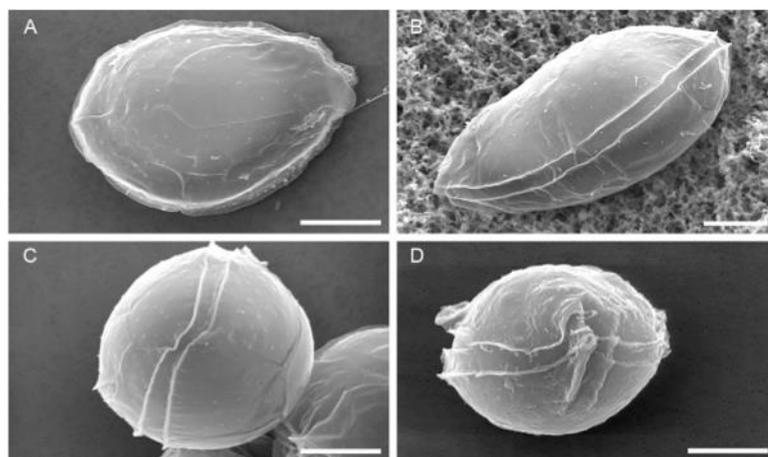


Fig. 1.3. *Ostreopsis cf. ovata* osservata al microscopio elettronico (SEM): in (a) ipoteca, (b) vista lato, (c) dorsale e (d) ventrale. Scala barra: 10  $\mu\text{m}$ . (Accoroni et al., 2012).

*O. cf. ovata* è una dinoflagellata mixotrofa in quanto presenta sia nutrizione autotrofa che eterotrofa (Faust et al., 1998). Si nutre di altre microalghe, cianobatteri e ciliati attraverso il poro ventrale che può allargarsi e contrarsi. A bassa turbolenza libera

sostanze esopolimeriche dal poro ventrale formando cordoni mucilluginosi (reticoli) che servono come la tela di un ragno, a formare un biofilm che imprigiona piccoli invertebrati (Barone and Prisinzano, 2006). Grazie alla elevata elasticità della teca, *O. ovata* dopo l'ingestione può aumentare il suo volume cellulare del 50-70%. *O. cf. ovata* predilige acque poco profonde, con basso idrodinamismo (Faust et al., 1995) e vive in biocenosi principalmente con altre dinoflagellate quali, *Amphidinium sp.*, *Coolia monotis*, *Gambierdiscus toxicus*, *Prorocentrum lima* e con la diatomea centrica *Coscinodiscus sp.*

Dalla fine degli anni '90 vasti blooms di *O. cf. ovata* sono stati registrati in aree costiere di regioni temperate con un incremento in frequenza, intensità e distribuzione. Lungo le coste italiane, l'elevata densità di *O. cf. ovata*, è stata inizialmente registrata in Liguria (Mangialajo et al., 2008; Abbate et al., 2007), Sardegna (Lugliè, pers. comm.), Tirreno (Bianco et al., 2007; Barone and Prisinzano, 2006; Congestri et al., 2006; Simoni et al., 2004; Sansoni et al., 2003;) e nella parte meridionale del mar Adriatico (Ungaro et al., 2005; Di Turi et al., 2003; Bottalico et al., 2002). Solo dal 2006, la presenza di *O. cf. ovata* è stata registrata lungo le coste rocciose della parte nord del Mar Adriatico (Monti et al., 2007; Totti et al., 2007a).

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

### 2.3 La famiglia delle palitossine

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

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

Attraverso l'analisi degli estratti algali ottenuti dai campioni raccolti durante la fioritura del 2005, è stato possibile identificare una palitossina putativa (pPLTX) nel plancton. Ulteriori analisi effettuate nel corso di osservazioni successive in ambiente e in colture di laboratorio di *O. cf. ovata*, hanno mostrato la presenza in estratti cellulari dell'alga di tossine con struttura chimica simile alle pPLTX, denominate ovatossine a, b, c, d, e, f e g, di cui la prima rappresenta la componente più abbondante sia in blooms naturali che in colture (figura 1.4) (Ciminiello et al., 2010-2012; Garcia-Altarez et al., 2014).

La molecola base della palitossina è costituita da una lunga catena alifatica parzialmente insatura contenente eteri ciclici, 64 centri chirali, 40-42 gruppi idrossilici e 2 gruppi ammidici (formula:  $C_{129}H_{233}N_3O_{54}$ ) che la rendono la più lunga catena di atomi di carbonio conosciuta esistente in natura ed una delle più potenti e letali tossine marine non proteiche.

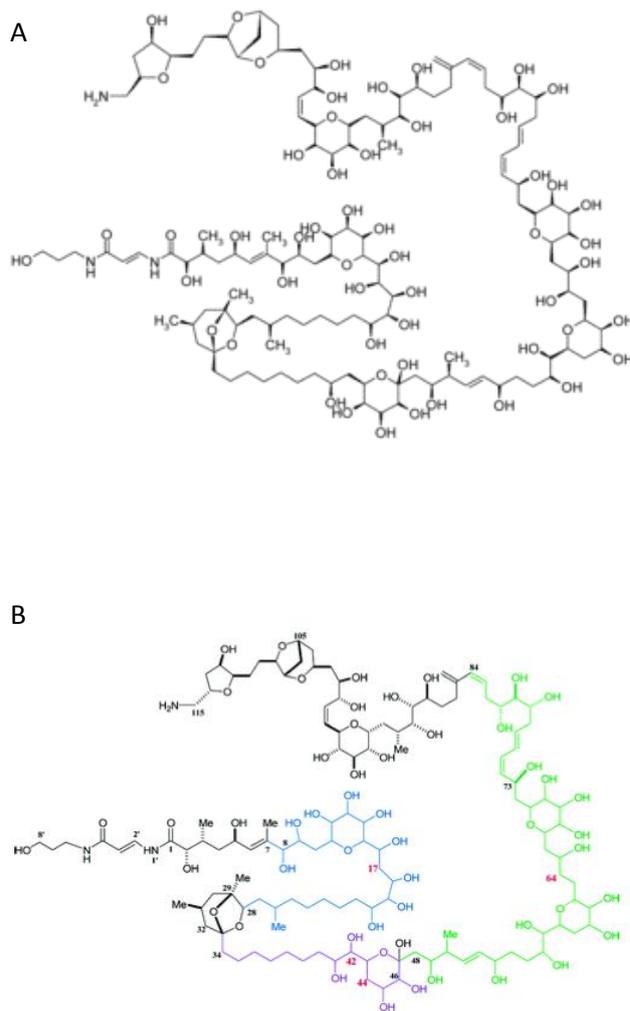


Fig. 1.4- (A) Struttura chimica della palitossina ( B)ovatossina (Ciminiello et al., 2012).

La caratteristica principale che riguarda il meccanismo di azione della PLTX è l'attività di emolisi ritardata che può essere neutralizzata dalla ouabaina (Riobò et al., 2006). Studi recenti di citotossicità hanno messo in evidenza che la palitossina ha come sito di azione la pompa sodio/potassio ATP-dipendente ( $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasi). Nel suo meccanismo d'azione, la palitossina agendo su tale pompa, darebbe il via ad una morte cellulare a cascata tipica del sovraccarico di  $\text{Ca}^{++}$  (Schilling et al., 2006). Pur non essendo considerata una emolisina, la palitossina causa lisi osmotica degli eritrociti, con distruzione della membrana cellulare e rilascio di emoglobina (Malagoli, 2007; Habermann et al, 1981). Gli effetti tossici prodotti sono una potente vasocostrizione, depressione della funzione cardiaca, ischemia e danno al miocardio, fibrillazione ventricolare e blocco cardiaco.

## 2.4 Interazioni batteri-microalghe

Per quanto riguarda i fattori abiotici che sembrano maggiormente influenzare i blooms di *O. cf. ovata* sono la temperatura della colonna d'acqua, l'idrodinamismo, il tipo di substrato, la profondità, la salinità superficiale e la disponibilità di nutrienti (revisionato in Pistocchi et al., 2011). Riassumendo, abbondanze maggiori di *Ostreopsis* spp. nel Mediterraneo sono state generalmente registrate nei periodi dell'anno caratterizzati da acque con alta temperatura, salinità e stabilità della colonna d'acqua. Inoltre, dato che le cellule algali sono facilmente risospese nella colonna d'acqua, il ruolo dell'idrodinamismo nello sviluppo e nel declino dei blooms è stato ampiamente evidenziato. Studi su colture indicano che ceppi diversi isolati da differenti siti lungo le coste italiane presentano optimum di temperatura diversi in accordo con i periodi di fioritura, e che concentrazioni di tossine maggiori si osservano in concomitanza delle migliori condizioni di crescita. In generale la carenza di azoto e fosforo determina una diminuzione nella tossicità cellulare, diversamente da quanto si osserva in molte altre dinoflagellate tossiche (Pistocchi et al., 2011).

Per quanto concerne i fattori biotici, i batteri associati alle microalghe tossiche e le diverse interazioni (microalga-batteri) che ne originano sono in misura sempre maggiore oggetto di studio e all'attenzione della comunità scientifica, in quanto considerati tra i fattori ecologici più importanti nell'innescare e/o nella regolazione delle dinamiche delle fioriture delle microalghe tossiche (Harmful algal Blooms, i.e. HABs; Granéli e Turner, 2006). Le relazioni fra i batteri associati alle microalghe, adesi alla superficie dell'alga (attached) o liberi (free-living) (Reinmann & Winding, 2001), possono essere specie-specifiche o generali (Garcès et al., 2007; Saap et al., 2007), positive o negative (Doucette et al., 1998).

La presenza e la successione di gruppi specifici di batteri appartenenti a gruppi filogenetici differenti (a cui sono attribuiti attività metaboliche parzialmente differenti) osservati nello sviluppo di diversi blooms di microalghe tossiche, hanno suggerito un loro ruolo di modulatori dei processi di iniziazione (inizio del bloom), mantenimento (fase stazionaria) e di declino degli HABs (Doucette, 1995; Adachi et al., 1999; Doucette et al., 1999); così come modulatori dell'entità di tossicità degli HABs intervenendo direttamente e/o indirettamente sulla produzione e degradazione delle tossine sintetizzate dalle microalghe (e.g. Gallacher et al., 1997). Tutto ciò in primo luogo a seguito del ruolo esercitato dai batteri nel ciclo dei nutrienti e nella produzione di vitamine che stimolano la crescita delle microalghe, e di altre relazioni più o meno

specifiche che interferiscono con il ciclo vitale delle microalghe (e.g. formazioni di cisti; Granèli e Turner, 2006 e referenze in esso riportate).

Le relazioni esistenti fra microalghe e batteri, possono essere di tipo sinergico (e.g. simbiosi, mutualismo) o competitivo (e.g. competizione per i nutrienti, attività alghecidica, parassitismo) (Doucette et al., 1998; Jones et al., 2010; Amin et al., 2012), molte di queste relazioni si concretizzano a livello della 'ficosfera', ovvero quella regione che si estende al di fuori di una cellula (o catena o colonia di cellule) "dove la crescita batterica è stimolata dai prodotti extracellulari dell'alga" (Bell e Mitchell, 1972), rappresentata da quel sottile strato di fluido che circonda la cellula ed attraverso il quale il trasporto avviene esclusivamente per diffusione (Amin et al., 2012 e referenze in esso riportate). I batteri si posizionano in questa regione attraverso il fenomeno della chemiotassi (positiva e negativa), processo attraverso il quale i batteri riescono a captare i nutrienti grazie alla presenza di un gradiente chimico. Una via alternativa per rimanere all'interno della ficosfera è quella di aderire alla superficie della microalga, probabilmente tramite la produzione di molecole extracellulari come polisaccaridi o proteine secrete dall'alga e/o dai batteri (Biegala et al., 2002; Kaczmaraska et al., 2005; Jung et al., 2008; Mayali et al., 2008; Gardes et al., 2011).

#### ***2.4.1 Alcuni aspetti delle associazioni batteri-microalghe***

La consistente presenza di specifiche specie batteriche nelle colture delle dinoflagellate tossiche e non, oltre che in associazione a dinoflagellate in ambiente naturale, suggerisce che questi batteri siano adattati ad utilizzare i prodotti provenienti dalle cellule microalgali. I batteri, a loro volta potrebbero beneficiare le dinoflagellate rendendo più disponibili alcune fonti di nutrienti oppure proteggendo l'alga dall'attacco di altri batteri opportunisti. D'altra parte, alcuni gruppi batterici, potrebbero essere in grado di sfruttare la microalga causando stress o lisi cellulare.

Un'interazione di tipo mutualistico, e spesso simbiotico, comunemente nota fra batteri e dinoflagellate (e fitoplancton in genere) è quella basata sulla produzione di vitamine necessarie alle differenti specie di dinoflagellate da parte dei batteri e l'utilizzo di essudati algali da parte di questi ultimi. La vitamina B<sub>12</sub> (cobalamina) è essenziale per la sintesi degli amminoacidi, dei deossiribosi, e per la riduzione e il trasferimento di singoli frammenti di carbonio in molte vie biochimiche, mentre la vitamina B<sub>1</sub> (tiamina) gioca un ruolo di intermediario nel metabolismo del carbonio ed è un cofattore per numerosi enzimi coinvolti nel metabolismo primario dei carboidrati e in quello degli

amminoacidi ramificati; la vitamina B<sub>7</sub> (biotina) invece, è un cofattore di diversi enzimi carbossilasi essenziali, come l'acetil CoA (Tang et al., 2010 e referenze in esso riportate). Tutte queste tre vitamine sono solubili in acqua e quindi devono essere assimilate rapidamente dalle dinoflagellate prima che diffondano fuori dalla ficosfera. Questo tipo di interazione appare molto rilevante per quanto riguarda le dinoflagellate responsabili di blooms tossici. Ad oggi la maggior parte degli studi sugli HABs ha prestato attenzione alla dinamica dei macronutrienti quali azoto e fosforo, a seguito della constatazione che spesso esiste un legame fra eutrofizzazione e bloom di microalghe tossiche, mentre l'importanza di coenzimi e di particolari vitamine (vitamine B<sub>1</sub>, B<sub>7</sub> e B<sub>12</sub>) nella regolazione e nella stimolazione degli HABs è stata raramente considerata (Tang et al., 2010 e referenze in esso riportate). Molte osservazioni suggeriscono che le vitamine potrebbero essere specificatamente importanti per il verificarsi degli HABs causati principalmente da dinoflagellate, quest'ultime note per essere un gruppo di alghe con manifesta auxotrofia per le vitamine (Croft et al., 2005). Recentemente è stato evidenziato che oltre il 90% delle dinoflagellate tossiche sono auxotrofe per la vitamina B<sub>12</sub>, circa il 50% per vitamina B<sub>1</sub> e circa il 40 per la vitamina B<sub>7</sub> (Tang et al., 2010). L'estesa auxotrofia per le vitamine riscontrata tra le dinoflagellate tossiche insieme alle loro note capacità osmotrofiche e mixotrofe implicano un prelievo dall'ambiente importante anche ai fini dello sviluppo di un blooms.

Il tipo di associazione che un batterio (o un gruppo di batteri) è in grado di mettere in atto (e.g. mutualismo, commensalismo, parassitismo) può variare in funzione delle condizioni ambientali e dello stato fisiologico dell'alga (Azam & Smith, 1991; Seyedsayamdost et al., 2011). Ciò premesso, quindi è plausibile che la comunità batterica associata ad un'alga tossica in un determinato momento del blooms, rispecchi tipo di risorse disponibili, ovvero (i) il tipo di sostanza organica, (ii) i nutrienti (e.g. azoto e fosforo) ed (iii) i micronutrienti (e.g. vitamine) e (iv) lo stato fisiologico dell'alga che dipende a sua volta, oltre che da numerosi fattori ambientali, anche dalle interazioni con i batteri (vedi oltre). La progressione e le dinamiche di un blooms microalgale saranno quindi associate a stadi successionali della comunità batterica presente che implicano tipi di interazioni alghe-batteri predominati e differenti nei differenti stadi. Per esempio, Mayali et al. (2011) considerando le dinamiche di colonizzazione di diversi taxa batterici durante le diverse fasi di un blooms, i batteri che hanno effetti benefici per la cellula algale ospite (mutualisti) saranno presenti durante i

periodi di alta abbondanza delle cellule microalgali; i batteri cosiddetti competitivi o parassiti mostreranno un incremento in termini di abbondanza poco prima della fase di declino del blooms (tarda fase stazionaria), mentre i batteri specializzati nella degradazione di materia organica direttamente dalle cellule algali morte (saprofiti) mostreranno un incremento immediatamente dopo la fase di terminazione del blooms, a seguito dell'elevata concentrazione di fitodetrito.

La successione ecologica (processo attraverso il quale le specie occupano un ambiente fisico e ne determinano le modificazioni) ricorrente all'interno della comunità microbica è indotta, oltre che dalle relazioni tra batteri e microalghe e dall'ambiente, anche dalle interazioni fra i diversi gruppi di batteri che contemplano lo stesso ampio spettro di quelle riportate fra alghe e batteri (e.g. da mutualismo a competizione). I batteri, come altri organismi, possono presentare due diverse strategie di crescita, alcuni sono r-strateghi (e.g. *Alphaproteobacteria*, *Gammaproteobacteria*) e altri k-strateghi (e.g. *Bacteroidetes*). I primi che arrivano a colonizzare un substrato sono gli r caratterizzati, nel breve periodo, da ritmi di crescita esponenziali, che si verificano finché le condizioni ambientali e disponibilità di risorse sono favorevoli, mentre le specie k sono caratterizzate da elementi che denotano una crescita demografica lenta ma sostanzialmente stabile. In generale le specie a strategia r sono comunemente definite, opportuniste o pioniere. Tali specie sono infatti in grado di sfruttare condizioni favorevoli transitorie, colonizzando rapidamente l'ambiente. Le specie a strategia k necessitano di condizioni ambientali stabili ed in equilibrio, in tali condizioni manifestano una notevole competitività arrivando a colonizzare stabilmente l'ecosistema, trovandosi in condizioni di vantaggio ad alti livelli di biodiversità e con flussi di energia e materia stabili; per questi motivi le specie a strategia k hanno il sopravvento negli ecosistemi maturi (Jones et al., 2010; Garcès et al., 2007; Abby et al., 2014).

#### **2.4.2 Principali gruppi tassonomici in associazione con le dinoflagellate tossiche**

Studi condotti in coltura su dinoflagellate planctoniche tossiche con l'ausilio di metodiche tradizionali e più recentemente con tecniche molecolari hanno messo in luce come meccanismi quali la competizione per i nutrienti, la produzione di composti inibenti o stimolanti, o l'attività algicida di alcune specie batteriche possano avere diversi effetti sulla fisiologia delle cellule algali, in grado di interagire con le dinamiche di crescita e la produzione, degradazione e modificazione delle tossine algali (e.g. Hold

et al., 2001; Amaro et al., 2005; Jasti et al., 2005; Su et al., 2005; Donovan et al., 2009; Green et al., 2010; Wang et al., 2010).

Associazioni ricorrenti tra specifici gruppi batterici come *Alpha*- e *Gammaproteobatteri* (phylum *Proteobacteria*), *Cytophaga/Flavobacterium/Bacteroidetes* e alcuni sottogruppi, principalmente *Roseobacter* clade e *Alteromonas*, e dinoflagellate tossiche in coltura sono state ampiamente osservate (revisione in Garcés et al., 2007; Green et al., 2010 e riferimenti all'interno), seppur associazioni univoche per le stesse specie di dinoflagellate o strettamente affini non sono state riportate (e.g. per *Alexandrium* spp., revisione in Garcés et al., 2007).

Per quanto concerne le comunità batteriche associate con dinoflagellate epifitiche responsabili della sindrome della ciguatera, come quelle appartenenti ai generi *Gambierdiscus*, *Ostreopsis*, *Coolia*, *Amphidinium* e *Prorocentrum*, le informazioni disponibili sono considerevolmente inferiori rispetto a quelle disponibili per le dinoflagellate planctoniche. Gli studi esistenti si basano su ceppi batterici isolati su piastra da dinoflagellate in coltura (Tosteson et al., 1989; Lafay et al., 1995; Prokic et al., 1998; Sakami et al., 1999). Più recentemente, in relazione a specie della famiglia *Ostreopsidaceae*, Ashton et al. (2003) hanno riportato la presenza di ceppi batterici non coltivabili (*Pseudomonas/Alteromonas* e *Acinetobacter*, classe *Gammaproteobacteria*) in associazione con colture di *Ostreopsis lenticularis*, mentre Pérez-Guzmán et al. (2008) hanno mostrato che circa il 50% dei batteri associati con colture di ceppi *O. lenticularis* apparteneva al complesso *Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides*.

Per quanto riguarda *Ostreopsis* cf. *ovata*, uno studio recente su colture ha evidenziato che i batteri interferiscono indirettamente con la crescita algale e la produzione di tossine agendo sulla fisiologia dell'alga e probabilmente sulla degradazione delle stesse (Vanucci et al., 2012b).

Sebbene le associazioni e le interazioni tra batteri e dinoflagellate che si osservano in colture di laboratorio siano soggette a forte selezione (Garcés et al., 2007) e la variabilità della risposta batterica (e.g. attività algicida) possa essere condizionata per esempio dalla concentrazione dei nutrienti nel mezzo di coltura, dalla fase di crescita dell'alga o dalla specie algale coinvolta (e.g. Amaro et al., 2005), ad oggi gli studi in coltura risultano indispensabili per delucidare molti aspetti legati a queste interazioni (Loureiro et al., 2011; Flynn et al., 2013).

Il phylum *Proteobacteria* è costituito dalle classi *Alpha*-, *Beta*-, *Gamma*-, *Delta*- ed *Epsilonbacteria*. Fra gli *Alphaproteobacteria* il clade *Roseobacter* (i.e.

*Rodhobacterales*) rappresenta uno dei gruppi batterici più abbondanti e metabolicamente versatili presenti negli oceani. Il clade *Roseobacter* marino è rappresentato da batteri eterotrofi e batteri fotoeterotrofi abbondanti nelle acque costiere spesso in grado di assimilare composti organosolfurei quale il dimetilsulfoniopropionato (DMSP) una sostanza osmoprotettiva rilasciata in grande quantità durante le fioriture algali (Yoch 2002; Miller et al., 2004; González et al., 2005; Miller and Belas, 2006). Quindi i batteri di questo clade sono coinvolti principalmente nei cicli globali del carbonio e dello zolfo in mare (Moran et al., 2004; Selje et al., 2004; Buchan et al., 2005; Biebl, 2006; Howard et al., 2006; Moran and Miller, 2007; Brinkhoff et al., 2008; Wagner-Dobler et al., 2010). Molte specie di *Roseobacter* vivono come epibionti su alghe marine e raggiungono alte densità durante le fioriture del fitoplancton (revisionato da Buchan et al., 2005) e nei blooms di dinoflagellate tossiche (Lafay et al., 1995; Prokic et al., 1998; Miller and Belas, 2004; Hasegawa et al., 2007; Mayali et al., 2008).

I *Roseobacter* isolati dalle culture delle dinoflagellate sono in grado di crescere sui metaboliti prodotti dall'alga, (Moran and Miller, 2007; Mayali et al., 2008), ciononostante ad oggi, è difficile stabilire quali siano eventuali fattori trigger che possono indurre un passaggio da relazione sinergica a competitiva (Wagner-Dobler et al., 2010; Seyedsayamdost et al., 2011). Per quanto riguarda i *Gammaproteobatteri*, membri di questa classe sono stati comunemente isolati da blooms e da colture di dinoflagellate tossiche (e.g. *Alexandrium* spp., Brinkmeyer et al., 2000; Green et al., 2004; Amaro et al., 2005; Sala et al., 2005; Sapp et al., 2007); sono considerati opportunisti e resilienti ed alcuni membri sembrano mostrare elevata attività algicida (Skerratt et al., 2002 Wang et al., 2005; Su et al., 2007). In particolare i membri appartenenti al gruppo *Alteromonas-Pseudomonas-Vibrio*, sono spesso descritti come r strateghi nei sistemi marini (Weinbauer et al., 2006), iniziando a crescere in risposta alle condizioni ambientali favorevoli, colonizzando velocemente il materiale organico e mostrando grandi fluttuazioni in termini di abbondanza (Jones et al., 2010; Amin et al., 2012; Abby et al., 2014).

Il phylum *Bacteroidetes*, noto anche come *Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroidetes*, è suddiviso nelle tre classi *Bacteroidia*, *Flavobacteria* e *Sphingobacteria* (Bernardet et al., 2002); i membri appartenenti a questo phylum occupano un ampio range di nicchie ecologiche, e sono stati ritrovati in vari habitat marini, rappresentando una parte importante del batterioplancton eterotrofo delle acque costiere superficiali, delle acque

oceaniche ed anche delle comunità microbiche marine dei sedimenti (DeLong et al., 1993; Bowman et al., 1997; Pinhassi et al., 1997; Glockner et al., 1999; O'Sullivan et al., 2002; Mann et al., 2013 e referenze in esso riportate). Inoltre la loro presenza è stata evidenziata nei blooms fitoplanctonici e in colture di dinoflagellate tossiche quali *Alexandrium* sp. (e.g.; DeLong et al., 1993; Gonzàles & Moran, 1997; Gasol & Duarte, 2000; Biegala, 2002).

I *Bacteroidetes* possono essere free living o attached, sembrano essere ampiamente specializzati nella degradazione di biopolimeri, come proteine, polisaccaridi e glicoproteine (Kirchman 2002; Gòmez-Pereira et al., 2012; Riedel et al., 2013), ed inoltre degradatori fermentativi di complessi polimeri di piante e di polisaccaridi di macroalghe (Teske et al., 2011). In particolare i membri della classe dei *Flavobacteria* sono considerati tra i principali mineralizzatori della sostanza organica, infatti si trovano spesso associati alla sostanza organica particellata ad alto peso molecolare (con elevate abbondanze, colonizzando anche la superficie di organismi viventi, come coralli, alghe e piante e microalghe (Wagner-Dobler et al., 2010; Kolton et al., 2013; Mann et al., 2013 e referenze in esso riportate). Recentemente in una specie appartenente a questa classe è stata evidenziata una forte specializzazione verso uno stile di vita alga-associato in grado di degradare polisaccaridi di alghe verdi, rosse e brune ed anche monosaccaridi che costituiscono i monomeri di base dei polisaccaridi (Mann et al., 2009). E' stato evidenziato inoltre che sia la classe dei *Flavobacteria* che quella degli *Sphingobacteria* assimilano velocemente il fitodetrito dei sedimenti superficiali (Gihring et al., 2009) e che i *Bacteroidetes* anaerobici appartenenti alla classe *Sphingobacteria* sono più competitivi in condizioni maggiormente anossiche rispetto ai *Flavobacteria* (Teske et al., 2011). Alcuni studi, inoltre riportano che diversi ceppi appartenenti al gruppo *Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroidetes* sono algicidi (Mayali et al., 2004; Hare et al., 2005; Shi et al., 2013).

#### **2.4.3 Alcuni aspetti delle relazioni batteri-virus**

I batteri sono tipicamente organismi procarioti unicellulari di dimensioni normalmente comprese tra 0.2 e 2 µm (Sieburth et al., 1978), sebbene la loro esistenza nell'ambiente marino fosse già ben nota è solo grazie a metodiche di conteggio ad epifluorescenza, messe a punto negli anni 70, che è stato possibile stimare abbondanze medie di circa  $10^6$  -  $10^9$  cell l<sup>-1</sup> (Ferguson & Rublee, 1976; Hobbie et al., 1977).

Come noto i batteri eterotrofi (insieme agli Archea) degradano sostanza organica sia in forma disciolta (dissolved organic matter; DOM) che in forma particellata (particulate organic matter; POM) di diversa provenienza, ma principalmente direttamente o indirettamente collegata alla produzione fitoplanctonica (Azam et al.,1983; Ducklow & Carlson, 1992). I batteri, rimettono in circolo le forme inorganiche degli elementi attuando in questo modo il riciclo della materia negli oceani. (Paerl 1975; Smith et al. 1992).

La presenza dei virus (entità biologiche di dimensioni comprese tra 0.02 e 0.2  $\mu\text{m}$ ; Sieburth et al., 1978) nell'ambiente marino è nota da molti decenni (Spencer, 1955; Valentine et al., 1966, Torrella & Morita, 1979) ma la loro importanza come componente funzionale della comunità microbica marina è stata ipotizzata solo a partire dalla fine degli anni '90 del secolo scorso quando, tramite l'utilizzo di nuovi fluorocromi, è stata possibile la visualizzazione ed il conteggio, evidenziando densità virali dell'ordine di  $10^8$ - $10^{10}$  VLP  $\text{l}^{-1}$  (Virus-like particles) (Bergh et al.,1989; Paul et al.;1993; Hara et al.;1996; Proctor 1997; Wilhelm & Suttle,1999).

L'enorme abbondanza virale riscontrata negli ambienti acquatici implica che essi giochino un ruolo significativo nel riciclo della sostanza organica e dei nutrienti nelle reti trofiche. E' stato inoltre osservato come abbiano importanti risvolti anche sulle dinamiche di popolazione e di comunità degli organismi della microbial food web, essendo importanti agenti di mortalità per i batteri e per il fitoplancton (Fuhrman, 1999; Wommack & Colwell, 2000). Ne segue che l'abbondanza e la struttura tassonomica dei popolamenti microbici, ed in particolare quella dei batteri, è modulata dall'entità dell'infezione virale, oltre che da altri fattori quali la disponibilità delle risorse (e.g. nutrienti, sostanza organica) e l'attività di grazing da parte dei protisti (Wilhelm & Matteson, 2008 e bibliografia in esso riportata).

L'infezione virale è specie-specifica ed i virus entrano in contatto casualmente con le cellule batteriche ospiti; le modalità attraverso le quali il virus si riproduce sono principalmente: infezione litica e infezione lisogenica. Nell'infezione litica il virus aderisce alla cellula ospite, inserisce il materiale genetico ed induce la cellula a produrre nuova progenie virale; i nuovi virus sono poi rilasciati nell'ambiente a seguito della lisi cellulare. Nell'infezione lisogenica, l'acido nucleico virale si inserisce all'interno del genoma della cellula ospite e si riproduce come materiale genetico nella linea cellulare dell'ospite (Breitbart et al., 2008). L'infezione lisogenica rappresenta una strategia di "sopravvivenza" che i virus adottano quando le densità cellulari degli ospiti sono scarse

o, più in generale, quando le condizioni ambientali sono sfavorevoli. L'infezione di tipo litico è indotta da alte densità e/o elevata attività metabolica delle cellule ospiti presenti in ambiente (Fuhrman & Suttle, 1993; Breitbart et al., 2008). Si ipotizza che i vincitori (winners) nella competizione per le risorse abbiano le abbondanze più elevate nelle comunità batteriche planctoniche (e nei sedimenti) e che queste stesse popolazioni a seguito della lisi virale subiscano un declino; questa teoria prende il nome di “kill the winner” (Thingstad & Lignell, 1997). Ne consegue che, all'interno di una comunità microbica in equilibrio, nessuna specie raggiungerà densità molto maggiori rispetto alle altre in seguito all'effetto predatorio limitante esercitato dai virus, permettendo quindi a numerose specie di sopravvivere nello stesso habitat ed incrementando la diversità batterica. Si ritiene che i virus siano responsabili di una mortalità batterica compresa fra il 20 ed il 50% nelle acque superficiali costiere (Fuhrman & Noble, 1995).

In molti ambienti planctonici marini l'abbondanza virale supera quella batterica; generalmente il rapporto VBR (Virus to bacteria ratio) medio è di circa 10 (Wommack & Colwell, 2000), con valori maggiori (40-50) in ambienti ricchi in nutrienti ed inferiori in ambienti oligotrofi e/o in condizioni *Steady-state* (Needham et al., 2013), suggerendo, quindi, che il batterioplancton presenti un alto tasso di infezione e subisca un maggior numero di attacchi virali quando le condizioni ambientali favoriscono una veloce crescita ed un'alta produttività batterica.

Quando una cellula va incontro a lisi, si trasforma in detrito; questo è composto da molecole disciolte (monomeri, oligomeri, polimeri), sostanze colloidali e frammenti cellulari (Shibata *et al.*, 1997). Proctor & Fuhrman (1990) e Bratbak *et al.* (1990) hanno dimostrato che la quasi totalità del materiale organico disciolto derivante dalla lisi virale viene utilizzato dai batteri. Pertanto, se la cellula lisata è un batterio ed il lisato viene utilizzato dai batteri si instaura una sorta di anello trofico noto come “viral loop” dove la biomassa batterica viene degradata dai batteri stessi (Fuhrman, 1999).

#### **2.4.3.1 Controllo bottom-up e top down della comunità batterica**

La dimensione di una popolazione batterica è controllata in prima analisi dal bilanciamento tra il tasso di crescita e il tasso di mortalità; tuttavia la sua composizione, intesa come numero di taxa dominanti, è determinata dalla disponibilità e dalla qualità dei nutrienti e, più in generale, dalle risorse presenti nell'ambiente. Tale controllo è definito bottom-up si basa sull'interazione di tipo competitivo che si instaura tra diversi gruppi batterici per le stesse risorse. Appare chiaro come in condizioni limitanti la

comunità sarà composta principalmente dai così detti *core taxa*, ovvero poche specie dominanti, caratterizzate da un elevato numero di individui, in grado di prendere il sopravvento sui taxa rari (o *seed bank*; Pedròs-Aliò, 2006). In questo processo è stato riscontrato come anche l'infezione virale giochi un ruolo di primo piano in quanto, a seguito della lisi delle cellule batteriche, vengono resi disponibili nutrienti sia sotto forma disciolta che particellata (*viral loop*; Fuhrman, 1999). I virus, come precedentemente riportato, oltre ad un effetto bottom up esercitano un controllo top down, tramite strategia "kill the winner".

## 3-MATERIALI E METODI

### 3.1 Allestimento delle culture batch

L' esperimento condotto nel corso dello studio è stato effettuato utilizzando un ceppo di *Ostreopsis cf. ovata* proveniente da un sito costiero dell'Adriatico nord-occidentale (Passetto; 43°36'38'' N e 13°32'20'' E, Italia) caratterizzato da fondale roccioso e poco profondo, con acque a basso idrodinamismo, regolarmente oggetto di blooms della dinoflagellata dal 2006 (Totti et al., 2010). Le cellule sono state isolate unitamente ai batteri presenti in natura nella ficosfera con il metodo della micropipetta (Hoshaw and Rosowski, 1973) e fatte crescere inizialmente in micropiastre prima di essere trasferite in beute sterili.

A 250 ml di una coltura di tale ceppo (i.e., coltura batch madre di *O. cf. ovata*), è stato aggiunto un ugual volume di filtrato su 2 µm della stessa (i.e., coltura madre filtrata), quindi le colture in duplicato sono state portate ad un volume finale pari a 2.65 litri (concentrazione iniziale di circa 300 cellule ml<sup>-1</sup> di *O. cf. ovata*) con terreno f<sub>N10</sub>, P<sub>10</sub> con aggiunta di selenio (N:P = 24, concentrazione di azoto e fosforo inorganico 176.40 e 7.24 µM, rispettivamente, ovvero 5 volte minore del mezzo f/2; Guillard, 1975) a salinità 36 e mantenute in camera di crescita termostata in condizioni controllate (Temperatura = 20 ± 1 °C, Radiazione = 110-120 µE, luce:buio = 16:8 ore) per un periodo di 42 giorni (fig. 3.1).

La filtrazione della coltura madre su filtri in policarbonato da 2 µm e la riaggiunta alla stessa del filtrato è stata effettuata al fine di evidenziare eventuali differenze nella composizione della comunità batterica più strettamente associata ad *O. cf. ovata* ed al particolato organico rispetto alla frazione free-living.



Fig. 3.1. Esempio di colture algali batch in camera di coltura.

Le abbondanze delle cellule batteriche e delle particelle virali (i.e., VLP) sono state stimate tramite microscopia ad epifluorescenza (previa marcatura degli acidi nucleici con colorante Sybr Gold), mentre l'abbondanza cellulare algale è stata stimata seguendo il metodo di Uthermohl. Il contributo della frazione batterica altamente attiva ( $CTC^+$ ) è stato stimato tramite doppia colorazione con coloranti DAPI (4',6-diamidin-2-fenilindolo) e CTC (5-cyano-2,3-ditolyl tetrazolium chloride) in seguito a messa a punto della metodica per colture algali. Il consumo di azoto nitrico, azoto ammoniacale e fosfato inorganico durante la crescita sono stati determinati in accordo con Strickland e Parsons (1972).

La composizione filogenetica della comunità batterica nelle diverse fasi di crescita di *O. cf. ovata* è stata determinata tramite sequenziamento massivo delle regioni ipervariabili V1 e V2 del gene 16s rRNA batterico tramite piattaforma ION torrent PGM. Il processamento bioinformatico delle sequenze grezze è stato implementato attraverso la command line del software Mothur, mentre le analisi statistiche dei dati sono state svolte per mezzo del software PAST 3.0 (vedi paragrafi successivi). Le analisi sopra elencate sono state effettuate ai giorni indicati in tabella 3.1.

Analisi	Giorni									
	0	3	6	9	12	18	24	32	42	
Abbondanze di <i>O. cf. ovata</i> , batteri totali, CTC <sup>+</sup> , VLP	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√
Concentrazione di N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> P-PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> N-NH <sub>3</sub>	√	√	√	√	√		√	solo N-NH <sub>3</sub>	√	
Composizione filogenetica della comunità batterica	√		√				√			√

Tab. 3.1 Disegno di campionamento.

### 3.2 Analisi dei macronutrienti

L'analisi dei macronutrienti disciolti nel mezzo di coltura è stata effettuata in accordo con Strickland and Parsons (1972) in campioni di colture filtrati su filtri GF/F WHATMAN (Ø 47 mm, porosità 0.7 µm), raccolti in bottiglie di polietilene da 250 ml precedentemente lavate con acido cloridrico, e conservati a - 20°C al buio fino al momento dell'analisi.

#### 3.2.1 Determinazione dell'azoto ammoniacale con kit Hach Lange, metodo al reattivo di Nessler

Per la determinazione dell'azoto ammoniacale, a 25 ml di campione sono stati aggiunti in un cilindro graduato 1 ml di Mineral Stabilizer® (Hach Lange), 3 gocce di Polivinil Alcohol e 1 ml di reattivo di Nessler (Fig. 3.2) agitando per inversione dopo ogni aggiunta. Dopo 1' (i.e., un minuto) è stata letta l'assorbanza a 425 nm contro il bianco e ricavata la concentrazione di azoto ammoniacale in funzione di una curva di taratura precedentemente costruita su diluizioni seriali di uno standard a concentrazione nota.



Fig. 3.2 Reagenti utilizzati per l'analisi dell'azoto ammoniacale.

### 3.2.2 Determinazione del fosforo reattivo

Per la determinazione del fosforo reattivo disciolto 50 ml di campione sono stati fatti reagire con 5 ml di 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 acqua distillata), una soluzione di acido ascorbico (27 g in 500 ml di acqua distillata) e una di tartrato di potassio e antimonile (0,34 g in 250 ml di acqua distillata), aggiunte nella proporzione 2:5:2:1. L'eteropoliacido risultante dalla reazione è ridotto dando una colorazione blu la cui estinzione viene misurata a 885 nm (fig. 3.3). La concentrazione di fosforo reattivo è calcolata in funzione di una curva di taratura precedentemente costruita su diluizioni seriali di uno standard a concentrazione nota.



Fig. 3.3 Reazione colorimetrica per l'analisi dei fosfati

### 3.2.3 Determinazione dell'azoto nitrico

Per la determinazione dell'azoto nitrico, i campioni filtrati sono stati diluiti con acqua di mare sintetica fino ad un volume di 100 ml. Oltre ai campioni sono stati preparati un bianco (costituito esclusivamente da acqua di mare sintetica) e uno standard (concentrazione di azoto nitrico  $140 \text{ mg l}^{-1}$ ). Ai campioni, allo standard e al bianco così preparati sono stati aggiunti 2 ml di cloruro di ammonio ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ ) al 25%. Successivamente i campioni sono stati percolati in una colonna di vetro contenente cadmio ramato per la riduzione dei nitrati a nitriti. Al campione ridotto sono stati quindi aggiunti 2 ml di una soluzione di Solfanilammide all'1%, e dopo 3 minuti, 1 ml di soluzione di Naftiletilendiammina allo 0,1%. Dopo 15 minuti di attesa per il completamento della reazione colorimetrica (fig. 3.4) è stata determinata allo spettrofotometro l'assorbanza del campione a 543 nm contro acqua distillata, usando una cuvetta con cammino ottico da 1 cm. Per la determinazione della concentrazione di azoto nitrico è stata applicata la seguente formula:

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

dove:

abs c = assorbanza del campione;

V = volume di acqua prelevata per analisi;

per il calcolo del fattore F si applica la seguente formula:

$$F = [\text{N}] \text{ di NO}_3 (0.14 \text{ ppm}) / \text{abs (st m) - abs (bianco)}$$

dove:

abs (st m) = assorbanza dello standard



Fig. 3.4 Reazione colorimetrica per l'analisi dei nitrati

### 3.3 Valutazione della crescita algale

#### 3.3.1 Conteggio e suddivisione in classi dimensionali

Aliquote di 50 ml delle colture algali sono state fissate con una soluzione di Lugol (concentrazione finale 1%; Thronsen, 1978) e quindi acidificate con acido cloridrico (concentrazione finale 4 mM) per favorire la disgregazione degli aggregati muciluginosi tipici di *O. cf. ovata* (Fig. 3.5). La conta delle microalghe è stata effettuata in triplicato su 1 ml di coltura fissata posto in una camera di sedimentazione per un tempo di circa 5 minuti. Il conteggio è stato effettuato in accordo con la metodica di Utermöhl (Hasle, 1978) utilizzando un microscopio rovesciato (Axiovert 100 ZEISS) con ingrandimento 320x, in campo chiaro e con contrasto di fase. Per il conteggio sono state prese in considerazione le cellule che si trovano nell'area di un rettangolo che ha come dimensioni il diametro del campo inquadrato dall'oculare (a) e il diametro della camera di sedimentazione (b). Sono stati contati diversi diametri (almeno 4) in modo da diminuire l'errore di conteggio. Per definire l'abbondanza totale di microalghe si procede calcolando la media delle alghe contate nei diversi diametri e si moltiplica per un fattore (F) ottenendo così il numero di cellule algali presenti in un millilitro di coltura. Il fattore F si ottiene in base al rapporto tra l'area della camera di sedimentazione e l'area del rettangolo ( $a \times b$ ).



Fig. 3.5 Aggregati muciluginosi di *O. cf. ovata* al microscopio ottico, ingrandimento 200x.

Inoltre, per ogni campione le abbondanze cellulari di *O. cf. ovata* sono state suddivise in due classi dimensionali (Vanucci et al., 2012a; Fig. 3.6) in base alla loro misura maggiore (i.e., diametro dorsoventrale; DV) come di seguito riportato: cellule di classe 1 ( $DV < 40 \mu\text{m}$ ) e cellule di classe 2 ( $DV \geq 40 \mu\text{m}$ ).

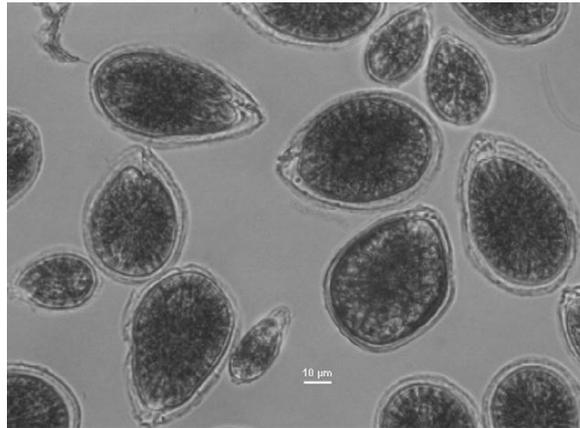


Fig. 3.6. Cellule piccole (classe 1) e grandi (classe 2) di *O. cf. ovata* in coltura al microscopio ottico. Per gentile concessione di Vanucci e colleghi.

### 3.3.2 Curva di crescita in colture batch

La crescita delle cellule algali in colture batch (i.e., aggiunta iniziale di tutti i nutrienti necessari alla crescita cellulare senza aggiunte successive) presenta un andamento tipico sigmoidale, che consta di quattro fasi (fig. 3.7):

- 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. E' rappresentata dal tratto di curva con pendenza maggiore
- 3) **Fase stazionaria**, nella quale diminuisce il tasso di crescita della coltura, in conseguenza all'esaurimento dei nutrienti. Il numero di cellule rimane pressoché costante e la fase può durare diverse settimane.
- 4) **Fase di declino o di morte della coltura**. In questa fase i nutrienti si esauriscono sempre di più, e le cellule cominciano a morire, si lisano ed il loro numero totale diminuisce progressivamente.



Fig. 3.7. Esempio di curva di crescita.

La velocità di crescita specifica è stata calcolata per ogni condizione prendendo due punti della curva di crescita durante la fase esponenziale, corrispondenti a due valori di abbondanze cellulari,  $N_1$  e  $N_2$ , registrati ai tempi  $t_1$  e  $t_2$ , rispettivamente. Il tasso di crescita,  $\mu$ , è stato determinato applicando la seguente formula:

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

### 3.4 Stima delle abbondanze batteriche e virali totali con colorazione SYBR Gold

Un' aliquota opportuna di campione è stata filtrata su filtro con porosità  $0.02\mu\text{m}$  ( $\emptyset$  25 mm, ANODISC) previa fissazione con formalina (concentrazione finale 5%). Successivamente il filtro è stato marcato con 100  $\mu\text{l}$  di SYBR Gold 8X in TE buffer (10mM Tris-Cl; 1mM EDTA; pH 7.4-7.6) e incubato per 15-20' al buio in una petri sterile. Come vettore di montaggio del filtro sul vetrino copri oggetto sono stati utilizzati 20  $\mu\text{l}$  di Antifade solution (50% PBS, 50% glicerolo e 0.5% di acido ascorbico). Per il conteggio dei batteri e delle particelle virali sono stati osservati al microscopio in epifluorescenza con radiazione blu (480-495 nm) 20-40 campi in modo casuale su l'area del filtro. I virus sono stati discriminati dai batteri in base alle loro dimensioni (fig. 3.8).

Per la stima delle abbondanze batteriche e virali è stata applicata la seguente formula:

$$\text{Cell ml}^{-1} = (\text{N} \times \text{area di filtrazione} \times 1.05) / \text{area del campo} \times \text{V}$$

Dove:

N = numero medio di cellule nei campi esplorati

V = volume di campione filtrato (ml)

1.05 = fattore di correzione per campioni fissati con formalina

Area del campo = può corrispondere all'intero campo visivo o all'area di un reticolo inserito nell'oculare (mm<sup>2</sup>)

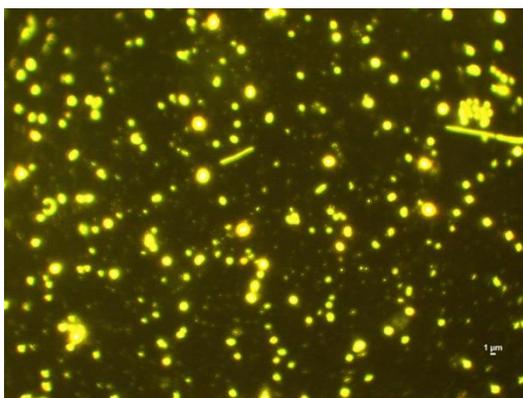


Fig. 3.8. Batteri e particelle virali in campioni di colture algali, ingrandimento 1000x.

### 3.5 Stima della frazione batterica altamente attiva tramite doppia colorazione con CTC e DAPI

Il 5-cyano-2,3-ditoly chloruro di tetrazolio (CTC) è un sale solubile che una volta aggiunto ed entrato nelle cellule batteriche precipita intracellularmente (formazione di formazano) quando viene biologicamente ridotto dalla respirazione dei batteri che presentano alti livelli di attività metabolica. Il sale precipitato se opportunamente eccitato, emette fluorescenza permettendo di discriminare le cellule batteriche altamente attive dal totale dei batteri presenti nel campione evidenziati tramite l'aggiunta del fluorocromo DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindolo diidrocloruro) che si intercala al DNA batterico.

Per la stima della frazione altamente attiva dei batteri (CTC<sup>+</sup>), a 900μl di campione di acqua di mare trasferiti in una eppendorf sterile, sono stati aggiunti 100 μl di CTC 50 mM. Il campione è stato incubato per 3 ore al buio alla temperatura *in situ* di prelievo e quindi fissato con 50 μl di formalina. Il campione è stato quindi sottoposto a colorazione con fluorocromo DAPI per la stima dei batteri totali. In breve, al campione sono stati aggiunti 20 μl di una soluzione di DAPI (1 mg ml<sup>-1</sup>) e tenuto al buio per 15', quindi è stato filtrato su filtro in policarbonato nero di porosità pari a 0,22 μm (Ø 25

mm, Nuclepore). Il filtri sono stati montati su vetrini portaoggetto tramite olio da immersione. Il conteggio batterico è stato effettuato al microscopio ad epifluorescenza eccitando con radiazione UV (340-380 nm, batteri totali) e successivamente con radiazione blu (480-495 nm, frazione batterica attiva, fig. 3.9) contando da 20 a 40 campi distribuiti in modo casuale su tutta l'area del filtro e un minimo di 600 cellule per campione. Per la stima della frazione batterica altamente attiva è stata applicata la formula presentata nel paragrafo 3.4 per la stima delle abbondanze batteriche e virali totali, quindi la frazione CTC<sup>+</sup> è stata espressa come percentuale dell'abbondanza batterica totale stimata con colorazione DAPI.

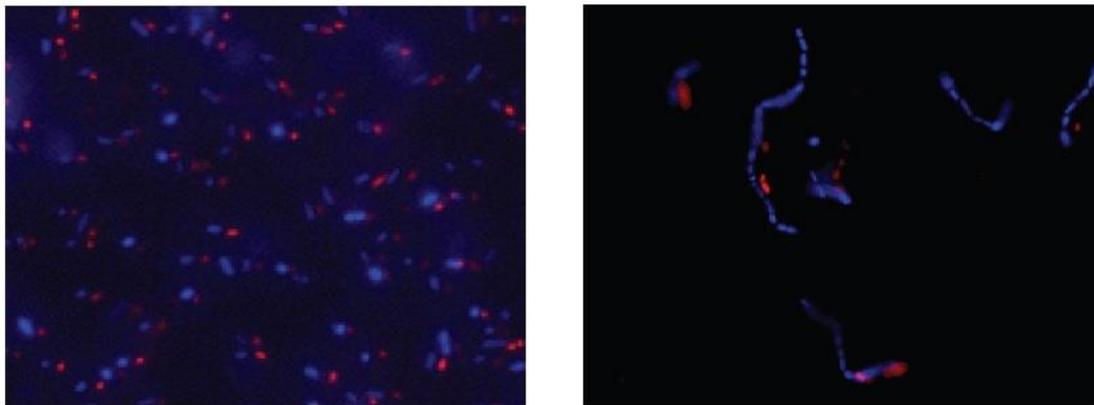


Fig. 3.9. Esempio di doppia colorazione con CTC (cellule rosse) e DAPI (cellule blu-violetto).

### **3.6 Analisi filogenetica delle comunità batteriche**

#### **3.6.1 Raccolta ed estrazione del DNA batterico**

I campioni per l'analisi filogenetica della comunità batterica sono stati ottenuti filtrando sotto cappa sterile un massimo di 100 ml di coltura algale su filtri in polyethersulfone Supor 200 da 25 mm (porosità 0.2  $\mu\text{m}$ ; Pall Corp), conservati a - 80°C in eppendorf sterili da 2 ml fino al momento dell'estrazione.

Per l'estrazione del DNA dai filtri è stato utilizzato il kit ZR Soil Microbe DNA MiniPrep (Zymo Research), seguendo le istruzioni del fornitore. Il kit permette di isolare facilmente e rapidamente i frammenti di DNA da batteri difficili da lisare. I filtri tagliati in almeno otto parti con forbici sterili sono stati inseriti in tubi per lisi (ZR BashingBead™ Lysis Tube) dove le membrane batteriche vengono lisate dall'azione meccanica di apposite sfere, in un unico buffer di lisi. Il DNA estratto è stato quindi sequenzialmente filtrato e lavato con appositi buffer di lavaggio per eliminare la presenza di acidi umici e polifenoli che vanno ad inibire il successivo processo di

amplificazione. Il DNA estratto è stato conservato in eppendorf sterili da 2 ml fino al momento delle analisi successive.

### 3.6.2 Quantificazione del DNA

Il DNA estratto è stato quantificato per via fluorimetrica utilizzando un fluorimetro Qubit® 2.0 (Life Technologies, fig. 3.10) utilizzando il kit per DNA a doppio filamento ad alto range di concentrazione Qubit® double strand DNA Broad Range.



Fig. 3.10. Fluorimetro Qubit 2.0.

Il kit include i reagenti, il buffer di diluizione e gli standard. Il saggio di quantificazione è altamente sensibile pur utilizzando un volume di campione ridotto (1-20 $\mu$ l). Prima di eseguire la lettura al fluorimetro è stata preparata la working solution fornita con il kit in diluizione 1:200, quindi si è proceduto con la preparazione degli standard e dei campioni caricando, in tubi da PCR di 0.5 ml, 190  $\mu$ l di working solution e 10  $\mu$ l di ogni standard e 195  $\mu$ l di working solution e 5  $\mu$ l di campione. I tubi sono stati vortexati per 2-3'' (i.e., 2-3 secondi) ed incubati per 2 minuti al buio prima di effettuare le letture.

### 3.6.3 Amplificazione del DNA batterico

Le regioni ipervariabili V1-V2 del gene batterico che codifica per la subunità 16S dell'RNA ribosomale ( $\approx$  330 paia di basi in *E. coli*, fig 3.11) sono state amplificate con i primers batterici universali 8F (5' - AGAGTTTGATCCTGGCTCAG - 3') e 338R (5' - GCTGCCTCCCGTAGGAGT - 3').

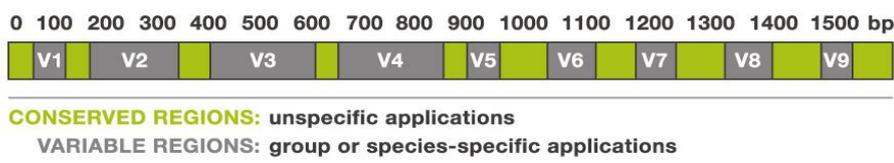


Fig. 3.11. Regioni conservative e ipervariabili nel gene 16s rRNA.

Per ogni campione e per un controllo negativo sono state effettuate PCR in triplicato utilizzando per ogni reazione 1 µl di ciascun primer a una concentrazione iniziale 10 uM, 45 µl di Platinum Blue PCR Supermix (Life Technologies) contenente Taq DNA polimerasi, cloruro di magnesio (MgCl<sub>2</sub>) e nucleotidi trifosfati (i.e., dNTPs) in concentrazioni ottimali, e 4 µl di DNA templato.

Per il processo di amplificazione sono stati utilizzati i seguenti parametri:

Denaturazione iniziale a 94°C per 3', 35 cicli di 94°C per 45'', annealing a 55°C per 30'' ed elongazione a 72°C per 1'30'', seguiti da uno step di elongazione finale a 72°C per 10'.

Gli ampliconi sono stati visualizzati tramite elettroforesi di 40' a 120V su gel di agarosio al 2% (Fig 3.11). Per la marcatura degli acidi nucleici nel gel di agarosio è stato utilizzato il colorante GelRed (Biotium) mentre per la visualizzazione del gel è stato utilizzato il dispositivo BIO RAD® Gel Doc EZ Imager.

### 3.6.4 Purificazione

Per la purificazione dei prodotti di PCR in preparazione al sequenziamento è stato utilizzato il kit PureLink® PCR Purification (Life Technologies), seguendo le indicazioni del fornitore, al fine di rimuovere efficacemente primers, dNTPs, enzimi, e sali residui. Ad un volume del prodotto di PCR (50 µl) sono stati aggiunti a 4 volumi di binding buffer per consentire la ligazione del DNA al filtro posto all'interno di una spin column tramite centrifugazione a 9500 x g per un 1'. Quindi si è proceduto lavando il DNA con 650 µl di wash buffer e centrifugando a temperatura ambiente per 1' a 9500 x g. Il DNA è stato infine eluito in un tubo da centrifuga pulito con 50 µl di acqua grado PCR e conservato a -20°C fino al momento del sequenziamento. Un aliquota (5 µl) dei prodotti di PCR purificati è stata nuovamente visualizzata tramite elettroforesi su gel di agarosio al 2% per verificare l'esito positivo del processo.

### 3.6.5 Next generation sequencing e analisi bioinformatica delle sequenze

Il sequenziamento ad elevato parallelismo delle librerie in multiplex è stato effettuato presso il laboratorio di antropologia molecolare e biologia genomica del dipartimento di scienze biologiche, geologiche ed ambientali (BiGeA, Università di Bologna) tramite sequenziatore Ion Torrent PGM (i.e., Personal Genome Machine; fig. 3.12a/b) equipaggiato con chip Ion 316 v2, utilizzando il kit Ion sequencing 400 (Life Technologies) e seguendo le indicazioni della casa costruttrice. Il kit utilizzato, di recente realizzazione, è in grado di sequenziare amplificati con una lunghezza fino a 400 paia di basi (i.e., bp), fornendo la possibilità di sequenziare le regioni ipervariabili V1-V2 del gene 16S batterico in un'unica reads.



Fig. 3.12a. Ion torrent Personal Genome Machine.

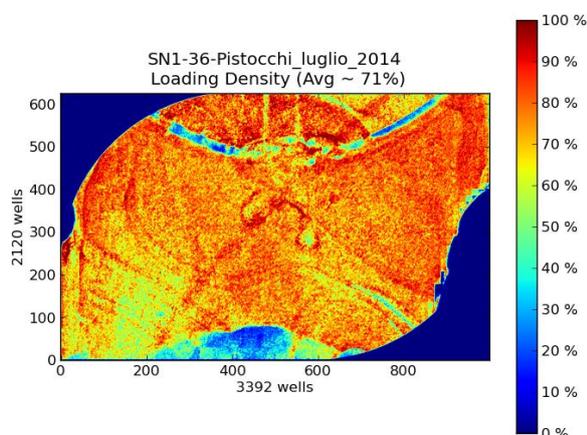


Fig. 3.12b. Efficienza di caricamento del chip con le sfere leganti le sequenze di DNA da sequenziare.

Dopo il sequenziamento, le sequenze sono state filtrate dal software del PGM in modo da rimuovere le sequenze di scarsa qualità e quelle policlonali. Le sequenze che presentavano i corretti adattatori (barcodes) sono state automaticamente trimate e raggruppate per campione. Tutte le sequenze non scartate dal controllo di qualità sono state esportate in formato fastQ e successivamente processate attraverso la pipeline del software Mothur (Schloss et al., 2009).

Brevemente, le sequenze con più di due errori nella sequenza del primer, qualsiasi base ambigua, omopolimeri più lunghi di 8 basi, sequenze più corte di 250 bp e sequenze con punteggio di qualità medio (i.e., q-value) < 20 sono state eliminate. Dopo il trimmaggio dei primers, le sequenze di buona qualità sono state allineate utilizzando il database di sequenze batteriche Silva come referenza (Pruesse et al., 2007). In seguito a screening, filtering, preclustering e rimozione delle chimere con algoritmo UCHIME (Edgar et al., 2011), le sequenze rimanenti sono state utilizzate per costruire una matrice di distanza con una distanza soglia di 0.1, quindi le sequenze batteriche con una similarità maggiore del 97% sono state raggruppate in operational taxonomic units (i.e., OTUs) attraverso l'algoritmo di farthest-neighbour (o complete-linkage) clustering e i singletons sono stati rimossi.

La sequenza rappresentativa per ogni OTU è stata classificata tassonomicamente utilizzando il classificatore Ribosomal Database Project naive Bayesian rRNA con una soglia di confidenza del 60% (Wang et al., 2007). Infine, i taxa ottenuti sono stati sommati per ogni campione a livello tassonomico di phylum, classe e genere.

I campioni sono stati normalizzati sulla dimensione della libreria più piccola (19662 reads) attraverso un sottocampionamento casuale delle sequenze in modo da poter confrontare la ricchezza e la diversità della comunità batterica; tutte le analisi sono state basate su OTUs al 97% di similarità.

L'estimatore di ricchezza specifica Chao 1 (Chao, 1984) è stato calcolato al fine di stimare il numero di OTUs osservate presente nei campioni. La diversità e l'omogeneità di distribuzione delle specie all'interno di ogni campione è stata stimata utilizzando l'indice di Shannon e l'equitabilità di Pielou, rispettivamente, mentre curve di rarefazione generate con il software Mothur sono state utilizzate per confrontare le relative diversità batteriche a livello di OTUs tra i campioni.

### ***3.6.6 Analisi downstream sulle comunità batteriche e analisi statistiche***

Tutte le analisi dei dati sulle comunità batteriche e le analisi statistiche sono state effettuate con il software PAST 3.x per Windows (Hammer et al., 2001). Differenze tra uptake dei nutrienti, abbondanze cellulari dei microorganismi e velocità di crescita di *O. cf. ovata* sono state testate lungo le diverse fasi di crescita tramite analisi della varianza (ANOVA). Le abbondanze delle OTUs batteriche, previa trasformazione con radice quadrata, sono state utilizzate per costruire una matrice triangolare delle distanze tra i campioni a coppie, basata sulla metrica semiquantitativa di Bray-Curtis (Legendre e Legendre, 1998). Le differenze composizionali tra la comunità batterica free-living e quella più strettamente associata ad *O. cf. ovata*, e le variazioni tra le diverse fasi di crescita sono state mostrate graficamente tramite ordinamento multidimensionale non metrico (i.e, nMDS) costruito a partire della matrice precedentemente descritta. Brevemente, l'algoritmo di nMDS colloca i punti in un sistema a due o tre coordinate dimensionali in modo da rispettarne i ranghi tra le distanze (Taguchi e Oono, 2005). La significatività statistica è stata stabilita a  $p < 0.05$  per tutte le analisi.



## 4-RISULTATI E DISCUSSIONI

### 4.1 Nutrienti e rapporto N/P

Il grafico rappresentato nella figura 4.1 mostra l'andamento della concentrazione dei nitrati ( $\text{N-NO}_3^-$ ) nella coltura di *Ostreopsis cf. ovata* in presenza dei batteri che si sono selezionati nelle colture batch della microalga (vedi paragrafo 3.1, Materiali e Metodi).

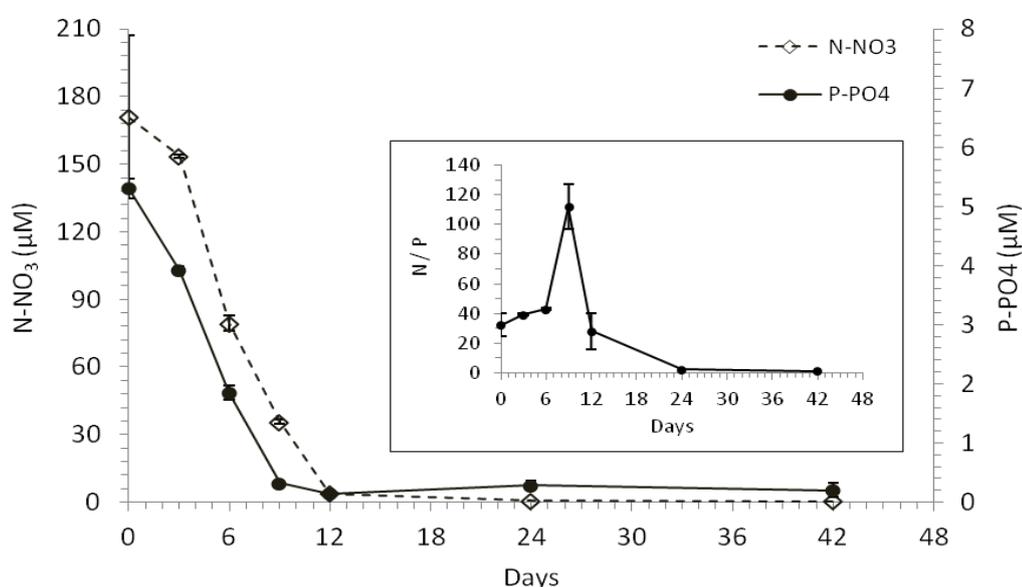


Fig. 4.1 - Concentrazione di azoto ( $\text{N-NO}_3$ ) e fosforo ( $\text{P-PO}_4$ ) inorganici disciolti nel mezzo in colture batch di *O. cf. ovata* e rapporto N/P. Le barre indicano la deviazione standard.

La concentrazione dei  $\text{N-NO}_3^-$ , pari a  $171 \mu\text{M}$  all'inizio dell'esperimento, diminuisce notevolmente nei primi 12 giorni quando si registra un valore pari a  $3.8 \mu\text{M}$ , 50 volte inferiore a quello iniziale; nei giorni successivi la concentrazione scende ulteriormente a valori inferiori ad  $1 \mu\text{M}$ . Il trend della velocità di uptake è riportato in Fig. 4.2; la velocità massima di uptake di  $\text{N-NO}_3^-$  si rileva tra il giorno 3 ed il giorno 6, ( $19.9 \text{ pmol cell}^{-1} \text{ day}^{-1}$ ; ANOVA,  $p < 0.05$ ).

La concentrazione dei fosfati ( $\text{P-PO}_4^{3-}$ ; Fig. 4.2), con valore iniziale pari a  $\sim 5 \mu\text{M}$  e valori inferiori a  $0.3 \mu\text{M}$  al giorno 12, mostra un incremento al giorno 24 rispetto al giorno 12 per poi nuovamente diminuire. La velocità massima di

uptake di  $\text{P-PO}_4^{3-}$  precede temporalmente quella di  $\text{N-NO}_3^-$  collocandosi tra il giorno 0 ed il giorno 3, con un valore massimo di  $0.75 \text{ pmol cell}^{-1} \text{ day}^{-1}$  (Fig. 4.2 ; ANOVA,  $p < 0.05$ ).

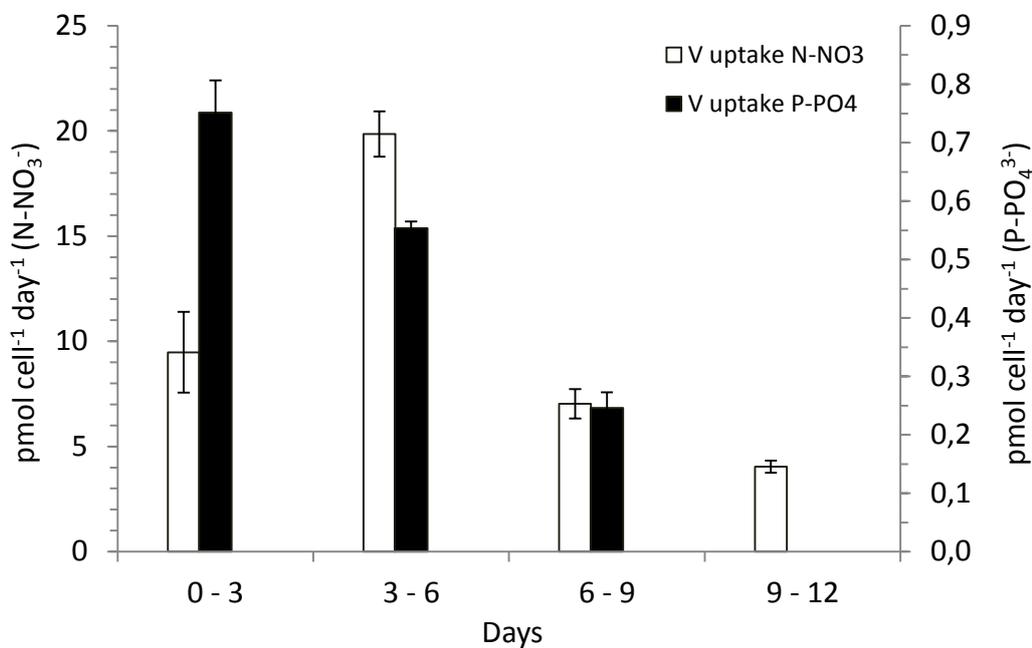


Fig. 4.2 - Velocità di uptake di azoto ( $\text{N-NO}_3^-$ ) e fosforo ( $\text{P-PO}_4^{3-}$ ) inorganici nelle colture batch di *O. cf. ovata*. Le barre indicano la deviazione standard.

Il rapporto fra la concentrazione dei nitrati e dei fosfati calcolato su base molare N/P all'inizio dell'esperimento risulta pari a 32 evidenziando un picco al giorno 9 ( $\text{N/P} = 112$ ), ovvero al termine della fase esponenziale di crescita cellulare di *Ostreopsis cf. ovata* (vedi paragrafo 3.2) e a seguito principalmente del forte depauperamento di  $\text{P-PO}_4^{3-}$ . Successivamente in tarda fase stazionaria (24-42 gg) i valori risultano nettamente inferiori ( $\text{N/P} \sim 1-2$ ) a seguito del depauperamento di entrambi i nutrienti (Fig. 4.1).

#### 4.2 Curve di crescita di *Ostreopsis cf. ovata* e dimensioni cellulari

L'inoculo di partenza nelle colture di entrambe le repliche è stato di circa  $300 \text{ cell ml}^{-1}$  di *Ostreopsis cf. ovata*. Si osserva una rapida crescita (tasso di crescita  $\mu_{0-6} = 0.24 \text{ giorno}^{-1}$ ) dell'alga ed una fase esponenziale che termina al giorno 9, al quale si raggiunge il massimo di densità cellulare di  $2.63 \times 10^3 \pm 9.55 \times 10^1 \text{ cell ml}^{-1}$  (Fig. 4.3). Segue una fase stazionaria nella quale si evidenzia una flessione di abbondanza al giorno 32 ( $2.35 \times 10^3 \pm 2.15 \times 10^2 \text{ cell ml}^{-1}$ ) per poi osservare un

lieve aumento al giorno 42 ( $2.50 \times 10^3 \pm 1.02 \times 10^2$  cell ml<sup>-1</sup> ; Fig. 3.3), sebbene non significativo (ANOVA,  $p > 0.05$ ).

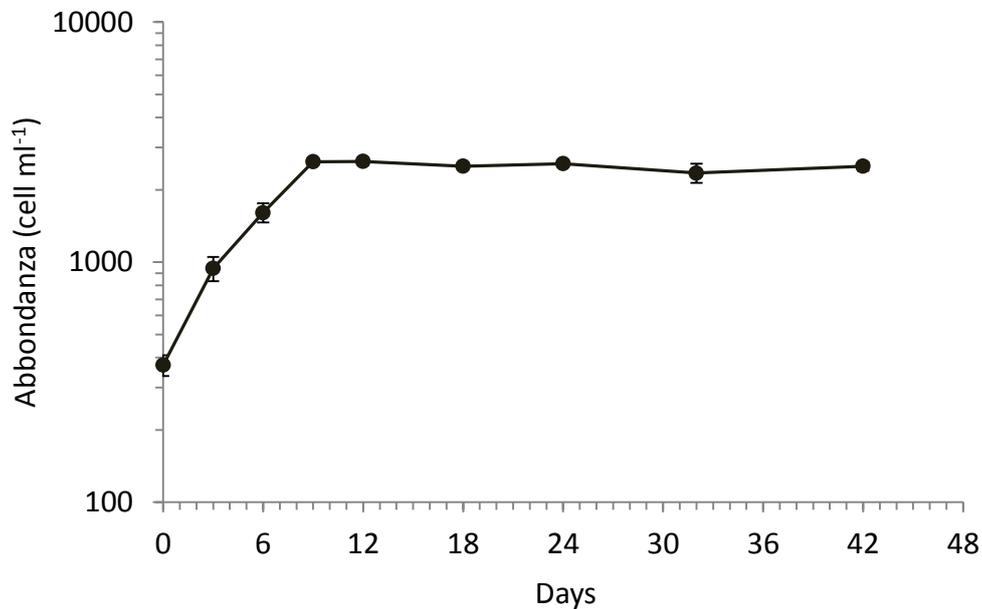


Fig. 4.3 - Curva di crescita di *O. cf. ovata* (cell ml<sup>-1</sup>) in colture batch. Le barre indicano la deviazione standard.

Il trend di crescita osservato in questo studio mostra alcuni aspetti simili a quelli riportati recentemente da Pezzolesi et al. (2014), sempre per *O. cf. ovata* in colture non axeniche, come ad esempio l'incremento cellulare osservato in tarda fase stazionaria; diversamente, la durata della fase esponenziale è risultata maggiore (9 vs 7 giorni, rispettivamente questo studio e Pezzolesi et al. 2014) e la densità cellulare massima raggiunta dimezzata rispetto a quelle osservate da Pezzolesi et al. (2014). Inoltre, l'autore ha riportato tassi intrinseci di crescita in fase esponenziale quasi doppi rispetto a quelli osservati in questo studio ( $\mu_{1-5} = 0.45$  e  $\mu_{0-6} = 0.24$ , rispettivamente). Tali differenze potrebbero essere imputabili a caratteristiche fisiologiche e genetiche proprie dei ceppi utilizzati, isolati da regioni costiere diverse del Mar Adriatico (in prossimità di Bari e Ancona, rispettivamente). L'incremento di abbondanza in tarda fase esponenziale potrebbe essere attribuibile ad un riciclo di nutrienti a seguito dell'attività batterica e/o di rinnovata disponibilità di sostanza organica utilizzabile da *O. cf. ovata*, nota

quale alga mixotrofa (Furlan et al., 2013; Accoroni et al., 2014; Pezolesi et al., 2014).

La struttura dimensionale della popolazione di *O. cf. ovata* nelle colture era costituita da cellule piccole e da cellule grandi, non sovrapponibili in dimensioni, distinte in classe 1 (< 40 µm DV) e classe 2 (> 40 µm DV), rappresentando in media rispettivamente il 10 ed il 90% dell'intera popolazione e non mostrando variazioni significative per tutto il ciclo di crescita (Fig. 4.4). Un trend di struttura dimensionale simile è stato osservato precedentemente in condizioni di rapporto N/P iniziali confrontabili (Vanucci et al., 2012a; Pezolesi et al., 2014), mentre strutture dimensionali differenti, in particolare caratterizzate da percentuali maggiori di cellule di classe 1, sono state ottenute in esperimenti condotti in carenza iniziale di nitrati o in assenza di batteri (Vanucci et al., 2012a; Vanucci et al., 2012b).

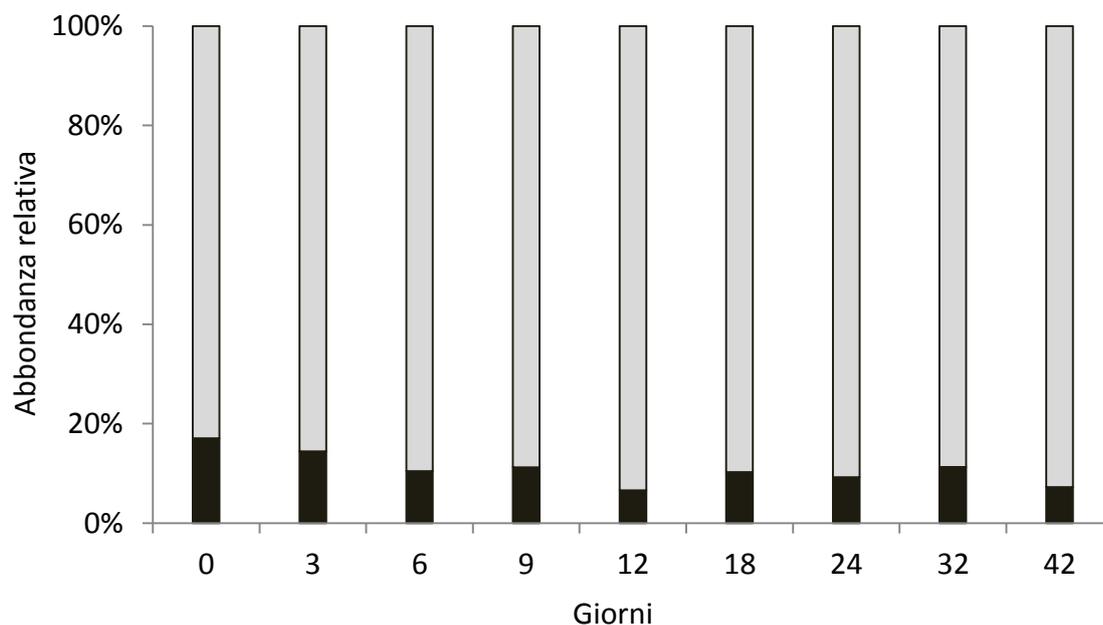


Fig. 4.4 - Contributo relativo (%) delle due classi dimensionali sul totale delle cellule di *O. cf. ovata* in colture batch ai diversi giorni.

### 4.3 Curve di crescita dei batteri totali e dei batteri CTC<sup>+</sup>

L'abbondanza ed il pattern temporale dei batteri totali, dei batteri con elevata attività respiratoria (CTC<sup>+</sup>) e dei virus nella condizione sperimentale sono stati valutati durante la crescita di *O. cf. ovata*. Nell'arco di tempo considerato, i batteri totali hanno mostrato una variazione di densità cellulare di oltre un ordine di

grandezza ( $7.24 \times 10^5$  e  $2.01 \times 10^7$  cell  $\text{ml}^{-1}$ , giorno 0 e giorno 24, rispettivamente; valore medio:  $9.41 \times 10^6 \pm 6.77 \times 10^6$  cell  $\text{ml}^{-1}$ ). Il trend temporale evidenzia una prima fase di crescita esponenziale (primo step di crescita) concomitante con la fase esponenziale della microalga (i.e. 0-9 gg ; Fig. 4.5), suggerendo un utilizzo dei nutrienti disponibili nel mezzo di coltura oltre che da *Ostreopsis*, anche da parte dei batteri in associazione con la disponibilità di sostanza organica liberata dall'alga in tale fase. Sebbene non si abbiano informazioni sulla qualità della sostanza organica rilasciata preferenzialmente nelle diverse fasi di crescita da parte di *O. cf. ovata*, è stato messo in evidenza che la produzione di proteine, il tasso di produzione delle tossine e la quantità relativa di rilascio di polisaccaridi da parte dell'alga è maggiore durante la fase esponenziale, mentre la quantità in termini assoluti di polisaccaridi e di lipidi nel mezzo, così come per le tossine, sono maggiori in fase stazionaria (Pezzolesi et al., 2014). Quindi si potrebbe ipotizzare che il primo step di crescita dei batteri sia coincidente con la disponibilità (il rilascio) di peptidi, aminoacidi, oltre che di oligosaccaridi e polisaccaridi, così come di composti intermedi del ciclo di Krebs (Wagner-Döbler et al., 2010, vedi oltre). Un'ulteriore fase di crescita (secondo step di crescita) dei batteri si osserva a partire dal giorno 12 e si protrae fino al giorno 24, raggiungendo il massimo di abbondanza pari a  $2.01 \times 10^7$  cell  $\text{ml}^{-1}$  in piena fase stazionaria della microalga (Fig. 4.5). Ciò suggerisce la presenza di batteri in grado di crescere in presenza di un'ampia disponibilità di sostanza organica sia a basso peso molecolare che ad alto peso molecolare (e.g. polisaccaridi, lipidi, frammenti cellulari) insieme ad una bassa concentrazione di nutrienti inorganici nel mezzo. Segue quindi una fase stazionaria con una leggera flessione dei valori osservati al 42esimo giorno.

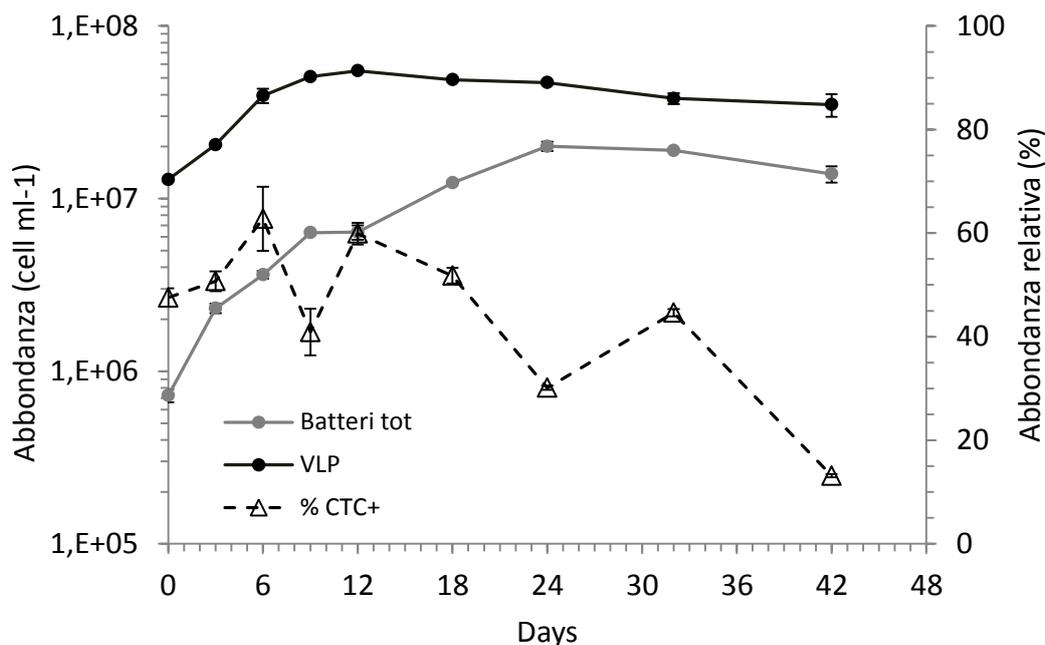


Fig. 4.5 - Curva di crescita dei batteri totali (cell ml<sup>-1</sup>), curva di crescita delle particelle virali (VLP, cell ml<sup>-1</sup>) e contributo relativo della frazione batterica altamente attiva (% CTC<sup>+</sup>) sul totale delle cellule batteriche in colture batch di *O. cf. ovata* ai diversi giorni. Le barre indicano la deviazione standard.

L'abbondanza dei batteri con elevata attività metabolica (CTC<sup>+</sup>), valutata tramite la capacità degli stessi di ridurre il composto formazano 5-cyano-2,3-ditoyl cloruro di tetrazolio (CTC; vedi M.M.), segue l'andamento dell'abbondanza batterica totale (dati non mostrati) rappresentandone in media il 45% (Fig. 4.5; corrispondente ad un valore medio pari a  $3.75 \times 10^6 \pm 2.46 \times 10^6$  cell ml<sup>-1</sup>). In particolare tale percentuale si attesta a valori pari al 50-60% dei batteri totali nei due step di crescita individuati, mentre scende notevolmente al giorno 42 (13%) ad indicare probabilmente la presenza di una percentuale maggiore di batteri morti e/o l'induzione di una crescita lenta a seguito di una condizione di depauperamento di sostanza organica di facile assimilazione e/o di degradazione ed un aumento relativo di materiale più refrattario (Lekunberri et al., 2012; Dinasquet et al., 2013). Gli elevati contributi relativi di CTC<sup>+</sup> registrati in questo studio sono difficilmente riscontrabili in ambienti naturali, in quanto le cellule batteriche con elevato metabolismo sono maggiormente soggette ad attacco virale, a garanzia di successo nel trasferimento della progenie, oltre che a pressione predatoria da parte dei grazers (Del Giorgio and Gasol, 2008). L'assenza di una attività virale di tipo litico elevata riscontrata in questo studio (vedi oltre) potrebbe giustificare le alte percentuali di CTC<sup>+</sup> (Del Giorgio and Gasol, 2008; Breitbart et al., 2008).

#### 4.4 Pattern temporale dei virus

L'abbondanza delle particelle virali (virus like particle: VLP), ha mostrato un range di variazione contenuto di circa mezzo ordine di grandezza ( $1.29 \times 10^7$  e  $5.50 \times 10^7$  VLP l<sup>-1</sup>, giorno 0 e giorno 12, rispettivamente) ed un valore medio 4 volte superiore a quello dei batteri ( $3.86 \times 10^7 \pm 1.33 \times 10^7$  VLP ml<sup>-1</sup> e  $9.41 \times 10^6 \pm 6.77 \times 10^6$  batteri ml<sup>-1</sup>, rispettivamente). L'andamento temporale evidenzia un aumento delle concentrazioni virali in associazione al primo step (gg 0-9) ma non al secondo step di crescita dei batteri (i.e. gg 12-24), quando l'abbondanza virale rimane relativamente costante, tendenzialmente decrescente (Fig. 4.5). Ciò potrebbe suggerire che l'aumento dei virus sia maggiormente legato alla velocità di crescita dei batteri, più elevata nella prima fase rispetto alla seconda ( $\mu = 0.24$  e  $0.10$  giorno<sup>-1</sup>, per 0-9 gg e 12-24 gg, rispettivamente), piuttosto che all'abbondanza di quest'ultimi (Thingstad, 2000). La seconda fase di crescita batterica potrebbe essere caratterizzata da abbondanze più elevate di batteri a crescita più lenta e/o dalla parziale assenza in coltura di virus specifici (Breitbart et al., 2008) e/o da condizioni di lisogenia (Needham et al., 2013). Infatti, le due fasi di crescita batterica presentano dominanze di phyla e generi differenti (vedi oltre, paragrafo 4.5).

Il rapporto di abbondanza Virus:Batteri (VBR: virus to bacteria ratio ; Fig. 4.6), in media pari a 11 durante il primo step di crescita dei batteri (in concomitanza con la fase esponenziale di *O. cf. ovata*) e successivamente di 2.7, suggerisce infatti un controllo top-down piuttosto limitato sulla popolazione ospite nel primo step ed una condizione successiva di steady-state (Thingstad, 2000; Needham et al., 2013), particolarmente frequente in colture (Breitbart et al., 2008).

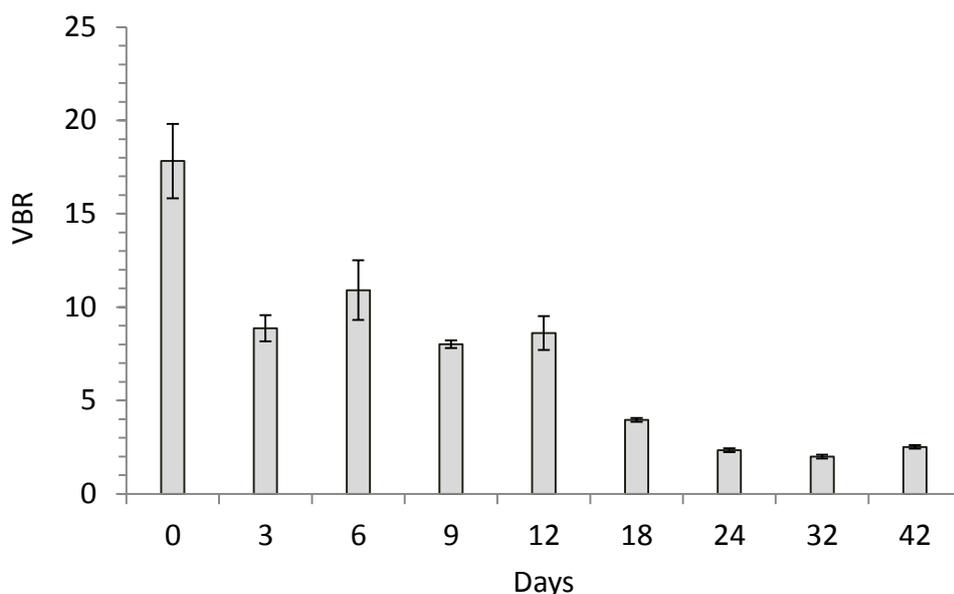


Fig. 4.6 - Andamento del rapporto tra particelle virali e batteri in colture batch di *O. cf. ovata* ai diversi giorni. Le barre indicano la deviazione standard.

#### 4.5 Analisi molecolare della comunità batterica tramite Ion torrent: struttura filogenetica e dinamiche temporali

Un totale di 302040 sequenze di alta qualità comprendenti le regioni ipervariabili V1-V2 del 16s rDNA sono state ottenute e processate in analisi downstream. In seguito a normalizzazione su 19662 sequenze per campione, un totale di 4783 Operational Taxonomic Units (OTUs) esclusi i singletons sono state rinvenute per l'intero dataset al 97% di similarità. Le analisi di rarefazione basate su tali OTUs, hanno mostrato che nessuna delle curve di rarefazione raggiungeva il plateau (Fig. 4.7), mentre la ricchezza batterica stimata (Chao 1), insieme alla diversità di Shannon ( $H'$ ) e all'equitabilità ( $J'$ ) non variava considerevolmente tra le diverse fasi di crescita di *O. cf. ovata* (Tab. 4.1).

Le stime di diversità delle comunità batteriche associate con *O. cf. ovata* erano nel range di valori ottenuti da analisi di pirosequenziamento di comunità batteriche trovate in un ampio spettro di associazioni batteri-invertebrati e in differenti ambienti (Vanucci et al., 2014 e riferimenti all'interno), con valori simili a quelli riportati da Vanucci e colleghi (Vanucci et al., submitted) in uno studio effettuato su un blooms di *O. cf. ovata* in ambiente. Studi precedenti in colture, disponendo di un limitato numero di sequenze, non avevano messo in luce

una così elevata ricchezza di specie nelle colture, individuando solamente i pochi taxa dominanti (Ashton et al., 2003; Pérez-Guzmán et al. 2008; Green et al., 2010).

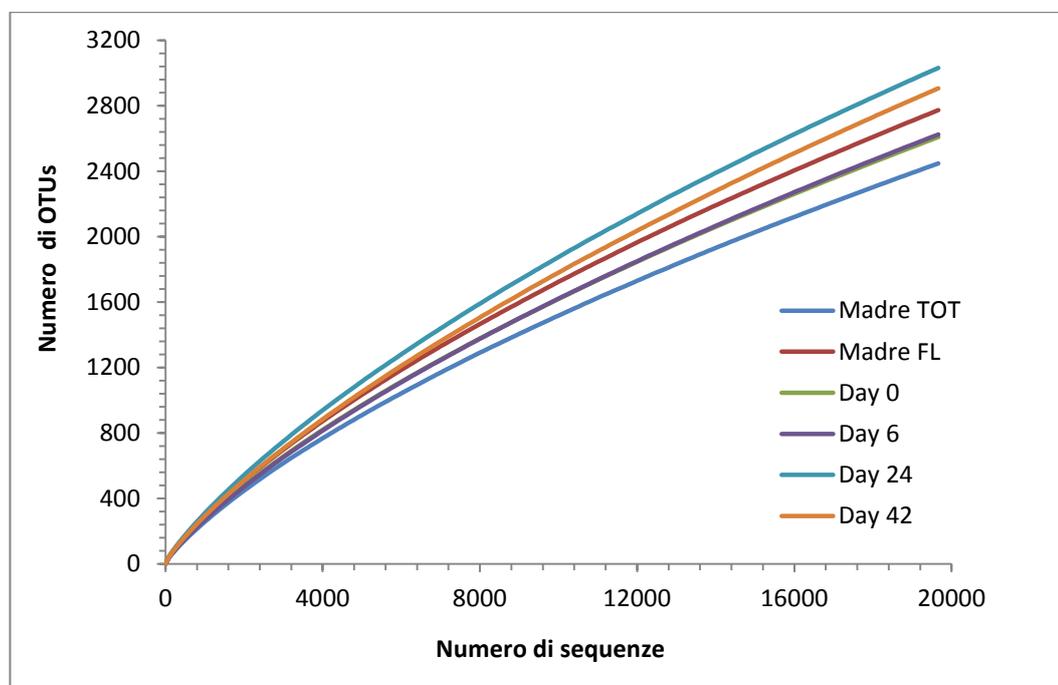


Fig. 4.7 - Diversità della comunità batterica in colture batch di *O. cf. ovata*. Le linee continue si riferiscono alla coltura madre in toto (Madre TOT) e al suo filtrato (Madre FL), le linee tratteggiate alle diverse fasi di crescita. Le curve di rarefazione sono state calcolate sulle OTUs batteriche ad un livello di similarità del 97%.

Campione	# reads	# OTUs	Chao 1	H' Shannon	J' Pielou
Madre TOT	19662	2447	6657	4.02	0.515
Madre FL	19662	2773	7934	4.69	0.591
Day 0	19662	2855	9351	4.53	0.569
Day 6	19662	2624	7361	4.26	0.541
Day 24	19662	3031	8376	4.62	0.577
Day 42	19662	2906	8233	4.54	0.570

Tab. 4.1 - Sommario delle sequenze totali normalizzate (# reads), numero di OTUs al 97% di identità (# OTUs), ricchezza batterica stimata (Chao 1), indice di diversità di Shannon (H') ed equitabilità (J') ottenuti dal sequenziamento massivo dei campioni di *O. cf. ovata* in colture batch.

La differenza di composizione della comunità batterica è stata rappresentata nelle diverse fasi di crescita di *O. cf. ovata* utilizzando il Multidimensional Scaling non-Metrico (nMDS) delle distanze di Bray-Curtis tra i campioni trasformati (con radice quadrata). Il grafico ha mostrato una chiara distinzione tra la comunità free-living (Madre FL) e la comunità in toto nella coltura madre (Madre TOT), inoltre variazioni nella composizione filogenetica della comunità sono emerse ad ogni fase di crescita di *O. cf. ovata* (Fig. 4.8). Nel complesso, 12 diversi phyla batterici sono stati individuati nel corso dello studio, di cui solamente 2 presenti con contributi relativi superiori all' 1% in almeno un campione (Fig. 4.9).

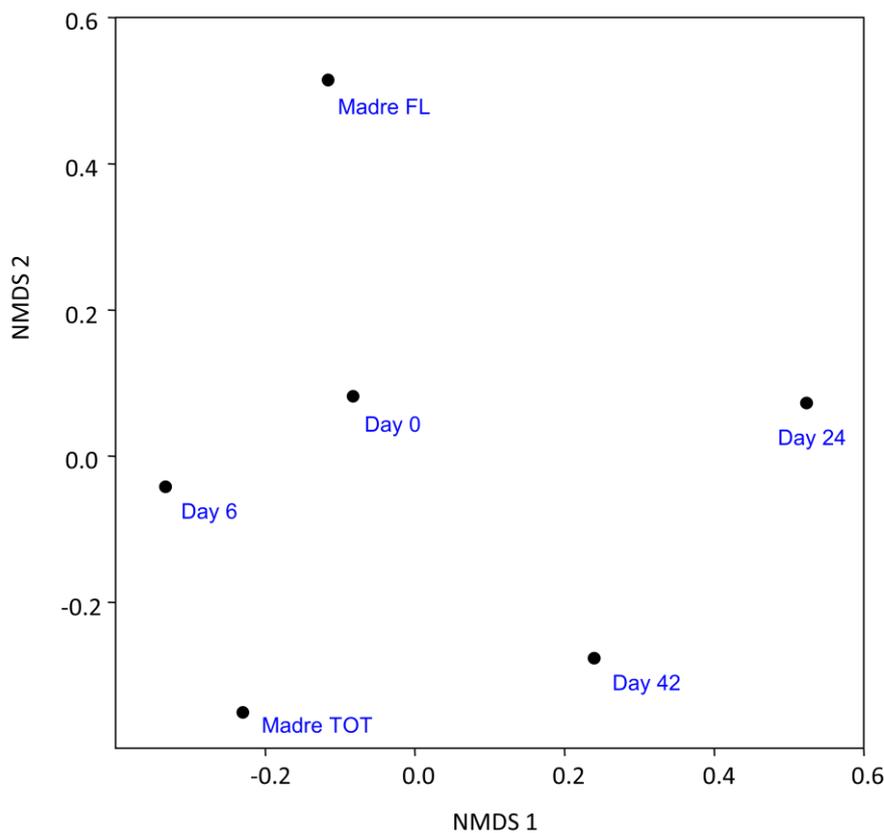


Fig. 4.8 - Multidimensional scaling non metrico della comunità batterica associata con *O. cf. ovata* in colture batch nelle diverse frazioni e nel corso delle diverse fasi di crescita. L'ordinamento è stato costruito con distanza di Bray-Curtis basandosi sulle OTUs batteriche rinvenute tramite sequenziamento massivo previa trasformazione delle abbondanze con radice quadrata. Madre TOT = comunità batterica tal quale nellacoltura madre; Madre FL = comunità batterica free-living

#### **4.5.1 Struttura filogenetica della comunità batterica totale e free living nella coltura madre di *O. cf. ovata***

In seguito al confronto tra la comunità batterica free-living e quella totale all'interno della coltura madre di *O. cf. ovata*, una minor abbondanza relativa di *Proteobacteria*, compensata da una maggior presenza di *Bacteroidetes*, è stata osservata nella prima rispetto all'ultima (79 e 94%, 20 e 6% per *Proteobacteria* e *Bacteroidetes*, rispettivamente, fig. 4.9).

Le differenze osservate per i phyla appena descritti sono dovute quasi esclusivamente alle rispettive classi *Alphaproteobacteria* (77 e 93%, comunità free-living e totale, rispettivamente) e *Sphingobacteria* (20 e 6%, Madre FL e Madre TOT, rispettivamente). Da segnalare la presenza di *Gammaproteobacteria* e *Betaproteobacteria* con contributi maggiori dell' 1% solamente nella frazione free-living della coltura madre (1.66 e 1.11%, rispettivamente; Fig. 4.10). Con riferimento agli *Alphaproteobacteria*, i generi *Labrenzia* e *Roseovarius* sono risultati più abbondanti nella frazione free-living della coltura madre rispetto alla comunità totale (13 e 2.4%, 27 e 2.3%, rispettivamente), mentre *Oceanicaulis* e *Dinoroseobacter* sono risultati meno abbondanti in tale frazione rispetto alla comunità tal quale (33 e 54%, 7 e 37%, rispettivamente; Fig. 4.11).

Per quanto concerne gli *Sphingobacteria*, il genere *Balneola* è risultato più abbondante nella frazione free-living rispetto alla comunità totale, come anche osservato per la famiglia *Flammeovirgaceae* (5 e 0.94% per *Balneola*, 15 e 3.8% per *Flammeovirgaceae*, rispettivamente; Fig. 4.11 e 4.12).

#### **4.5.2 Variazione temporale della comunità batterica associata ad *O. cf. ovata* nelle diverse fasi di crescita**

I range di seguito riportati per tutti i taxa si riferiscono ai contributi osservati nelle varie fasi di crescita di *O. cf. ovata* a partire dal giorno 0 senza contemplare la coltura madre totale ed il relativo filtrato.

Il microbiota di *O. cf. ovata* in coltura batch è risultato dominato da *Proteobacteria* e *Bacteroidetes*, che insieme hanno costituito più del 98% in abbondanza relativa ad ogni fase di crescita (Fig. 4.9). I *Proteobacteria* hanno mostrato il contributo massimo e minimo rispettivamente durante il primo step di crescita (esponenziale) e al termine del secondo step di crescita della comunità batterica, in corrispondenza rispettivamente della fase esponenziale e medio-

stazionaria di *Ostreopsis. cf. ovata* (97 e 66%, giorni 6 e 24, rispettivamente); mentre un trend inverso è stato osservato per i *Bacteroidetes* (2.7 e 34%, giorni 6 e 24, rispettivamente). Contributi simili per ognuno dei due phyla sono stati registrati all'inizio dell'esperimento e in tarda fase stazionaria (giorni 0 e 42, rispettivamente; Fig. 4.9). I phyla rari (i.e. con contributo < 1% in tutti i campioni) non sono riportati.

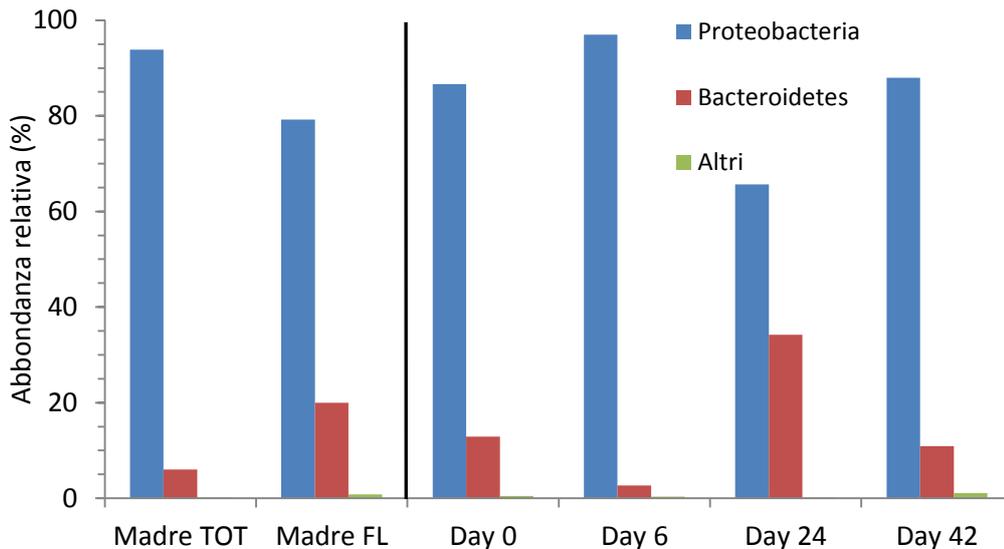


Fig. 4.9 - Contributo relativo dei phyla batterici più abbondanti ( $\geq 1\%$  in almeno uno dei campioni) individuati nella comunità batterica associata con *O. cf. ovata* in colture batch tramite sequenziamento massivo del gene 16S. 'Altri' comprende i phyla con contributo relativo inferiore all' 1%.

Esaminando la composizione filogenetica della comunità batterica ad un livello tassonomico inferiore, 17 classi e 150 generi sono stati riscontrati tra i vari campioni (dati non mostrati). Dalla figura 4.10, che riporta le 4 classi più abbondanti (contributo  $\geq 1\%$  in almeno un campione), emerge chiaramente come le variazioni precedentemente descritte per i due phyla *Proteobacteria* e *Bacteroidetes* nel controllo siano quasi totalmente ascrivibili a variazioni in contributo di membri appartenenti alle rispettive classi *Alphaproteobacteria* (range da 65 a 96%, giorni 24 e 6, rispettivamente) e *Sphingobacteria* (range da 2.4 a 34%, giorni 6 e 24, rispettivamente). Scendendo nel dettaglio (Fig. 4.11), tra gli *Alphaproteobacteria* il genere *Oceanicaulis* (range da 20 a 46%, giorni 24 e 0, rispettivamente), è risultato essere il taxon dominante all'inizio dell'esperimento, seguito da *Dinoroseobacter*, *Roseovarius* e *Labrenzia* (appartenenti al clade

*Roseobacter*) nell'ordine, per poi diminuire progressivamente d'importanza relativa fino al giorno 24 (alla fine del secondo step di crescita dei batteri; i.e. fase medio-stazionaria di *O. cf. ovata*) dapprima in favore del genere *Dinoroseobacter* (range da 25 a 38%, giorni 0 e 6, rispettivamente), che risultava il più abbondante in fase esponenziale (primo step), e successivamente in favore di *Labrenzia* (range da 7 a 35%, giorni 0 e 24, rispettivamente), taxon con il maggior contributo nel secondo step (fase medio-stazionaria di *O. cf. ovata*). In tarda fase stazionaria è stato invece osservato un aumento di *Oceanicaulis* in concomitanza con un calo in abbondanza relativa di *Dinoroseobacter* e *Labrenzia*. Infine, il genere *Roseovarius* (range da 3.7 a 12%, giorni 42 e 0, rispettivamente) ha mostrato un calo progressivo nel corso delle diverse fasi di crescita di *O. cf. ovata* (Fig. 4.11).

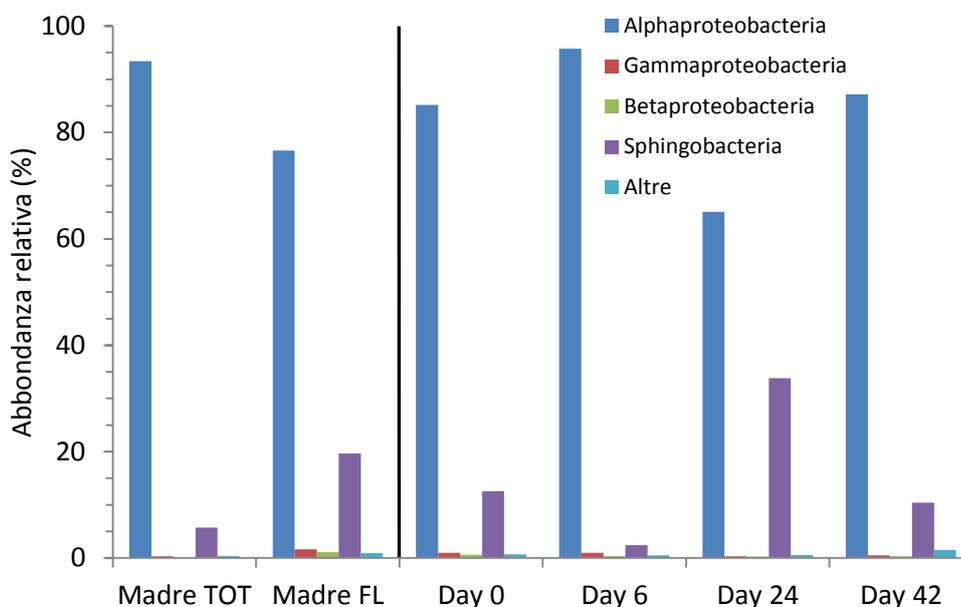


Fig. 4.10 – Contributo relativo delle classi batteriche più abbondanti ( $\geq 1\%$  in almeno uno dei campioni) individuate nella comunità batterica associata con *O. cf. ovata* in colture batch tramite sequenziamento massivo del gene 16S. 'Altre' comprende le classi con contributo relativo inferiore all' 1%.

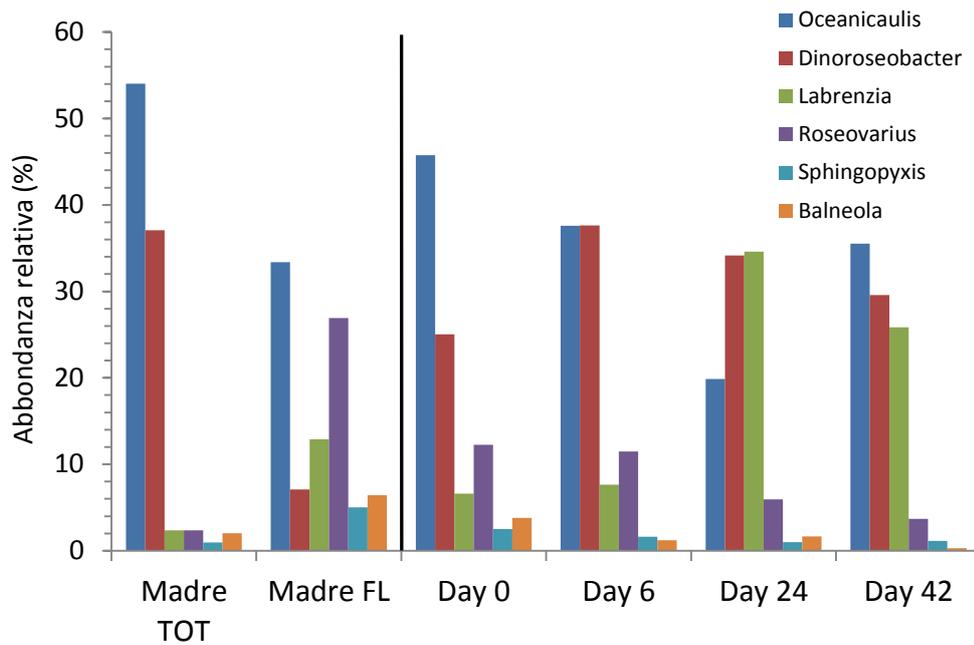


Fig. 4.11 - Contributo relativo dei maggiori generi batterici ( $\geq 1\%$  in almeno uno dei campioni) individuati nella comunità batterica associata con *O. cf. ovata* in colture batch tramite sequenziamento massivo del gene 16S.

Con riferimento agli *Sphingobacteria* (ph. Bacteroidetes), il trend precedentemente descritto (Fig. 4.10) è dovuto quasi esclusivamente a variazioni in abbondanza di membri non meglio identificati appartenenti alla famiglia *Flammeovirgaceae* (range da 1.20 a 32%, giorni 6 e 24 rispettivamente; Fig. 4.12), eccetto per un contributo aggiuntivo del genere *Balneola* al giorno 0 (3.8%; Fig. 3.11).

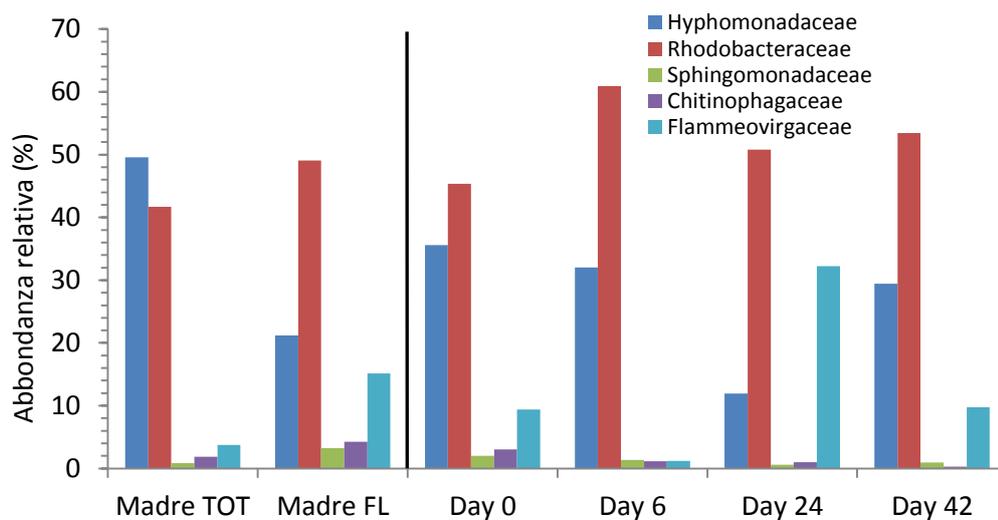


Fig. 4.12 – Contributo relativo delle maggiori famiglie batteriche ( $\geq 1\%$  in almeno uno dei campioni) individuate nella comunità batterica associata con *O. cf. ovata* in colture batch tramite sequenziamento massivo del gene 16S.

Sintetizzando, la comunità batterica associata ad *O. cf. ovata* in colture batch: **(i)** nel primo step di crescita fase esponenziale, risulta costituita quasi esclusivamente dalla classe *Alphaproteobacteria* (96%) con i generi *Oceanicaulis* (38%) e *Dinoroseobacter* (38%) dominanti; **(ii)** nella fase terminale del secondo step di crescita risulta composta da *Alphaproteobacteria* (65%), dominati dai generi *Labrenzia* (35%) *Dinoroseobacter* (34%) e *Oceanicaulis* (20%), e dalla classe *Sphingobacteria* (34%) quasi esclusivamente rappresentata da membri della famiglia *Flammeovirgaceae* (range 32%); **(iii)** nella fase stazionaria inoltrata (giorno 42) invece, si osserva un ripristino di una forte dominanza della classe *Alphaproteobacteria* (87%) con *Oceanicaulis* (35%), *Dinoroseobacter* (30%) e *Labrenzia* (26%).

I dati ottenuti in questo studio evidenziano che la comunità batterica associata ad *O. cf. ovata* nelle colture batch è fondamentalmente costituita da phylum *Proteobacteria* seguito dal phylum *Bacteroidetes*, i rimanenti phyla rilevati sono risultati rari. Il phylum dei *Proteobacteria* è stato rappresentato quasi esclusivamente dalla classe *Alphaproteobacteria* con pochi generi dominanti: *Oceanicaulis* (Fam. *Hyphomonadaceae*) e dai tre generi *Dinoroseobacter*, *Labrenzia* e *Roseovarius* appartenenti al clade *Roseobacter* (Hahnke et al., 2013) ed in grado di effettuare fotosintesi aerobica anossigenica (AAnP) (Biebl et al., 2005a; Biebl et al., 2005b; Biebl et al., 2007). Il phylum *Bacteroidetes*, è stato rappresentato quasi totalmente dalla classe *Sphingobacteria* con la famiglia *Flammeovirgaceae*.

La dominanza dei phyla *Proteobacteria* (in particolare gruppi appartenenti al clade *Roseobacter*) e *Bacteroidetes* osservata in questo studio è spesso una caratteristica delle comunità batteriche associate a blooms fitoplanctonici anche di dinoflagellate tossiche in ambiente che in colture batch (e.g. Garcés et al., 2007; Jones et al., 2010; Green et al., 2010; Vanucci et al., submitted). In particolare membri del clade *Roseobacter* sono tra i batteri marini più abbondanti ed ecologicamente rilevanti. Isolati e sequenze geniche appartenenti a questo gruppo tassonomico sono stati ottenuti da ambienti marini che spaziano dal ghiaccio marino, all'oceano aperto, ai reef corallini tropicali, agli habitat di superficie e quelli associati al sedimento, spesso in stretta associazione con il fitoplancton. Le loro nicchie ecologiche variano da plancton libero, a simbionti di spugne, a biofilm (revisione Geng and Belas, 2010; Hahnke et al., 2013). L'abilità di alcuni

generi nel degradare un elevato numero di sostanze organiche a basso peso molecolare come aminoacidi e dimetilsolfopropionato (DMSP) e altri composti aromatici definisce il loro ruolo funzionale all'interno della ficosfera di diverse specie algali tossiche (Jones et al., 2010 e referenze all'interno), inoltre la flessibilità nell'esprimere diversi metabolismi (vedi oltre) e nell'adottare diverse strategie vitali a seconda delle esigenze (e.g. passare da liberi nell'acqua ad associati al particolato organico, oppure da simbionti a parassiti dello stesso ospite algale) consente loro di adattarsi alle rapide variazioni di ossigeno e disponibilità di nutrienti e di sostanza organica che si verificano nel corso dei blooms algali (e.g. Amaro et al., 2005; Wagner-Döbler et al., 2010; Seyedsayamdost et al., 2011). Il phylum dei *Bacteroidetes* (noto anche come *Cytophaga/Flavobacteria/Bacteroidetes*), con le classi *Sphingobacteria* e *Flavobacteria* è in grado di ossidare dimetilsolfuro (DMS) a dimetilsolfossido (DMSO), comprende diversi gruppi batterici con crescita più lenta rispetto ad *Alpha* e *Gammaproteobacteria*, capaci di degradare composti organici ad alto peso molecolare come cellulosa, chitina, pectina, rivestendo un'elevata importanza nella microbial loop associata ai blooms di fitoplancton costieri, biofilms e sedimento marino (Hasegawa et al., 2007; Jones et al., 2010 e referenze all'interno). I *Cytophaga-Flavobacteria* (Cottrell & Kirchman, 2000; Fandino et al., 2001; Kirchman, 2002; Malmstrom et al., 2004; Celussi & Cataletto, 2007), sono stati anche proposti come potenziali ed importanti regolatori delle dinamiche degli HABs a seguito della loro supposta attività alghicida e di antagonismo verso altri batteri (Doucette et al., 1999; Mayali & Doucette, 2002; Roth et al., 2008a, b).

La struttura filogenetica della comunità batterica associata alle diverse fasi di crescita della microalga ha evidenziato una dominanza quasi assoluta degli *Alphaproteobacteria* sia in fase esponenziale che in fase stazionaria inoltrata (di senescenza) della microalga con i generi *Oceanicaulis* e *Dinoroseobacter* co-dominanti in ambedue le fasi, mentre nella fase stazionaria intermedia un terzo della comunità era rappresentata dai *Sphingobacteria* (famiglia *Flammeovirgaceae*) e gli *Alphaproteobacteria* rappresentati principalmente dai generi *Labrenzia*, *Dinoroseobacter*, seguiti da *Oceanicaulis*. Il numero limitato dei generi (ed un'unica famiglia per gli *Sphingobacteria*) rilevanti nella dinamica della comunità batterica ed in associazione alla crescita della microalga suggerisce

che la condizioni di coltura abbiano indotto una forte pressione selettiva sulla comunità batterica presente in natura in associazione alla microalga (Vanucci et al., submitted), e verosimilmente sulla base: (i) della capacità di sopravvivenza dei differenti gruppi batterici in coltura (Jasti et al., 2005; Green et al., 2004, 2010); (ii) di associazioni di tipo simbiotico e/o mutualistico con la microalga o saprofitico (azione scavenger) su cellule algali morte (Wagner-Döbler et al., 2010; Mayali et al., 2011); (iii) di interazioni mutualistiche e/o competitive fra batteri; (iv) di capacità di sopravvivenza dei virus in condizioni batch, condizioni steady-state virali e/o su resistenza all'infezione virale. L'insieme di tutte queste interazioni hanno verosimilmente contribuito a determinare il consorzio microbico associato alla microalga in coltura batch.

Inoltre, il trend successionale osservato nella comunità batterica rispecchia, verosimilmente e principalmente (i) la variabilità temporale delle risorse inorganiche ed organiche disponibili nelle diverse fasi con un complessivo effetto bottom up, differente sulle diverse popolazioni batteriche che appunto si sono susseguite e, marginalmente, (ii) un'azione di controllo top down esercitato dai virus. Come menzionato precedentemente, l'attività virale riconducibile a cicli litici sembra essere piuttosto modesta e limitata al primo step di crescita dei batteri e la presenza di specie batteriche virus resistenti non può essere esclusa (vedi oltre); il trend successionale potrebbe suggerire che il modesto effetto top down sia stato maggiore sul genere *Oceanicaulis*, sebbene la mancanza di una identificazione genetica dei virus non permetta di confermare tale ipotesi. La dinamica temporale a livello di phyla e classi osservato in questo studio, sebbene non confrontabile con precedenti trend per altre dinoflagellate tossiche in condizioni di coltura in quanto mancanti, è parzialmente confrontabile con osservazioni in campo seguendo andamenti temporali di blooms algali tossici (Jones et al., 2010; Mayali et al., 2011; Vanucci et al., submitted), ciò a seguito del fatto che gli *Alphaproteobacteria* sono riconosciuti generalmente r-strateghi mentre i *Bacteroidetes* k-strateghi (Skerratt et al., 2002; Weinbauer et al., 2006; Mann et al., 2013).

La dominanza dei generi *Oceanicaulis* e *Dinoroseobacter* in stadi di crescita dell'alga così diversi in termini di concentrazione di nutrienti inorganici, di qualità di sostanza organica e/o di sorgente e di concentrazione di micronutrienti (e.g. vitamine) disponibili è probabilmente da attribuire all'elevata

plasticità metabolica dei due generi. Il genere *Oceanicaulis*, con la specie *Oceanicaulis alexandrii*, è stato proposto per la prima volta per l'affiliazione filogenetica di alcuni ceppi batterici isolati da colture non tossiche di *Alexandrium tamarense* (Strömpl et al., 2003). Successivamente altri ceppi sono stati isolati per esempio dal Mar dei Sargassi (Oh et al., 2011) o dalla madrepora *Stylophora pistillata* (Chen et al., 2012). I batteri appartenenti a questo genere sono prostecati dimorfici: con prosteca (non mobili) o senza prosteca (mobili). La prosteca rappresenta un'efficiente antenna per catturare ed assimilare ioni fosfato (tramite trasportatori) anche a concentrazioni ambientali bassissime, rendendo verosimilmente i batteri prostecati competitivi in condizioni di forte depauperazione di fosforo (McAdams, 2006). Originariamente si riteneva che i prostecati, appartenenti anche ad altri generi, fossero esclusivi di ambienti oligotrofi, mentre successivamente sono stati isolati anche da ambienti eutrofici e dai trattamenti secondari di acque reflue (e.g. Fenton, 1994), evidenziando metabolismi versatili. Dal sequenziamento del genoma di *Oceanicaulis* sp., isolato dal Mar dei Sargassi, è stato messo in evidenza un tipico stile di vita chemoeterotrofo, oltre alla presenza di enzimi respiratori anaerobici e trasportatori di fosfato ad alta affinità (Oh et al., 2011). *O. alexandrii*, è in grado di ridurre il nitrato in nitrito, inoltre è in grado di sintetizzare la vitamina B<sub>1</sub>, vitamina B<sub>12</sub> e la vitamina B<sub>7</sub> (Stompl et al., 2003; Oh et al., 2011; Chen et al., 2012).

Anche il genere *Dinoroseobacter* è stato proposto per la prima volta per classificare come specie *D. shibae* ceppi batterici isolati da singole cellule di dinoflagellate tossiche in coltura, ovvero da cellule di *Alexandrium ostenfeldii* e da *Procentrum lima* (Biebl et al., 2005) e più tardi anche in *Prorocentrum reticulatum* (Wagner-Döbler et al., 2010 e referenze in esso riportate). Questi tre dinoflagellati causano la sindrome Diarrhetic Shellfish Poisoning e *Procentrum lima* è una dinoflagellata bentonica come *O. cf. ovata*, spesso presente in elevate abbondanze sia su substrati sabbiosi duri, sia su organismi bentonici (e.g. molluschi ed ostriche) che macroalghe e macrofite, formando biofilm. *D. shibae* è stato anche isolato da colture di specie algali non tossiche come *Isochrysis galbana* (classe *Haptophyceae*) coltivata per l'allevamento di bivalvi, ed in una varietà di microalghe marine cosmopolite (Wagner-Döbler et al., 2010). Quindi la simbiosi che si innesca non è né ospite-specifica né legata esclusivamente ad alghe tossiche. *D. shibae* risulta spesso in stato di epibionte delle specie *Alexandrium*

*ostenfeldii* e *Procentrum lima*, sebbene possa trovarsi anche come batterio free living nel mezzo (Wagner-Döbler et al., 2010). Il vantaggio della relazione simbiotica fra microalga, ed in particolare fra dinoflagellate e fra quest'ultime le dinoflagellate tossiche (particolarmente auxotrofe per le vitamine; Tange et al., 2010) e *Dinoroseobacter* sarebbe dovuto allo scambio di micronutrienti (i.e. vitamina B<sub>1</sub> e vitamina B<sub>12</sub>) sintetizzati a concentrazioni estremamente basse ma ad alto costo metabolico da parte del batterio e di sostanza organica prodotta tramite fotosintesi dall'alga e rilasciata per secrezione o escrezione (Wagner-Döbler et al., 2010). Infatti *D. shibae* è in grado di sintetizzare la vitamina B<sub>1</sub>, vitamina B<sub>12</sub>, ma non la vitamina B<sub>7</sub>, ovvero è auxotrofo per la biotina, similmente a molte specie appartenenti al clade *Roseobacter* (Shiba, 1991) compresi i generi *Labrenzia* e *Roseovarius* (vedi oltre) e a differenza di *Oceanicaulis alexandrii*. Sebbene non si abbiano informazioni, è plausibile presumere che al pari della quasi totalità delle dinoflagellate tossiche, *O. cf. ovata* sia auxotrofa per almeno alcune vitamine (e.g. B<sub>12</sub>, e/o B<sub>1</sub>, e/o B<sub>7</sub>; Tang et al., 2010). Quindi in questo studio è ipotizzabile che il genere *Oceanicaulis* garantisca l'apporto di B<sub>7</sub> all'alga e/o al consorzio microbico ad essa associato; sebbene i dati riportati non permettano di stabilire con certezza le specie appartenenti ai generi *Oceanicaulis* e *Dinoroseobacter* presenti in coltura, l'allineamento manuale delle sequenze geniche suggerisce fortemente che le specie rappresentate siano *Oceanicaulis alexandrii* e *Dinoroseobacter shibae*, rispettivamente (Guidi, com. pers.). Inoltre, l'aggiunta delle tre vitamine (B<sub>1</sub>, B<sub>7</sub>, B<sub>12</sub>) nel terreno utilizzato per l'allestimento delle colture sembra solo marginalmente interferire nelle associazioni batteri-alghe che si instaurano nelle colture (Abby et al., 2014). Il sequenziamento genomico completo di *D. shibae* ha permesso di evidenziare la capacità del batterio di utilizzare composti intermedi del ciclo di Krebs (e.g. fumarato, succinato, piruvato e citrato) che possono essere rilasciati sia durante la fotosintesi che dopo la morte cellulare dell'alga; di utilizzare prodotti del ciclo fotosintetico Calvin-Benson. Inoltre *D. shibae* è in grado di utilizzare dimetilsolfossido (DMSO) ed il nitrato come accettori di elettroni garantendo un'attività metabolica anche in condizioni di totale mancanza di ossigeno, quali per esempio i periodici stati anossici tipici di biofilm fotosintetici durante la notte, quando i processi respiratori superano quelli foto sintetici (Wagner-Döbler et al., 2010), ma che potrebbero formarsi anche all'interno delle colture di *Ostreopsis* in

micro-nicchie di ammassi mucilluginosi (vedi oltre). Il paradigma che il clade *Roseobacter* fosse costituito solo da aerobi obbligati è stato così rimesso in discussione (Wagner-Döbler et al., 2010; Ebert et al., 2013). *D. shibae* potrebbe quindi anche agire anche come scavenger di cellule morte durante il collasso dei blooms algali (Wagner-Döbler et al., 2010). *D. shibae* è dotato del più complesso sistema di difesa contro l'attacco virale finora individuato nei *Roseobacter* totalmente sequenziati, rendendolo ulteriormente competitivo rispetto ad altri batteri in habitat caratterizzati da forti pressioni virali (e.g. ambienti autotrofici, blooms algali, Wagner-Döbler et al., 2010).

Tali caratteristiche metaboliche potrebbero spiegare l'elevata importanza relativa del genere *Dinoroseobacter* sia nella fase esponenziale che nella tarda fase stazionaria di crescita di *O. cf. ovata* durante le quali si può supporre la liberazione di sostanza organica a basso peso molecolare per il rilascio cellulare nella prima e anche per rottura delle cellule nella tarda fase (Thornton 2014 e referenze in esso riportate). Inoltre recentemente è stato evidenziato che membri degli *Alphaproteobacteria* del *Roseobacter* clade associati a microalghe possono promuoverne la crescita (e.g. producendo antibiotici e stimolatori della crescita) o avere effetto algicida (producendo potenti sostanze algicide) in risposta alla presenza di sostanze di breakdown rilasciate dall'alga e che denotano l'invecchiamento della stessa (es. prodotti di breakdown della lignina). Tale comportamento è stato definito "Jekyll-and-Hyde chemistry" per il batterio *Phaeobacter gallaeciensis* (Seyedsayamdost et al., 2011). Questo comportamento non può essere escluso per *Dinoroseobacter* e per gli altri generi del *Roseobacter* clade ritrovati in questo studio. L'attività anaerobia e l'utilizzo di dimetilsolfopropionato (DMSP) che si presume sia prodotto anche da *O. cf. ovata* (Vanucci et al., submitted), potrebbero esplicitarsi anche nelle colture batch di *O. cf. ovata* da parte di *Dinoroseobacter* e di *Oceanicaulis* nella fase stazionaria quando l'elevata concentrazione dei polisaccaridi favorisce la formazione di grumi all'interno dei quali sono intrappolate le alghe, creando verosimilmente nicchie subossiche o anossiche a seguito dell'attività di degradazione; la presenza di ammonio (dati non mostrati) riscontrata in questa fase supporta questa ipotesi. La presenza di *Sphingobacteria* (k-strateghi, a crescita lenta), rappresentata dalla famiglia delle *Flammeovirgaceae*, nella fase medio stazionaria di *O. cf. ovata* potrebbe indicare la presenza di sostanza organica a più alto peso molecolare e/o

di più difficile attacco da parte dei batteri appartenenti al clade *Roseobacter*, fra cui polisaccaridi e fitodetrito, e forse anche macromolecole quali le tossine (Vanucci et al., 2012) prodotte dall'alga. Molte specie marine di *Bacteroidetes*, sono altamente specializzate nella degradazione di biopolimeri, quali proteine e polisaccaridi e fitodetrito (e.g. Kirchman, 2002; Mann et al., 2013). Le *Flammeovirgaceae* chemiorganotrofe, sono spesso associate alla mucillagine, costituita da molecole ad elevato peso molecolare, prodotta da microalghe (Nedashkovskaya et al., 2011). La presenza degli *Sphingobacteria* e la quasi assenza dei *Flavobacteria*, considerati molto simili dal punto di vista metabolico (sebbene i secondi più competitivi nei sedimenti anossici in presenza di materiale più refrattario; Mann et al., 2013) e presenti in ambiente durante i blooms algali di *O. cf. ovata* (Vanucci et al., submitted), potrebbe essere imputabile ad un'azione selettiva subita dai secondi, indotta dalle condizioni batch e/o da competizione tra gruppi di batteri anche tramite produzione di sostanze antibatteriche. Per esempio, *D. shibae* presenta la potenzialità di catalizzare la sintesi di un nuovo polichetide (metabolita secondario) che Wagner-Döbler et al. (2010) ipotizzano poter avere una azione antibatterica verso batteri che colonizzano la superficie delle dinoflagellate quali vibroni e *Flavobacteria*. Nella fase medio stazionaria di *O. cf. ovata* è anche un'abbondanza rilevante anche di *Labrenzia* che rimane simili anche in tarda stazionaria. Il genere *Labrenzia* è rappresentato da poche specie una delle quali, *L. alexandrii*, è stata isolata da singole cellule di una coltura tossica di *Alexandrium lusitanicum* (Biebl et al., 2007). Tale specie non è in grado di ridurre il nitrato ed è auxotrofa per la biotina e la tiamina e sembra utilizzare principalmente oligosaccaridi, polisaccaridi e ammine rilasciati dall'alga. Recentemente l'analisi strutturale ha evidenziato la presenza di R-bodies all'interno della cellula; i R-bodies sono presenti principalmente in endosimbionti obbligati come alcuni membri del genere *Caedibacter* ed hanno una funzione killer (Fiebig et al., 2013 e referenze in esso riportate). Al momento non è possibile inferire alcuna ipotesi su particolari relazioni fra *O. cf. ovata* e *Labrenzia*. Anche per quanto concerne il genere *Roseovarius* una specie è stata isolata da colture di dinoflagellate tossiche di *Alexandrium ostenfeldii* (Biebl et al., 2005b), come *L. alexandrii* è auxotrofa per le vitamine B<sub>1</sub> e B<sub>7</sub>.



## 5-CONCLUSIONI

Per quanto di nostra conoscenza, questo studio è il primo effettuato tramite metodiche molecolari di *next generation sequencing* (*Ion Torrent*) per l'indagine filogenetica di comunità microbiche associate a colture microalgali. L'analisi molecolare della comunità batterica associata ad *Ostreopsis* cf. *ovata* in colture batch ha evidenziato la presenza di 12 phyla, 17 classi e 150 generi. Ciononostante, i dati ottenuti hanno rilevato che la comunità batterica è fondamentalmente costituita, in termini di abbondanza relativa, dal phylum *Proteobacteria* (66-97%) seguito dal phylum *Bacteroidetes* (3-34%). Il primo phylum è stato rappresentato quasi esclusivamente dalla classe *Alphaproteobacteria* (65-96%), con pochi generi dominanti (*Oceanicaulis* ed i tre generi *Dinoroseobacter*, *Labrenzia* e *Roseovarius* appartenenti al clade *Roseobacter*) ed il secondo quasi totalmente dalla classe *Sphingobacteria* (2-34%) con la famiglia *Flammeovirgaceae*.

Il numero limitato di taxa batterici dominanti suggerisce che sulla comunità batterica associata alla microalga agisca una forte pressione selettiva dettata dalle condizioni e dalle dinamiche che si instaurano nella coltura e verosimilmente sulla base: (i) della capacità di sopravvivenza dei differenti gruppi batterici in coltura; (ii) di associazioni di tipo simbiotico e/o mutualistico con la microalga o ad azione scavenger su cellule algali morte; (iii) di interazioni mutualistiche e/o competitive fra batteri; (iv) di capacità di sopravvivenza dei virus in condizioni batch, condizioni steady-state virali e/o su resistenza all'infezione virale. L'insieme di tutte queste interazioni hanno contribuito a determinare il consorzio microbico associato alla microalga; tale consorzio, in particolare con i generi *Oceanicaulis* e *Dinoroseobacter*, più abbondanti e spesso co-dominanti, appare essere autosufficiente per la produzione delle vitamine B<sub>12</sub>, B<sub>1</sub> e B<sub>7</sub> per le quali le dinoflagellate tossiche sono frequentemente auxotrofe.

Inoltre, il trend successionale dei batteri e la dinamica di crescita degli stessi, caratterizzata da due fasi di crescita ben distinte, ed associate la prima alla fase di crescita esponenziale di *O. cf. ovata* e la seconda alla fase media-stazionaria della stessa, rispecchiano principalmente (i) la variabilità temporale delle risorse

inorganiche ed organiche disponibili nelle diverse fasi con un complessivo effetto bottom up, differente sulle diverse popolazioni batteriche che appunto si susseguono (*Alphaproteobacteria* r-strateghi e *Bacteroidetes* k-strateghi) e solo molto marginalmente (ii) un'azione di controllo top down esercitato dai virus. Ciononostante la dominanza dei generi *Oceanicaulis* e *Dinoroseobacter* in stadi diversi di crescita dell'alga (i.e. fase esponenziale e fase tarda stazionaria) suggerisce un'elevata plasticità metabolica dei due generi e forse la loro capacità di passare da promotori della crescita ad algicidi secondo uno stile di vita recentemente proposto come "Jekyll and Hyde".

Ad oggi la maggior parte degli studi sugli HABs ha prestato attenzione alle dinamiche dei macronutrienti (e.g. azoto e fosforo) a seguito della constatazione che spesso esiste un legame fra eutrofizzazione e tali blooms, mentre l'importanza delle vitamine nella regolazione e nella stimolazione degli stessi è stata raramente considerata sebbene fortemente proposta, in particolare per i blooms di dinoflagellate tossiche note per la loro forte auxotrofia per le vitamine. I risultati ottenuti suggeriscono ulteriori indagini per la valutazione delle interazioni batteri-microalge e vitamine presenti nell'ambiente.

## 6-BIBLIOGRAFIA

- Abbate M., Bordone A., Cerrati G., Lisca A., Peirano A., 2007. Variabilità della distribuzione e densità di *Ostreopsis ovata* nel Golfo della Spezia. *Biologia Marina Mediterranea* 14, 286-287.
- Abby, S. S., Touchon, M., De Jode, A., Grimsley, N., Piganeau, G., 2014. Bacteria in *Ostreococcus tauri* cultures—friends, foes or hitchhikers?. *Frontiers in Microbiology* 5, 1-10.
- Accoroni, S., Romagnoli, T., Colombo, F., Pennesi, C., Di Camillo, C.G., Marini, M., Battocchi, C., Ciminiello, P., Dell'Aversano, C., Dello Iacovo, E., Fattorusso, E., Tartaglione, L., Penna, A., Totti, C., 2011. *Ostreopsis* cf. *ovata* bloom in the northern Adriatic Sea during summer 2009: ecology, molecular characterization and toxin profile. *Marine Pollution Bulletin* 62, 2512-2519.
- Accoroni, S., Romagnoli, T., Picchieri, S., Cecilia, T., 2014. New insights on the life cycle stages of the toxic benthic dinoflagellate *Ostreopsis* cf. *ovata*. *Harmful Algae* 34, 7-16.
- Adachi, M., Kanno, T., Matsubara, T., Nishijima, T., Itakura, S., Yamaguchi, M., 1999. Promotion of cyst formation in the toxic dinoflagellate *Alexandrium* (Dinophyceae) by natural bacterial assemblages from Hiroshima Bay, Japan. *Marine Ecology Progress Series* 191, 175-185.
- Alavi, M., Miller, T., Erlandson, K., Schneider, R., Belas, R., 2001. Bacterial community associated with *Pfiesteria*-like dinoflagellate cultures. *Environmental Microbiology* 3, 380-396.
- Albright, L.J., McCrae, S.K., May, B.E., 1986. Attached and freefloating bacterioplankton in Howe Sound, British Columbia, a coastal marine fjord-embayment. *Applied Environmental Microbiology* 51, 614-621.
- Aligizaki, K., Katikou, P., Milandri, A., Diogene, J., 2011. Occurrence of palytoxin group toxins in seafood and future strategies to complement the present state of the art. *Toxicon* 57, 390-399.
- Aligizaki, K., Katikou, P., Nikolaidis, G., Panoub, A., 2008. First episode of shellfish contamination by palytoxin-like compounds from *Ostreopsis* species (Aegean Sea, Greece). *Toxicon* 51, 418-427.
- Aligizaki, K., Nikolaidis, G., 2006. The presence of the potentially toxic genera *Ostreopsis* and *Coolia* (Dinophyceae) in the north Aegean sea, Greece. *Harmful Algae* 5, 717-730.
- Amaro, A.M., Fuentes, M.S., Ogalde, S.R., Venegas, J.A., Suárez-Isla, B.A., 2005. Identification and characterization of potentially algal-lytic marine bacteria strongly associated with the toxic dinoflagellate *Alexandrium catenella*. *Journal Eukaryotic Microbiology* 52, 191-200.
- Amin, S. A., Parker, M. S., Armbrust, E. V., 2012. Interaction between Diatoms and Bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 76, 667-686.
- Anderson, D.M., et al. 2008. Harmful algal blooms and eutrophication: Examining linkages from selected coastal regions of the United States. *Harmful Algae* 8, 39-53.
- Anderson, D.M., White, A.W., 1992. Marine biotoxins at the top of the food chain. *Oceanus* 35, 55-61.
- Ashton, M., Rosado, W., Govind, N.S., Tosteson, T.R., 2003. Culturable and nonculturable bacterial symbionts in the toxic benthic dinoflagellate *Ostreopsis lenticularis*. *Toxicon* 42, 419-424.
- Azam, F., Smith, D.C., 1991. Bacterial influence on the variability in the ocean's biogeochemical state: a mechanistic view. In: Demers, S., (eds) *Particle analysis in oceanography*. NATO ASI Series, Vol G27. Springer-Verlag, Berlin, 213-235.

- Barone, R., Prisinzano, A., 2007. Peculiarita` comportamentale del dinoflagellato *Ostreopsis ovata* Fukuyo (Dinophyceae): la strategia del ragno. *Naturalista Siciliano S. IV* 30, 401-418.
- Battocchi, C., Totti, C., Vila, M., Maso´ , M., Capellacci, S., Accoroni, S., Ren˜e´ , A., Scardi, M., Penna, A., 2010. Monitoring toxic microalgae *Ostreopsis* (dinoflagellate) species in coastal waters of the Mediterranean Sea using molecular PCR-based assay combined with light microscopy. *Marine Pollution Bulletin* 60, 1074-1084.
- Bell, W., Mitchell, R., 1972. Chemotactic and growth responses of marine bacteria to algal extracellular
- Berland, B. R., Maestrini, S. Y., 1969. Study of bacteria associated with marine Algae in culture. *Marine Bioogy* 3, 334-335.
- Bernardet, J.F., Nakagawa, Y., & Holmes, B., 2002. Proposed minimal standards for describing new taxa of the family *Flavobacteriaceae* and emended description of the family. *Internal Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 52, 1049–1070.
- Bianco, I., Sangiorgi, V., Penna, A., Guerrini, F., Pistocchi, R., Zaottini, E., Congestri, R., 2007. *Ostreopsis ovata* in benthic aggregates along the Latium Coast (middle Tyrrhenian Sea). *In: International Symposium on Algal Toxins, SITOX 29*.
- Biebl, H., Allgaier, M., Lünsdorf, H., Pukall, R., Tindall, B.J., Wagner-Döbler, I., 2005. *Roseovarius mucosus* sp. nov., a member of the *Roseobacter* clade with trace amounts of bacteriochlorophyll a. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* 55, 2377-2383.
- Biebl, H., Allgaier, M., Tindall, B.J., Koblizek, M., Lu, H., Wagner- Döbler, I., 2005. *Dinoroseobacter shibae* gen. nov., sp. nov., a new aerobic phototrophic bacterium isolated from dinoflagellates. 2005; *International journal of systematic and evolutionary microbiology* 55, 1089–1096.
- Biebl, H., Allgaier, M., Tindall, B.J., Koblizek, M., Lünsdorf, H., Pukall, R., Wagner-Döbler, I., 2005. *Dinoroseobacter shibae* gen. nov., sp. nov., a new aerobic phototrophic bacterium isolated from dinoflagellates. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 55, 1089–1096.
- Biebl, H., Lu, H., Schulz, S., Allgaier, M., Wagner- Döbler, I., 2007. Description of *Labrenzia alexandrii* gen. nov., sp. nov., a novel *alphaproteobacterium* containing bacteriochlorophyll a, and a proposal for reclassification of *Stappia aggregata* as *Labrenzia aggregata* comb. nov., of *Stappia marina* as *Labrenzia marina* comb. nov. and of *Stappia alba* as *Labrenzia alba* comb. nov., and emended descriptions of the genera *Pannonibacter*, *Stappia* and *Roseibium*, and of the species *Roseibium denhamense* and *Roseibium hamelinense*. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* 57, 1095–1107.
- Biegala, I.C., Kennaway, G., Alverca, E., Lennon, J.F., Vault, D., Simon, N., 2002. Identification of bacteria associated with dinoflagellates (Dinophyceae): *Alexandrium* spp. using tyramide signal amplification–fluorescent *in situ* hybridization and confocal microscopy. *Journal of Phycology* 38, 404–411.
- Bottalico A., Perrone G., 2002. Toxigenic *Fusarium* species and mycotoxins associated with head blight in small-cereals in Europe. *European Journal of Plant Pathology* 108, 611-624.
- Bratbak, G., Egge, J.K., Heldal, M., 1993. Viral mortality of the marine alga *Emiliana huxleyi* (Haptophyceae) and termination of algal blooms. *Applied Environmental Microbiology* 66, 4916–4920.

- Breitbart, M., Middelboe, M., Rohwer, F., 2008. Marine viruses: community dynamics, diversity and impact on microbial processes. In: *Microbial Ecology of the Oceans*, 443-468.
- Brinkhoff, T., Bach, G., Heidorn, T., Liang, L., Schlingloff, A., Simon, M., 2004. Antibiotic production by a *Roseobacter* clade-affiliated species from the German Wadden Sea and its antagonistic effects on indigenous isolates. *Applied Environmental Microbiology* 70, 2560-2565.
- Brinkhoff, T., Giebel, H.A., Simon, M., 2008. Diversity, ecology, and genomics of the *Roseobacter* clade: a short overview. *Archives of Microbiology* 189, 531-539.
- Brinkmeyer, R., Rappé, M., Gallacher, S., Medlin, L., 2000. Development of clade- (*Roseobacter* and *Alteromonas*) and taxon-specific oligonucleotide probes to study interactions between toxic dinoflagellates and their associated bacteria. *European Journal of Phycology* 35, 315-329.
- Buchan, A., Gonzalez, J.M., Moran, M.A., 2005. Overview of the marine *Roseobacter* lineage. *Applied Environmental Microbiology* 71, 5665-5677.
- Chang, F.H., Shimizu, Y., Hay, B., Stewart, R., Mackay, G., Tasker, R., 2000. Three recently recorded *Ostreopsis* spp. (Dinophyceae) in New Zealand: temporal and regional distribution in the upper North Island from 1995 to 1997. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research* 34, 29-39.
- Chen, M. H., Sheu, S. Y., Chen, C. A., Wang, J. T., Chen, W. M., 2012. *Oceanicaulis stylophorae* sp. nov., isolated from the reef building coral *Stylophora pistillata*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 62, 2241-2246.
- Cho, B.C., Azam, F., 1988. Major role of bacteria in biogeochemical fluxes in the ocean's interior. *Nature* 332, 441-443.
- Ciminiello, P., Dell'Aversano, C., Dello Iacovo, E., Fattorusso, E., Forino, M., Grauso, L., Tartaglione, L., Guerrini, F., Pistocchi, R., 2010. Complex palytoxin-like profile of *Ostreopsis ovata*. Identification of four new ovatoxins by high-resolution liquid chromatography/mass spectrometry. *Rapid Communications Mass Spectrometry* 24, 2735-2744.
- Ciminiello, P., Dell'Aversano, C., Dello Iacovo, E., Fattorusso, E., Forino, M., Tartaglione, L., 2011b. LC-MS of palytoxin and its analogues: state of the art and future perspectives. *Toxicon* 57, 376-389.
- Ciminiello, P., Dell'Aversano, C., Dello Iacovo, E., Fattorusso, E., Forino, M., Grauso, L., Tartaglione, L., Guerrini, F., Pezzolesi, L., Pistocchi, R., Vanucci, S., 2012a. Isolation and structure elucidation of ovatoxin-a, the major toxin produced by *Ostreopsis ovata*. *Journal of American Chemical Society* 134, 1869-1875.
- Ciminiello, P., Dell'Aversano, C., Dello Iacovo, E., Fattorusso, E., Forino, M., Tartaglione, L., Battocchi, C., Crinelli, R., Carloni, E., Magnani, M., Penna, A., 2012b. Unique toxin profile of a Mediterranean *Ostreopsis* cf. *ovata* strain: HR LC-MSn characterization of ovatoxin-f, a new palytoxin congener. *Chemical Research in Toxicology* 25.
- Ciminiello, P., Dell'Aversano, C., Fattorusso, E., Forino, M., Grauso, L., Tartaglione, L., 2011a. A 4-decade-long (and still ongoing) hunt for palytoxins chemical architecture. *Toxicon* 57, 362-367.
- Ciminiello, P., Dell'Aversano, C., Fattorusso, E., Forino, M., Magno, G.S., Tartaglione, L., Grillo, C., Melchiorre, N., 2006. The Genoa 2005 outbreak. Determination of putative palytoxin in Mediterranean *Ostreopsis ovata* by a new liquid chromatography tandem mass spectrometry method. *Analysis Chemical* 78, 6153-6159.

- Ciminiello, P., Dell'Aversano, C., Fattorusso, E., Forino, M., Tartaglione, L., Grillo, C., Melchiorre, N., 2008. Putative palytoxin and its new analogue, ovatoxin-a, in *Ostreopsis ovata* collected along the Ligurian coasts during the 2006 toxic outbreak. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* 19, 111–120.
- Congestri, R., Penna, A., Zingone, A., 2006. Bentox-net: a research and management initiative on *ostreopsis* spp. and other benthic microalgal blooms along the Italian coast. *Harmful Algal News* 32, 11-12.
- Cottrell, M. T., & Kirchman, D. L., 2000. Community composition of marine bacterioplankton determined by 16S rRNA gene clone libraries and fluorescence in situ hybridization. *Applied Environmental Microbiology* 66, 5116–5122.
- Croft, M.T., Lawrence, A.D., Raux-Deery, E., Warren, M.J., Smith, A.G., 2005. Algae acquire vitamin B12 through a symbiotic relationship with bacteria. *Nature* 438, 90-93.
- Danovaro, R., Armeni, M., Corinaldesi C., & Mei, M. L., 2003. Viruses and marine pollution. *Marine Pollution Bulletin* 46, 301–304.
- Danovaro, R., Dell'Anno, A., Corinaldesi, C., Magagnini, M., Noble, R., Tamburini, C., et al. 2008. Major viral impact on the functioning of benthic deep-sea ecosystems. *Nature* 454, 1084-1087.
- Del Giorgio, P. A., Gasol, J. M., 2008. Physiological structure and single-cell activity in marine bacterioplankton. In: *Microbial Ecology of the Oceans*, 243-285.
- DeLong, E.F., Franks, D.G., Alldredge, A.L., 1993. Phylogenetic diversity of aggregate-attached vs. free-living marine bacterial assemblages. *Limnol Oceanography* 38, 924–934.
- Di Turi, L., Lo Caputo, S., Marzano, M.C., Pastorelli, A.M., Pompei, M., Rositani, L., Ungano, N., 2003. Sulla presenza di *Ostreopsidaceae* (Dinophyceae) lungo il litorale barese. *Biology Marine Mediterranean* 10, 675–678.
- Donovan, C.J., Garduno, R.A., Kalmokoff, M., Ku, J.C., Quilliam, M.A. & Gill T.A., 2009. *Pseudoalteromonas* bacteria are capable of degrading paralytic shellfish toxins. *Applied and Environmental Microbiology* 75, 6919-6923.
- Doucette, G.J., 1995. Interactions between bacteria and harmful algae: a review. *Natural Toxins* 3, 65–74.
- Doucette, G.J., Kodama, M., Franca, S. & Gallacher, S., 1998. Bacterial interactions with harmful algal bloom species: bloom ecology, toxigenesis, and cytology. In: Anderson, D., Cembella, A.D. & Hallegraeff, G.M., (eds) *Physiological Ecology of Harmful Algal Blooms, Vol G 41*, 619–647. Springer-Verlag, Berlin.
- Doucette, G.J., McGovern, E.R., Babinchak, J.A., 1999. Algicidal bacteria active against *Gymnodinium breve* (Dinophyceae). I. Bacterial isolation and characterization of killing activity. *Journal of Phycology* 35, 1447–1454.
- Doucette, G.J., Trick, C.G., 1995. Characterization of bacteria associated with different isolates of *Alexandrium tamarense*. In: Lassus P, Arzul G, Erard E, Gentien P, Marcaillou C (eds) *Harmful marine algal blooms*, 33–38.
- Ducklow, H. W. & Carlson, C. A., 1992. Oceanic bacterial productivity. *Advances in Microbial Ecology* 12, 113-181.
- Ebert, M., Laaß, S., Burghartz, M., Petersen, J., Koßmehl, S., Wöhlbrand, L., Rabus, R., Wittmann, C., Tielen, P., Jahn, D., 2013. Transposon mutagenesis identified chromosomal and plasmid genes essential for adaptation of the marine bacterium *Dinoroseobacter shibae* to anaerobic conditions. *Journal of bacteriology* 195, 4769–77.
- Edwardsen, B., Moy, F., Paasche, E., 1990. Hemolytic activity in extracts of *Chrysochromulina polylepis* grown at different levels of selenite and phosphate. In: Granéli, E., Sundström, B., Edler, L., Anderson, D.M. (Eds.), *Toxic Marine Phytoplankton* 284–289.

- Faust, M.A., 1992. Observations on the morphology and sexual reproduction of *Coolia monotis* (Dinophyceae). *Journal of Phycology* 28, 94–104.
- Faust, M.A., Morton, S.L., 1995. Morphology and ecology of the marine dinoflagellate *Ostreopsis labens* sp. nov. (Dinophyceae). *Journal of Phycology* 31, 456–463.
- Faust, M.A., Morton, S.L., Quod, J.P., 1996. Further SEM study of marine dinoflagellates: the genus *Ostreopsis* (Dinophyceae). *Journal of Phycology* 32, 1053–1065.
- Faust, M.A., Gulladze, R.A., 2002. Identifying Harmful Marine Dinoflagellates. *Smithsonian Institution* 42, 1-144.
- Faust, M.A., 1999. Three new *Ostreopsis* species (Dinophyceae): *O. marinus* sp. nov., *O. belizeanus* sp. nov., and *O. caribbeanus* sp. nov. *Phycologia* 38, 92-99.
- Ferguson, R. L. & Rublee, P. A., 1976. Contribution of bacteria to standing crop of coastal plankton. *Limnology and Oceanography* 21, 141-145
- Flynn, K. J., Stoecker, D. K., Mitra, A., Raven, J. A., Glibert, P. M., Hansen, P. J., et al. 2013. Misure of the phytoplankton–zooplankton dichotomy: the need to assign organisms as mixotrophs within plankton functional types. *Journal of Plankton Research* 35, 3-11.
- Flynn, K., Franco, J.M., Fernandez, P., Reguera, B., Zapata, M., Wood, G., Flynn, K.J., 1994. Changes in toxin content, biomass and pigments of the dinoflagellate *Alexandrium minutum* during nitrogen refeeding and growth into nitrogen or phosphorus stress. *Marine Ecology Progress Series* 111, 99–109.
- Fuhrman, J.A., 1999. Marine viruses and their biogeochemical and ecological effects. *Nature* 399, 541-548.
- Fuhrman, J. A. & Noble, R. T., 1995. Viruses and protists cause similar bacterial mortality in coastal seawater. *Limnology Oceanography* 40, 123-124
- Fuhrman, J. A. & Suttle, C. A., 1993. Viruses in marine planktonic system. *Oceanography* 6, 51-63.
- Fukuyo, Y., 1981. Taxonomical study on benthic dinoflagellates collected in coral reefs. *Bulletin of the Japanese Society for the Science of Fish* 47, 967–978.
- Furlan, M., Antonioli, M., Zingone, A., Sardo, A., Blason, C., Pallavicini, A., Fonda Umani, S., 2013. Molecular identification of *Ostreopsis* cf. *ovata* in filter feeders and putative predators. *Harmful Algae* 21-22, 20-29.
- Gallacher, S., Flynn, K.L., Franco, J.M., Brueggemann, E.E., Hines, H.B., 1997. Evidence for production of paralytic shellfish toxins by bacteria associated with *Alexandrium* spp. (Dinophyta) in culture. *Applied Environmental Microbiology* 63, 239–245.
- Gallitelli, M., Ungaro, N., Addante, L.M., Silver, N.G., Sabba, C., 2005. Respiratory illness as a reaction to tropical algal blooms occurring in a temperate climate. *JAMA – Journal of the American Medical Association* 293, 2599–2600.
- Garcès, E., Masò, M., Camp, J., 1999. A recurrent and localized dinoflagellate bloom in Mediterranean beach. *Journal of Plankton Research* 21, 2373-2391
- Garcés, E., Alacid, E., Bravo, I., Fraga, S., Figueroa, R., 2013a. *Parvilucifera sinerae* (Alveolata, Myzozoa) is a generalist parasitoid of dinoflagellates. *Protist* 164, 245-260.
- Garcés, E., Villa, M., Reñé, A., Alonso-Sàez, L., Anglès, S., Lugliè, A., Masò, M., M.Gasol, J., 2007. Natural bacterioplankton assemblage composition during blooms of *Alexandrium* spp. (Dinophyceae) in NW Mediterranean coastal waters. *Aquatic Microbial Ecology* 46, 55-70.
- Garcés, E., Zingone, A., Montesor, M., Reguera, B., Dale, B., 2002. *LIFEHAB: Life Histories of Microalgal Species Causing Harmful Blooms*. European Commission.

- Garces, E., Alacid, E., Rene, A., Petrou, K., Simo, R., 2013b. Host-released dimethylsulphide activates the dinoflagellate parasitoid *Parvilucifera sinerae*. *The ISME journal* 7, 1065-1068.
- Gasol, J.M., Duarte, C.M., 2000. Comparative analyses in aquatic microbial ecology: How far do they go? *FEMS Microbiological Ecology* 31, 99–106.
- Geng, H. and Belas, R., 2010. Molecular mechanisms underlying roseobacter–phytoplankton symbioses. *Current Opinion in Biotechnology* 21, 332-338.
- Giblin, A.E., Tobias, C.R., Song, B., Weston, N., Banta, G.T., Rivera-Monroy, V.H., 2013. The importance of dissimilatory nitrate reduction to ammonium (DNRA) in the nitrogen cycle of coastal ecosystems. *Oceanography* 26, 124–131.
- Gihring, T.M., Humphrys, M., Mills, H.J., Huettel, M., Kostka, J.E., 2009. Identification of phytodetritus-degrading microbial communities in sublittoral Gulf of Mexico sands. *Limnology and Oceanography* 54, 1073–83.
- Gilbert, P.M., Anderson, D.M., Gentien, P., Granéli, E., Sellner, K.G., 2005. The global complex phenomena of harmful algal blooms. *Oceanography* 18, 136–147.
- Gilibert, P.M., Burkholder, J.M., Kana, T.M., Alexander, J., Skelton, H. & Shilling, C., 2009. Grazing by *Karenia brevis* on *Synechococcus* enhances its growth rate and may help to sustain blooms. *Aquatic Microbiology Ecology* 55, 17–30.
- Gorbi, S., Bocchetti, R., Binelli, A., Totti, C., Cucchiari, E., Accoroni, S., Raffaelli, F., Nanetti, L., Vignini, A., Mazzanti, L., Regoli, F., Ciminiello, P., Fattorusso, E., Bacchiocchi, S., Graziosi, T. & Orletti, R., 2010. Biological effects of palytoxin-like compounds from benthic microalga *Ostreopsis ovata*: A multibiomarkers approach with the mussels *Mytilus galloprovincialis*. *Comparative biochemistry and physiology a-molecular & integrative physiology* 157, S21-S21.
- Gomez-Pereira, P.R., Fuchs, B.M., Alonso, C., Oliver, M. J., Van Beusekom, J.E., Amann, R., 2010. Distinct flavo-bacterial communities in contrasting water masses of the north Atlantic Ocean. *ISME J.* 4, 472–487.
- Gonzales, I., Tosteson, C.G., Hensley, V. & Tosteson, T.R., 1995. Associated bacteria and toxicity development in cultured *Ostreopsis lenticularis*. In: Lassus P., Arzul G., Erard-LeDenn E., Gentien P., Marcaillou-Le Baut C. (eds.), *Harmful Algal Blooms*, 451-456.
- González, J.M., Kiene, R.P., Moran, M.A., 1999. Transformation of sulfur compounds by an abundant lineage of marine bacteria in the  $\alpha$ -subclass of the class *Proteobacteria*. *Applied Environmental Microbiology* 65, 3810–3819.
- González, J.M., Moran, M.A., 1997. Numerical dominance of a group of marine bacteria in the alpha-subclass of the class *Proteobacteria* in coastal seawater. *Applied Environmental Microbiology* 63, 4237–4242.
- Granéli, E., Carlsson, P., 1998. The ecological significance of phagotrophy in photosynthetic flagellates. In: Anderson, D.M., Cembella, A.D., Hallegraeff, G.M. (Eds.), *Physiological Ecology of Harmful Algal Blooms*. Springer-Verlag, Berlin, 539-557.
- Graneli, E. & Flynn, K., 2006. Chemical and physical factors influencing toxin content. In: Granéli E., Turner J.T. (eds.), *Ecological Studies* 189, 229-241.
- Granéli, E., Turner, J.T., (eds) 2006. *Ecology of harmful algae*, 189. Springer-Verlag, Berlin.
- Green, D.H., Hart, M.C., Blackburn, S.I. & Bolch, C.J.S., 2010. Bacterial diversity of *Gymnodinium catenatum* and its relationship to dinoflagellate toxicity. *Aquatic Microbial Ecology* 61, 73-87.
- Green, D.H., Llewellyn, L.E., Negri, A.P., Blackburn, S.I. & Bolch, C.J.S., 2004. Phylogenetic and functional diversity of the cultivable bacterial community associated with the paralytic

- shellfish poisoning dinoflagellate *Gymnodinium catenatum*. *FEMS Microbiology Ecology* 47, 345–357.
- Guerrini, F., Ciminiello, P., Dell’Aversano, C., Tartaglione, L., Fattorusso, E., Boni, L., Pistocchi, R., 2007. Influence of temperature, salinity and nutrient limitation on yessotoxin production and release by the dinoflagellate *Protocetatum reticulatum* in batch-cultures. *Harmful Algae* 6, 707–717.
- Guerrini, F., Mazzotti, A., Boni, L., Pistocchi, R., 1998. Bacterial-algal interactions in polysaccharide production. *Aquatic Microbiology Ecology* 15, 247–253.
- Guerrini, F., Pezolesi, L., Feller, A., Riccardi, M., Ciminiello, P., Dell’Aversano, C., Tartaglione, L., Dello Iacovo, E., Fattorusso, E., Forino, M., Pistocchi, R., 2010. Comparative growth and toxic profile of cultured *Ostreopsis ovata* from the Tyrrhenian and Adriatic Seas. *Toxicon* 55, 1–10.
- Habermann, E., Chhatwal, G. S., 1982. Ouabain inhibits the increase due to palytoxin of cation permeability of erythrocytes. *Naunyn-Schmiedebergs Archives of Pharmacology* 319, 101–107.
- Hahnke, S., Brock, N. L., Zell, C., Simon, M., Dickschat, J. S., Brinkhoff, T., 2013. Physiological diversity of Roseobacter clade bacteria co-occurring during a phytoplankton bloom in the North Sea. *Systematic Applied Microbiology* 36, 39–48.
- Haines, K.C. & Guillard, R.R.L., 1974. Growth of vitamin B12-requiring marine diatoms in mixed laboratory cultures with vitamin B12-producing marine bacteria. *Journal of Phycology* 10, 245–252.
- Hallegraeff, G.M., 1993. A review of harmful algal blooms and their apparent global increase. *Phycologia* 32, 79–99.
- Hammer, Ø., Harper, D.A.T., Ryan, P.D. 2001. PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontologia Electronica* 4, 9.
- Hare, C.E., Demir, E., Coyne, K.J., Cary, S.C., Kirchman, D.L., Hutchins, D.A., 2005. A bacterium that inhibits the growth of *Pfiesteria piscicida* and other dinoflagellates. *Harmful Algae* 4, 221–234.
- Hasegawa, Y., Martin, J.L., Giewat, M.W., Rooney-Varga, J.N., 2007. Microbial community diversity in the phycosphere of natural populations of the toxic alga, *Alexandrium fundyense*. *Environmental Microbiology* 9, 3108–3121.
- Hasegawa, Y., Martin, J.L., Giewat, M.W., Rooney-Varga, J.N., 2007. Microbial community diversity in the phycosphere of natural populations of the toxic alga, *Alexandrium fundyense*. *Environmental Microbiology* 9, 3108–3121.
- Hobbie, J., Daley, R. J., Jasper, S., 1977. Use of nucleopore filters for counting bacteria by epifluorescence microscopy. *Applied Environmental Microbiology* 33, 811–830
- Hold G.L., Smith E.A., Birkbeck, T.H. & Gallacher S., 2001. Comparison of paralytic shellfish toxin production by the dinoflagellates *Alexandrium lusitanicum* NEPCC 253 and *Alexandrium tamarense* NEPCC 407 in the presence and absence of bacteria. *FEMS Microbiology Ecology* 36, 223–233.
- Hold, G.L., Smith, E.A., Rappé, M.S., Maas, E.W., Moore, E.R.B., Stroempl, C., Stephen, J.R., Prosser, J.I., Birkbeck, T.H. & Gallacher, S., 2001. Characterisation of bacterial communities associated with toxic and non-toxic dinoflagellates: *Alexandrium* spp. and *Scrippsiella trochoidea*. *FEMS Microbiology Ecology* 37, 161–173.
- Hold, G.L., Smith, E.A., Rappe, M.S., Maas, E.W., and 6 others, 2001. Characterisation of bacterial communities associated with toxic and non-toxic dinoflagellates: *Alexandrium* spp. and *Scrippsiella trochoidea*. *FEMS Microbiol Ecology* 37, 161–173.

- Honsell, G., Bonifacio, A., De Bortoli, M., Penna, A., Battocchi, C., Ciminiello, P., Dell'Aversano, C., Fattorusso, E., Sosa, S., Yasumoto, T., Tubaro, A., 2013. New insights on cytological and metabolic features of *Ostreopsis* cf. *ovata* Fukuyo (Dinophyceae): a multidisciplinary approach. *PLoS One* 8, e57291
- Howard, E.C., Henriksen, J.R., Buchan, A., Reisch, C.R., Burgmann, H., Welsh, R., et al. 2006. Bacterial taxa that limit sulfur flux from the ocean. *Science* 314, 649-652.
- Jasti, S., Sieracki, M.E., Poulton, N.J., Giewat, M.W., Rooney-Varga, J.N., 2005. Phylogenetic diversity and specificity of bacteria closely associated with *Alexandrium* spp. and other phytoplankton. *Applied Environmental Microbiology* 71, 3483–3494.
- Johansson, N., Granéli, E., 1999. Influence of different nutrient conditions on cell density, chemical composition and toxicity of *Prymnesium parvum* (Haptophyta) in semi-continuous cultures. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 239, 243-258.
- Jones, K.L., Mikulski, C.M., Barnhorst, A. & Doucette, G.J., 2010. Comparative analysis of bacterioplankton assemblages from *Karenia brevis* bloom and nonbloom water on the west Florida shelf (Gulf of Mexico, USA) using 16S rRNA gene clone libraries. *FEMS Microbiology Ecology* 73, 468-485.
- Katircioglu, H., Akin, B. S., Atici, K., 2004. Microalgal toxin(s): characteristics and importance. *African Journal of Biotechnology* 3, 667-674
- Kermarec, F., Dor, F., Armengaud, A., Charlet, F., Kantin, R., Sauzade, D., De Haro, L., 2008. Health risks related to *Ostreopsis ovata* in recreational waters. *Environment, Risques & Sante* 7, 357–363.
- Kirchman, D.L., 2002. The ecology of *Cytophaga-Flavobacteria* in aquatic environments. *FEMS Microbiological Ecology* 39, 91–100.
- Kirchman, D.L., 2008. *Microbial Ecology of the Oceans*. Wiley-Blackwell, Wiley, J., & Sons, inc. Publication.
- Kodama M., Doucette, G.J. & Green, D.H., 2006. Relationships between bacteria and harmful algae. In: Granéli E., Turner J.T. (eds.), *Ecological Studies* 189, 243-255.
- Kolton, M., Sela, N., Elad, Y., Cytryn, E., 2013. Comparative genomic analysis indicates that niche adaptation of terrestrial *flavobacteria* is strongly linked to plant glycan metabolism. *PLoS ONE* 8, e76704.
- Lafay, B., Ruimy, R., Rausch de Traubenberg, C., Breittmayer, V., Gauthier, M.J., Christen, R. 1995. *Roseobacter algicola* sp. nov., a new marine bacterium isolated from the phycosphere of the toxin-producing dinoflagellate *Prorocentrum lima*. *International Journal Systematic Evolutionary Microbiology* 45, 290–296.
- Lami, R., Ghiglione, J., Desdevises, Y., West, N. J., Lebaron, P., 2009. Annual patterns of presence and activity of marine bacteria monitored by 16S rDNA–16S rRNA fingerprints in the coastal NW Mediterranean Sea. *Aquatic Microbiology Ecology* 54, 199-210.
- Lebeau, T.L., Robert, J.M.R., 2003. Diatom cultivation and biotechnologically relevant products. II. Current and putative products. *Applied Microbiology Biotechnology* 60, 624-632.
- Ledreux, A., Krys, S., Bernard, C., 2009. Suitability of the Neuro-2a cell line for the detection of palytoxin and analogues (neurotoxic phycotoxins). *Toxicon* 53, 300-308.
- Lehninger, A.L., 1978. *Biochemistry* (Worth, New York), 1104.
- Levins, R., Culver, D., 1971. Regional coexistence of species and competition between rare species. *Proceedings of National Academy of Science U.S.A.* 68, 1246-1248.
- Louzao, M. C., Espiña, B., Cagide, E., Ares, I. R., Alfonso, A., Vieytes, M. R., Botana, L. M., 2010. Cytotoxic effect of palytoxin on mussel. *Toxicon* 56, 842-847.

- Luque-Almagro, V.M., Gates, A.J., Moreno-Vivián, C., Ferguson, S.J., Richardson, D.J., Roldán, M.D., 2011. Bacterial nitrate assimilation: gene distribution and regulation. *Biochemical Society transactions* 39, 1838–43.
- Luque-Almagro, V.M., Lyall, V.J., Ferguson, S.J., Roldán, M.D., Richardson, D.J., Gates, A.J., 2013. Nitrogen oxyanion-dependent dissociation of a two-component complex that regulates bacterial nitrate assimilation. *The Journal of biological chemistry* 288, 29692–702.
- Madigan, M.T., Martinko, J.M., Parker, J., 2003. Brock Biology of Microorganisms (Prentice Hall, Upper Saddle River, NJ), 1019.
- Malagoli, D., Casarini, L., Sacchi, S., Ottaviani, E., 2007. “Stress and immune response in the mussel *Mytilus galloprovincialis*”. *Fish and Shellfish Immunology* 23, 171-177.
- Mangialajo, L., Bertolotto, R., Cattaneo-Vietti, R., Chiantore, M., Grillo, C., Lemeé, R., Melchiorre, N., Moretto, P., Povero, P., Ruggirei, N., 2008. The toxic benthic dinoflagellate *Ostreopsis ovata*: quantification of proliferation along the coastline of Genoa, Italy. *Marine Pollution Bulletin* 56, 1209–1214.
- Mangialajo, L., Ganzin, N., Accoroni, S., Asnaghi, V., Blanfune´, A., Cabrini, M., Cattaneo-Vietti, R., Chavanon, F., Chiantore, M., Cohu, S., Costa, E., Fornasaro, D., Grosse, H., Marco-Miralles, F., Maso´, M., Ren˜e´, A., Rossi, A.M., Sala, M.M., Thibaut, T., Totti, C., Vila, M., Leme´e, R., 2011. Trends in *Ostreopsis* proliferation along the Northern Mediterranean coasts. *Toxicon* 57, 408–420.
- Mann, A. J., Hahnke, R. L., Huang, S., Werner, J., Xing, P., Barbeyron, T., et al., 2013. The Genome of the alga-associated marine flavobacterium *Formosa agariphila* KMM3901(T) reveals a broad potential for degradation of algal polysaccharides. *Applied of Environmental Microbiology* 79, 6813-6822.
- Mann, A. J., Hanke, R. L., Huang, S., Werner, J., Xing, P., Barbeyron, T., Huettel, B., Stüber, K., Reinhardt, R., Harder, J., Glöckner, F. O., Amann, R. I., Teeling, H., 2013. The Genome of the Alga-Associated Marine *Flavobacterium Formosa agariphila* KMM 3901T Reveals a Broad Potential for Degradation of Algal Polysaccharides. *Applied and Environmental Microbiology* 21, 6813-6822.
- Masò, M., Garcès, E., Pages, F., Camp, J., 2003. Drifting plastic debris as a potential vector for dispersing Harmful Algal Bloom (HAB) species. *Scientia Marina* 67, 107-111.
- Mayali, X. & Azam, F., 2004. Algicidal bacteria in the sea and their impact on algal blooms. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 51, 139–144.
- Mayali, X. & Doucette, G.J., 2002. Microbial community interactions and population dynamics of an algicidal bacterium active against *Karenia brevis* (Dinophyceae). *Harmful Algae* 1, 277–293.
- Mayali, X., Azam, F., 2004. Algicidal bacteria in the sea and their impact on algal blooms. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 51, 139–144.
- Mayali, X., Franks, P.J., Azam, F., 2008. Cultivation and ecosystem role of a marine *Roseobacter* clade-affiliated cluster bacterium. *Applied Environmental Microbiology* 74, 2595-2603.
- Mayali, X., Franks, P.J.S., Burton, R.S., 2011. Temporal attachment dynamics by distinct bacterial taxa during a dinoflagellate bloom. *Aquatic Microbial Ecology* 63, 111-122.
- Miller, T.R., Belas, R., 2004. Dimethylsulfoniopropionate metabolism by *Pfiesteria*-associated *Roseobacter* spp. *Applied Environmental Microbiology* 70, 3383-3391.
- Miller, T.R., Belas, R., 2006. Motility is involved in *Silicibacter* sp. TM1040 interaction with dinoflagellates. *Environmental Microbiology* 8, 1648-59.

- Monti, M., Minocci, M., Beran, A., Ivesa, L., 2007. First record of *Ostreopsis* cf. *ovata* on macroalgae in the Northern Adriatic Sea. *Marine Pollution Bulletin* 54, 598–601.
- Moran, M.A., Belas, R., Schell, M.A., Gonzalez, J.M., Sun, F., Sun, S., et al. 2007. Ecological genomics of marine *Roseobacters*. *Applied Environmental Microbiology* 73, 4559–4569.
- Moran, M.A., Buchan, A., Gonzalez, J.M., Heidelberg, J.F., Whitman, W.B., Kiene, R.P., et al. 2004. Genome sequence of *Silicibacter pomeroyi* reveals adaptations to the marine environment. *Nature* 432, 910–913.
- Moran, M.A., Miller, W.L., 2007. Resourceful heterotrophs make the most of light in the coastal ocean. *Natural Review Microbiology* 5, 792–800.
- Muhling, M., Fuller, N.J., Millard, A., Somerfield, P.J., Marie, D., Wilson, W.H., et al. 2005. Genetic diversity of marine *Synechococcus* and co-occurring cyanophage communities: evidence for viral control of phytoplankton. *Environmental Microbiology* 7, 499–508.
- Nedashkobskaga, O. I., Wolfgang, L., 2011. Family III. Flammeovirgaceae fam. nov. In: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: volume 4; The Bacteroidetes, Spirochaetes, Tenericutes (Mollicutes), Fibrobacteres, Fusobacteria, Dictyoglomi, Gemmatimonadetes, Lentisphaerae, Verrucomicrobia, Chlamydiae and Plantomycets*, 442–448.
- Needham, D.M., Chow, C-E.T., Cram, J., Sachdeva, R., Parada, A., Fuhrman, J., 2013. Short-term observations of marine bacterial and viral communities: patterns, connections and resilience. *The ISME Journal* 7, 1274–1285.
- Oh, H-M., Kang, I., Vergin, K.L., Lee, K., Giovannoni S.J., Cho, J-C., 2011. Genome sequence of *Oceanicaulis* sp. strain HTCC2633, isolated from the Western Sargasso Sea. *Journal of Bacteriology* 193, 317–318.
- Oh, K.H., Jung, Y.T., Oh, T.K., Yoon, J.H. 2011. *Ruegeria faecimaris* sp. nov., isolated from a tidal flat sediment. *Internal Journal Systematic Evolutionary Microbiology* 61, 1182–8.
- Paerl, H.W., 1975. Microbial attachment to particles in marine and freshwater ecosystems. *Microbial Ecology* 2, 73–83.
- Parsons, M.L., Aligizaki, K., Bottein, M.Y.D., Fraga, S., Morton, S.L., Penna, A., Rhodes, L., 2012. *Gambierdiscus* and *Ostreopsis*: reassessment of the state of knowledge of their taxonomy, geography, ecophysiology, and toxicology. *Harmful Algae* 14, 107–129.
- Parsons, M.L., Preskitt, L.B., 2007. A survey of epiphytic dinoflagellates from the coastal waters of the island of Hawai'i. *Harmful Algae* 6, 658–669.
- Parsons, M.L., Settlemier, C.J., Bienfang, P.K., 2010. A simple model capable of simulating the population dynamics of *Gambierdiscus*, the benthic dinoflagellate responsible for ciguatera fish poisoning. *Harmful Algae* 10, 71–80.
- Penna, A., Fraga, S., Batocchi, C., Casabianca, S., Giacobbe, M.G., Riobo´, P., Vernesi, C., 2010. A phylogeographical study of the toxic benthic dinoflagellate genus *Ostreopsis* Schmidt. *Journal of Biogeography* 37 (5), 830–841.
- Penna, A., Galluzzi, L., 2008. PCR techniques as diagnostic tools for the identification and enumeration of toxic marine phytoplankton. In: Evangelista, V., Barsanti, L., Frassanito, A.M., Passarelli, V., Gualtieri, P. (Eds.), *Algal toxins: nature, occurrence, effect and detection*, 261–283.
- Penna, A., Vila, M., Fraga, S., Giacobbe, M.G., Andreoni, F., Riobo´, P., Vernesi, C., 2005. Characterization of *Ostreopsis* and *Coolia* (Dinophyceae) isolates in the western Mediterranean Sea based on morphology, toxicity and internal transcribed spacer 5.8S rDNA sequences. *Journal of Phycology* 41, 212–245.
- Perez-Guzman, L., Perez-Matos, A.E., Rosado, W., Tosteson, T.R. & Govind, N.S., 2008. Bacteria Associated with Toxic Clonal Cultures of the Dinoflagellate *Ostreopsis lenticularis*. *Marine Biotechnology* 10, 492–496.

- Perini, F., Casabianca, A., Battocchi, C., Accoroni, S., Totti, C., Penna, A., 2011. New approach using the real-time PCR method for estimation of the toxic marine dinoflagellate *Ostreopsis cf. ovata* in marine environment. *PLoS One* 6, e17699.
- Pezzolesi, L., Guerrini, F., Ciminiello, P., Dell'Aversano, C., Dello Iacovo, E., Fattorusso, E., Forino, M., Tartaglione, L., Pistocchi, R., 2012. Influence of temperature and salinity on *Ostreopsis cf. ovata* growth and evaluation of toxin content through HR LC–MS and biological assays. *Water Research* 46, 82–92.
- Pezzolesi, L., Pistocchi, R., Fratangeli, F., Dell'Aversano, C., Dello Iacovo, E., Tartaglione, L., 2014. Growth dynamics in relation to the production of the main cellular components in the toxic dinoflagellate *Ostreopsis cf. ovata*. *Harmful Algae* 36, 1-10.
- Pin, C.L., Teen, P.L., Ahmad, A., Usup, G., 2001. Genetic diversity of *Ostreopsis ovata* (Dinophyceae) from Malaysia. *Marine Biotechnology* 3, 246–255.
- Pistocchi, R., Pezzolesi, L., Guerrini, F., Vanucci, S., Dell'Aversano, C., Fattorusso, E., 2011. A review on the effects of environmental conditions on growth and toxin production of *Ostreopsis ovata*. *Toxicon* 57, 421–428.
- Poletti, R., Milandri, A., Pompei, M., 2003. Algal Biotoxins of Marine Origin: New Indications from European Union. *Veterinary Research Communications* 27, 173-182.
- Procto, L. M. & Fuhrman, J. A., 1990. Viral mortality of marine bacteria and cyanobacteria. *Nature* 343. 60-62
- Prokic, I., Brummer, F., Brigge, T., Gortz, H.D., Gerdts, G., Schutt, C., Elbrachter, M., Muller, W.E.G., 1998. Bacteria of the genus *Roseobacter* associated with the toxic dinoflagellate *Prorocentrum lima*. *Protist* 149, 347–357.
- Rhodes, C.J., Truscott, J.E., Martin, A.P., 2008. Viral infection as a regulator of oceanic phytoplankton populations. *Journal of Marine Systematic* 74, 216-226.
- Rhodes, L., Adamson, J., Suzuki, T., Briggs, J., Garthwaite, I., 2000. Toxic marine epiphytic dinoflagellates, *Ostreopsis siamensis* and *Coolia monotis* (Dinophyceae), in New Zealand. *New Zealand journal of marine and freshwater research* 34, 371-383.
- Rhodes, L., 2011. World-wide occurrence of the toxic dinoflagellate genus *Ostreopsis* Schmidt. *Toxicon* 57, 400–407.
- Rhodes, L., Smith, K., Munday, R., Briggs, L., Selwood, A., Adamson, J., Holland, P., 2006. *Ostreopsis* isolates from the Pacific region. *ICHA14 Conference Proceedings Crete*, 210-212.
- Riemann, L. & Winding, A., 2001. Community dynamics of freeliving and particle-associated bacterial assemblages during a freshwater phytoplankton bloom. *Microbial Ecology* 42, 274–285.
- Riobó, P., Paz, B., Franco, J. M., 2006. Analysis of palytoxin-like in *Ostreopsis* cultures by liquid chromatography with precolumn derivatization and fluorescence detection. *Analytica Chimica Acta* 566, 217-223.
- Rossi, R., Castellano, V., Scalco, E., Serpe, L., Zingone, A., Soprano, V., 2010. New palytoxin-like molecules in Mediterranean *Ostreopsis cf. ovata* (dinoflagellates) and in *Palythoa tuberculosa* detected by liquid chromatography–electrospray ionization time-of-flight mass spectrometry. *Toxicon* 56, 1381–1387.
- Roth, P.A., Mikulski, C.M. & Doucette, G.J., 2008. The influence of microbial interactions on the susceptibility of *Karenia* species to algicidal bacteria. *Aquatic Microbial Ecology* 50, 251–259.
- Roth, P.B., Twiner, M.J., Mikulski, C.M., Barnhorst, A.B. & Doucette, G.J., 2008. Comparative analysis of two algicidal bacteria active against the red tide dinoflagellate *Karenia brevis*. *Harmful Algae* 7, 682–691.

- Sakami, T., Nakahara, H., Chinain, M., Ishida, Y., 1999. Effects of epiphytic bacteria on the growth of the toxic dinoflagellate *Gambierdiscus toxicus* (Dinophyceae). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 233, 231–246.
- Sala MM, Balagué V, Pedrós-Alió C, Massana R, Felipe J, Arin L, Illoul H, Estrada M (2005) Phylogenetic and functional diversity of bacterioplankton during *Alexandrium* spp. blooms. *FEMS Microbiology Ecology* 54, 257–267.
- Sansoni, G., Borghini, B., Camici, G., Casotti, M., Righini, P., Rustighi, C., 2003. Fioriture algali di *Ostreopsis ovata* (Gonyaulacales: Dinophyceae): un problema emergente. *Biologia Ambientale* 17, 17–23.
- Sapp, M., Schwaderer, A.S., Wiltshire, K.H., Hoppe, H.G., Gerds, G. & Wichels, A., 2007. Species-specific bacterial communities in the phycosphere of microalgae? *Microbial Ecology* 53, 683–699.
- Schilling, W.P., Snyder, D., Sinkins, W.G., Estacion, M., 2006. Palytoxin-induced cell death cascade in bovine aortic endothelial cells. *American Journal of Physiology Cellular* 291, 657–667.
- Schowen, R., 1998. Thiamine-dependent enzymes. *Comprehensive Biological Catalysis*, ed Sinnott M (Academic, San Diego), 2, 217–266.
- Seyedsayamdost, M.R., Case, R.J., Kolter, R., Clardy, J., 2011. The Jekyll-and-Hyde chemistry of *Phaeobacter gallaeciensis*. *Nature chemistry* 3, 331–335.
- Shears, N.T., Ross, P.M., 2009. Blooms of benthic dinoflagellates of the genus *Ostreopsis*; an increasing and ecologically important phenomenon on temperate reefs in New Zealand and worldwide. *Harmful Algae* 8, 916–925.
- Shi, R., Huang, H., Qi, Z., Hu, W., Tian, Z., Dai, M., 2013. Algicidal activity against *Skeletonema costatum* by marine bacteria isolated from a high frequency harmful algal blooms area in southern Chinese coast. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 29, 153–162.
- Shibata, A., Kogure, K., Koike, I., Ohwada, K., 1997. Formation of submicron colloidal particles from marine bacteria by viral infection. *Marine Ecological Progress Series* 155, 303–307.
- Shibata, A., Goto, Y., Saito, H., Kikuchi, T., Toda, T. & Tahuchi, S., 2006. Comparison of SYBR Green I and SYBR Gold stains for enumerating bacteria and viruses by epifluorescence microscopy. *Aquatic Microbial Ecology* 43, 223–231.
- Simoni, F., Di Paolo, C., Gori, L., Lepri, L., 2004. Further investigation on blooms of *Ostreopsis ovata*, *Coolia monotis*, *Prorocentrum lima*, on the macroalgae of artificial and natural reefs in the Northern Tyrrhenian Sea. *Harmful Algae News* 26, 5–7.
- Skerratt, J.H., Bowman, J.P., Hallegraeff, G., James, S. & Nichols, P.D., 2002. Algicidal bacteria associated with blooms of a toxic dinoflagellate in a temperate Australian estuary. *Marine Ecology Progress Series* 244, 1–15.
- Smayda, T.J., Reynolds, C.S., 2003. Strategies of marine dinoflagellate survival and some rules of assembly. *Journal of Sea Research* 49, 95–106.
- Smith, D.C., Simon, M., Alldredge, A.L., Azam, F., 1992. Intense hydrolytic enzyme activity on marine aggregates and implications for rapid particle dissolution. *Nature* 359, 139–142.
- Spencer, R., 1955. The Taxonomy of certain Luminous Bacteria. *Journal of General Microbiology* 13, 111–118.
- Strompl C., 2003. *Oceanicaulis alexandrii* gen. nov., sp. nov., a novel stalked bacterium isolated from a culture of the dinoflagellate *Alexandrium tamarense* (Lebour) Balech. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 53, 1901–1906.

- Su, J.Q., Yang, X.R., Zheng, T.L., Tian, Y., Jiao, N.Z., Cai, L.Z., Hong, H.S., 2007. Isolation and characterization of a marine algicidal bacterium against the toxic dinoflagellate *Alexandrium tamarense*. *Harmful Algae* 6, 799-810.
- Su, J.Q., Yu, Z.M., Tian, Y., Song, X.X., Hong, H.S., Zheng, T.L., 2005. Biological activity of a red-tide alga—*A. tamarense* under co-cultured condition with bacteria. *Journal of Environmental Sciences* 17, 1047–1050.
- Tang, Y. Z., Koch, F., Gobler, C. J., 2010. Most harmful algal bloom species are vitamin B<sup>1</sup> and B<sup>12</sup> auxotrophs. *PNAS* 48, 20756-20761.
- Tang, Y.Z., Koch, F., Gobler, C.J., 2010. Most harmful algal bloom species are vitamin B1 and B12 auxotrophs. *Proceeding of the National Academy of Science U. S. A.* 107, 20756-20761.
- Taylor, F.J.R., 1968. Parasitism of the toxin producing dinoflagellate *Gonyaulax catenella* by the endoparasitic dinoflagellate *Amoebophrya ceratii*. *Journal Fisheries Research* 25, 2241–2245.
- Taylor, F.J.R., 1979. A description of the benthic dinoflagellate associated with maitotoxin and ciguatoxin, including observations on Hawaiian material. In: Taylor, D.L., Selinger, H.H. (Eds.), *Toxic dinoflagellate blooms*, 71-76.
- Teske, A., Durbin, A., Ziervogel, K., Cox, C., Arnosti, C., 2011. Microbial community composition and function in permanently cold seawater and sediments from an arctic fjord of svalbard. *Applied and environmental microbiology* 77, 2008–2018.
- Thingstad, T.F., Skjoldal, E.F., Bohne, R.A., 1993. Phosphorus cycling and algal-bacterial competition in Sandsfjord, western Norway. *Marine Ecology Progress Series* 99, 239-259.
- Thornton, D.C.O., 2014. Dissolved organic matter (DOM) release by phytoplankton in the contemporary and future ocean. *European Journal of Phycology* 49, 20-46.
- Tichadou, L., Glaizal, M., Armengaud, A., Grossel, H., Lemee, R., Kantin, R., Lasalle, J.L., Drouet, G., Rambaud, L., Malfait, P., de Haro, L., 2010. Health impact of unicellular algae of the *Ostreopsis* genus blooms in the Mediterranean Sea: experience of the French Mediterranean coast surveillance network from 2006 to 2009. *Clinical Toxicology* 48, 839–844.
- Tindall, D.R., Morton, S.L., 1998. Community dynamics and physiology of epiphytic/benthic dinoflagellates associated with ciguatera. In: Anderson, D.M., Cembella, A.D., Hallegraeff, G.M. (Eds.), *Physiological Ecology of Harmful Algal Blooms* 41, 291–313.
- Todd, J.D., Kirkwood, M., Newton-Payne, S., Johnston, A.W., 2012. DddW, a third DMSP lyase in a model *Roseobacter* marine bacterium, *Ruegeria pomeroyi* DSS-3. *The ISME Journal* 6, 223-6.
- Tognetto, L., Bellato, S., Moro, I., Andreoli, C., 1995. Occurrence of *Ostreopsis ovata* (Dinophyceae) in the Tyrrhenian Sea during summer 1994. *Botanica Marina* 38, 291–295.
- Tomaru, Y., Nagasaki, K., 2004. Widespread occurrence of viruses lytic to the bivalve-killing dinoflagellate *Heterocapsa circularisquama* along the western coast of Japan. *Plankton Biology Ecology* 51, 1-6.
- Tosteson, T.R., Ballantine, D.L., Tosteson, C.G., Hensley, V., Bardales, A.T., 1989. Associated bacterial flora, growth, and toxicity of cultured benthic dinoflagellates *Ostreopsis lenticularis* and *Gambierdiscus toxicus*. *Applied Environmental Microbiology* 55, 137–141.
- Totti, C., Accoroni, S., Cerino, F., Cucchiari, E., Romagnoli, T., 2010. *Ostreopsis ovata* bloom along the Conero Riviera (northern Adriatic Sea): relationships with environmental conditions and substrata. *Harmful Algae* 9, 233–239.
- Totti, C., Cucchiari, E., Romagnoli, T., Penna, A., 2007. Bloom of *Ostreopsis ovata* on the Conero Riviera (NW Adriatic Sea). *Harmful Algal News* 33, 12–13.

- Turki, S., 2005. Distribution of toxic dinoflagellates along the leaves of seagrass *Posidonia oceanica* and *Cymodocea nodosa* from the Gulf of Tunis. *Cahiers De Biologie Marine* 46, 29-34.
- Turki, S., Harzallah, A., Sammari, C., 2006. Occurrence of harmful dinoflagellates in two different Tunisian ecosystems: the lake of Bizerte and the gulf of Gabès. *Cahiers de Biologie Marine* 47, 253-259.
- Ungaro, N., Marano, G., Pastorelli, A. M., Marzano, M. C., Pompei, M., 2005. Presenza di Ostreopsidiacee nel Basso Adriatico. *Rapporti ISTISAN 05/29*, 112-115.
- Vanucci, S., Guerrini, F., Pezzolesi, L., Dell'Aversano, C., Ciminiello, P., Pistocchi, R., 2012. Cell growth and toxins' content of *Ostreopsis cf. ovata* in presence and absence of associated bacteria. *Algologie* 33, 105-112.
- Vanucci, S., Pezzolesi, L., Pistocchi, R., Ciminiello, P., Dell'Aversano, C., Dello Iacovo, E., Fattorusso, E., Tartaglione, L., Guerrini, F., 2012. Nitrogen and phosphorous limitation effects on cell growth, biovolume, and toxin production in *Ostreopsis cf. ovata*. *Harmful Algae* 15, 78-90.
- Vila, M., Garce´s, E., Maso´, M., 2001. Potentially toxic epiphytic dinoflagellate assemblages on macroalgae in the NW Mediterranean. *Aquatic Microbial Ecology* 26, 51-60.
- Vivaldi, B., Masiello, L., Ottonello, G., Bertolotto, R. M., Moretto, P., Prearo, M., Ferrari, A., 2007. Monitoring toxic products of *Ostreopsis ovata* in marine organisms. In: *International Symposium on Algal Toxins*, Trieste, May 27-29
- Wagner-Döbler, I., Ballhausen, B., Berger, M., Brinkhoff, T., Buchholz, I., Bunk, B., Cypionka, H., Daniel, R., Drepper, T., Gerdt, G., Hahnke, S., Han, C., Jahn, D., Kalhoefer, D., Kiss, H., Klenk, H.P., Kyrpides, N., Liebl, W., Liesegang, H., Meincke, L., Pati, A., Petersen, J., Piekarski, T., Pommerenke, C., Pradella, S., Pukall, R., Rabus, R., Stackebrandt, E., Thole, S., Thompson, L., Tielen, P., Tomasch, J., Von Jans, M., Wanphrut, N., Wichel, A., Zech, H., Simon, M., 2010. The complete genome sequence of the algal symbiont *Dinoroseobacter shibae*: a hitchhiker's guide to life in the sea. *The ISME journal* 4, 61-77.
- Wagner-Dobler, I., Biebl, H., 2006. Environmental biology of the marine *Roseobacter* lineage. *Annual Review of Microbiology* 60, 255-280.
- Wang, C.H., Ho, A.Y.T., Qian, P.Y., Wong, P.K., Hsieh, D.P.H., 2004. Antibiotic treatment enhances C2 toxin production by *Alexandrium tamarense* in batch cultures. *Harmful Algae* 3, 21-28.
- Wang, X.L., Gong, L.Y., Liang, S.K., Han, X.R., Zhu, C.J., Li, Y.B., 2005. Aligicidal activity of rhamnolipid biosurfactants produced by *Pseudomonas aeruginosa*. *Harmful Algae* 4, 433-443.
- Weinbauer, M. G., Fuks D. & Peduzzi, P., 1993. Distribution of viruses and dissolved DNA along a coastal trophic gradient in the northern Adriatic Sea. *Applied and Environmental Microbiology* 59, 4074-4082.
- Weinbauer, M. G., Fuks, D., Puskaric S. & Peduzzi, P., 1995. Diel, seasonal, and depth-related variability of viruses and dissolved DNA in the Northern Adriatic sea. *Microbiol Ecology* 30, 25-41.
- Weinbauer, M.G., 2004. Ecology of prokaryotic viruses. *FEMS Microbiology Reviews* 28, 127-181.
- White, J.R., Nagarajan, N., Pop, M., 2009. Statistical methods for detecting differentially abundant features in clinical metagenomic samples. *PLoS Comput Biol* 5.

- Wichels, A., Hummert, C., Elbrächter, M., Luckas, B., Schütt, C. & Gerdts, G., 2004. Bacterial diversity in toxic *Alexandrium tamarense* blooms off the Orkney Isles and the Firth of Forth. *Helgoland Marine Research* 58, 93–103.
- Wilhelm, S. W. & Suttle, C. A., 1999. Viruses and nutrient cycles in the sea. *Bioscience* 49, 781–788.
- Wilhelm, S. W. & Matteson, A. R., 2008. Freshwater and marine viroplankton: a brief overview of commonalities and differences. *Freshwater Biology* 53, 1076-1089.
- Williamson, S.J., Rusch, D.B., Yooseph, S., Halpern, A.L., Heidelberg, K.B., Glass, J.I., et al. 2008. The Sorcerer II Global Ocean Sampling Expedition: metagenomic characterization of viruses within aquatic microbial samples. *PLoS ONE* 3, e1456.
- Wommack, K. E. & Colwell, R. R., 2000. Viroplankton: viruses in aquatic ecosystems. *Applied and Environmental Microbiology* 64, 69–114.
- Yang, C., Zhou, Y., Zheng, W., Tian, Y., Zheng T., 2012. Bacterial community dynamics during a bloom caused by *Akashiwo sanguinea* in the Xiamen sea area, China. *Harmful Algae* 20, 132-141.
- Yoch, D.C., 2002. Dimethylsulfoniopropionate: its sources, role in the marine food web, and biological degradation to dimethylsulfide. *Applied Environmental Microbiology* 68, 5804-5815.
- Yoon, J., Adachi, K., Park, S., Kasai, H., Yokota, A., 2011. *Aureibacter tunicatum* gen. nov., sp. nov., a marine bacterium isolated from a coral reef sea squirt, and description of *Flammeovirgaceae* fam. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 61, 2342-2347.
- 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.
- 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.



## 7-RINGRAZIAMENTI

*I miei più sentiti ringraziamenti vanno alla professoressa Silvana Vanucci, per avermi coinvolto in questo lavoro e avermi trasmesso la passione per il mondo microscopico, per avermi seguito con presenza, pazienza e disponibilità nel corso di questi mesi e durante gli esami passati.*

*Lo stesso vale per tutto lo staff del laboratorio di algologia, per avermi aiutato durante questi mesi, un ringraziamento speciale va al mio correlatore Flavio che, nonostante i suoi impegni, si è dimostrato presente sia in ambito lavorativo e sia per soddisfare qualunque mia curiosità, un compagno e amico insostituibile, una persona che mi ha fatto piacere frequentare anche al di fuori del mondo universitario.*

*Ringrazio anche i colleghi dell'università di Bologna, della facoltà di antropologia, per avermi permesso di effettuare alcune analisi del mio progetto di tesi, presso i loro laboratori.*

*Un grazie immenso, con tutto il cuore e tutta l'anima va ai miei genitori; per aver sempre creduto in me, per avermi sempre aiutato nei momenti difficili, per avermi sempre appoggiato nei miei obiettivi, per avermi sempre voluto bene, per avermi trasmesso la voglia di non accontentarmi mai e di cercare sempre di fare il meglio per costruire il mio futuro.*

*Un abbraccio caldo e sincero va ai miei parenti tutti, per essere sempre stati presenti nei momenti felici e non, e per avermi fatto sentire una persona speciale; spero che leggendo queste pagine siate fieri di me.*

*Un grazie a tutti i colleghi di Biologia Marina, in particolar modo alla mia "coinquilina" Letizia per essere sempre stata presente, anche se a volte lontana migliaia di chilometri e avermi sempre spronato a fare il meglio anche quando ero troppo giù di morale per poterlo fare, alla mia romana preferita Giulia che mi ha trasmesso la passione per il volo, e avermi fatto passare momenti indimenticabili, alla mia "quasi" vicina di casa Benedetta che nonostante sia stata in Erasmus, ha trovato il tempo di entrare nel mio cuore e rimanerci.*

*A Manuel, il mio siculo preferito, che sin dal primo giorno si è dimostrato un caro amico, che mi ha sopportato e supportato durante questa esperienza, alla mia molisana preferita, compagna di mille merende e altrettanti telefilm Teresa che è sempre stata al mio fianco dai primi giorni di università ad oggi, una presenza indispensabile per questo mio percorso.*

*A Loredana per le mille serate passate a ridere e a trascorrere momenti spensierati e alle mille cene organizzate che finivano sempre troppo presto.*

*Spero che questo sia solo l'inizio con tutti voi e non una fine perché siete e rimarrete nel mio cuore per sempre ragazzi.*

*Come dimenticare gli amici di sempre, quelli del "quando torni?" quelli che ci sono sempre nonostante tutto, il gruppo Teatrando. Un ringraziamento speciale va a*

*Giacomo, il mio migliore amico, con il quale ho condiviso molto fra paure e certezze, nonostante all'inizio non fosse d'accordo con questa mia esperienza ed è sempre stato presente per farmi ridere o raccontarmi le ultime notizie di Alessandria.*

*Una persona indispensabile durante questi due anni passati lontani da casa è sicuramente Giada che ha sempre saputo incitarmi e stare al mio fianco, una persona fantastica e anche se non gliel'ho mai detto lei sa che sono orgoglioso di essere amico suo.*

*A Claudio e a tutti i suoi messaggi vocali anche solo con una canzone registrata per avermi reso partecipe della sua vita ed essere entrato nella mia nel momento giusto.*

*Ultima ma non meno importante vorrei ringraziare una persona a me cara che purtroppo non è più presente fisicamente vicino a me, mia nonna Piera per avermi trasmesso la passione per gli studi e avermi sempre spronato, per essermi sempre stata vicino sin da quando ero piccolo. Cara nonna, mi ricordo quando mi abbracciavi e mi ripetevi sempre le tre paroline che io non sono mai riuscito a dirti, ma ora credo di dovertele dire...TI VOGLIO BENE.*

*Spero che anche voi siate orgogliosi di me come io lo sono di avere delle persone fantastiche al mio fianco, tutti voi mi avete insegnato molto e spero di avere altri momenti speciali con voi, perché ovunque sarò voi sarete con me, nel mio cuore.*

*Per concludere, vorrei rivolgere un consiglio a tutti quelli che sono indecisi sul fare o meno questa esperienza fuori casa come lo ero io, buttatevi, non guardatevi indietro, trovate la forza nascosta dentro ognuno di voi, all'inizio sarà difficile ma poi vi assicuro che vi sentirete a casa. Non lasciate mai che la paura di perdere vi impedisca di partecipare...*