

**Tecniche di trattamento del campione (acqua, macroalghe ed altro substrato) e riconoscimento delle microalghe bentoniche tossiche:
Ostreopsis spp., *Coolia monotis* e *Prorocentrum lima***

**Modulo II formativo per corso teorico-pratico
" Fioriture algali di *Ostreopsis ovata* lungo le coste italiane"
APAT –ARPA**

**15-17 maggio 2007
Cesenatico**

**C. Mazziotti, M. Benzi, C. Silvestri – ARPA SOD Cesenatico
M. Pompei, M. Cangini, - Centro Ricerche Marine
N. Melchiorre – ARPAL – Dip. La Spezia**

Proposta

CAMPIONAMENTO E ANALISI DI MICROALGHE BENTICHE

- PRELIEVO
- TRATTAMENTO DEL CAMPIONE
- ESPRESSIONE DEL RISULTATO

METODICA PROPOSTA

ARPAT, Dipart. di Massa Carrara e Livorno

1998 – 2000 - 2001

**ARPAL, Dipartimento di
La Spezia**

2000 - 2001

Laboratorio di Biologia Marina di Bari

2001

CENTRO RICERCHE MARINE

Gennaio 2002

**Incontro in cui si concordò la necessità di
informare**

le Autorità competenti

**Ministero dell' Ambiente e della Tutela del Territorio
Ministero della Salute
Istituto Superiore di Sanità**

Norma europea UNI EN 13946

Norma guida per il campionamento di routine ed il pretrattamento di diatomee bentoniche da fiumi.

PRELIEVO



Acqua

da prelevare **vicino** alla macroalga

fissazione con Lugol (0,5 - 1 mL/250mL di campione)

per Epifluorescenza e/o SEM formaldeide neutralizzata conc. 2-4%

metodo di Utermöhl (Magaletti *et al.*, 2001)



Magaletti et al., 2001. Fitoplancton – Acqua, scheda 11, in A.M. Cicero & I. Di Girolamo (eds.), Metodologie Analitiche di Riferimento del Programma di Monitoraggio per il controllo dell'ambiente Marino costiero (triennio 2001-2003). Ministero dell'Ambiente e della Tutela del Territorio, ICRAM. © ICRAM, Roma 2001.

Macroalghe

al fine di rendere il campione maggiormente rappresentativo...

3 PRELIEVI in 10 m



1 CAMPIONE



tecnica del sacchetto di plastica o del barattolo

trasferire in laboratorio, mantenere al buio ed a Temperatura ambiente

Macroalghe



+ acqua marina filtrata



sciacquare (ripetere)



fissare acqua di lavaggio con
soluzione neutra di lugol

Altri substrati



+ acqua marina filtrata



fissare acqua di lavaggio con
soluzione neutra di lugol

ESPRESSIONE DEL RISULTATO

Concentrazione finale = Cell/L

Per **Macroalga** e **Substrato** è necessario il Volume di acqua usato per il lavaggio

Solo per **Macroalga** è necessario il peso fresco

Esempio se 125000 Cell/L

Peso fresco = 20 g



Densità finale = $125000/20 = 6250$ Cell/g FW

Genere *Prorocentrum*

Si conoscono 25 specie bentiche ma, al momento, solo per 12 di queste è stata dimostrata la tossicità:

Prorocentrum emarginatum Fukuyo 1981

Prorocentrum ruetzlerianum Faust 1990

Prorocentrum concavum Fukuyo 1981

Prorocentrum rhathymum Loeblich, Sherley et Schmidt 1979

Prorocentrum borbonicum Ten-Hage, Turquet, Quod, Puiseux-Dao et Couté 2000

Prorocentrum lima (Ehrenberg) Dodge 1975

Prorocentrum hoffmannianum Faust 1990

Prorocentrum arenarium Faust 1994

Prorocentrum belizeanum Faust 1993

Prorocentrum faustiae Morton 1998

Prorocentrum maculosum Faust 1993

Prorocentrum cassubicum (Woloszynska) Dodge 1975

D
S
P

In Mediterraneo è stato ritrovato:

Prorocentrum lima

Prorocentrum rhathymum

Prorocentrum lima (Ehrenberg) Dodge

AO, DTX-1, DTX-2, DTX-4

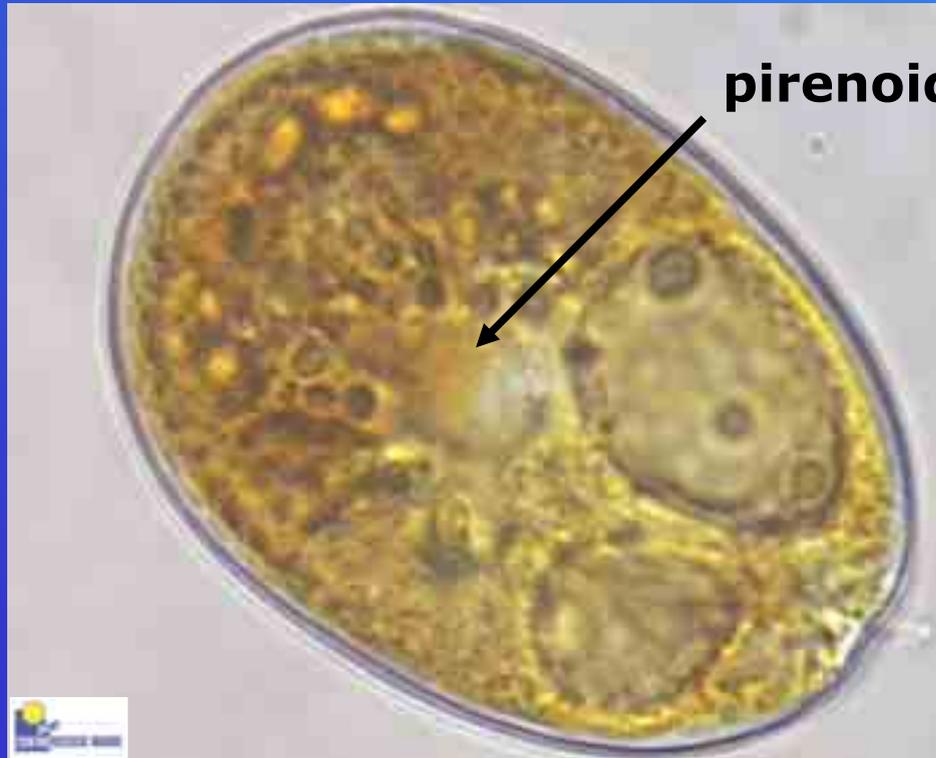
prorocentroidi

**Fast Acting Toxin (FAT)
tossina ad azione rapida**

Prorocentrum lima (Ehrenberg) Dodge

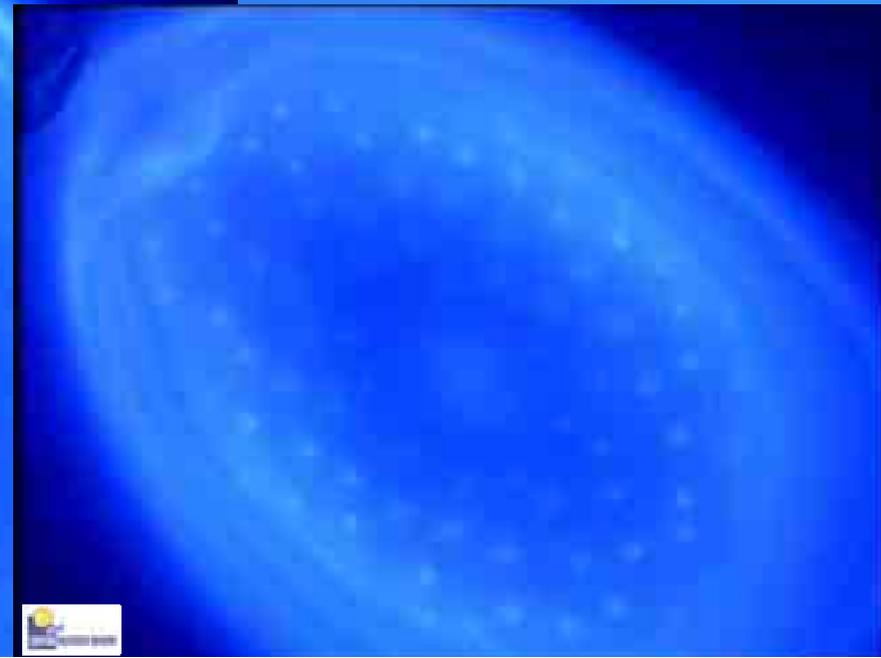
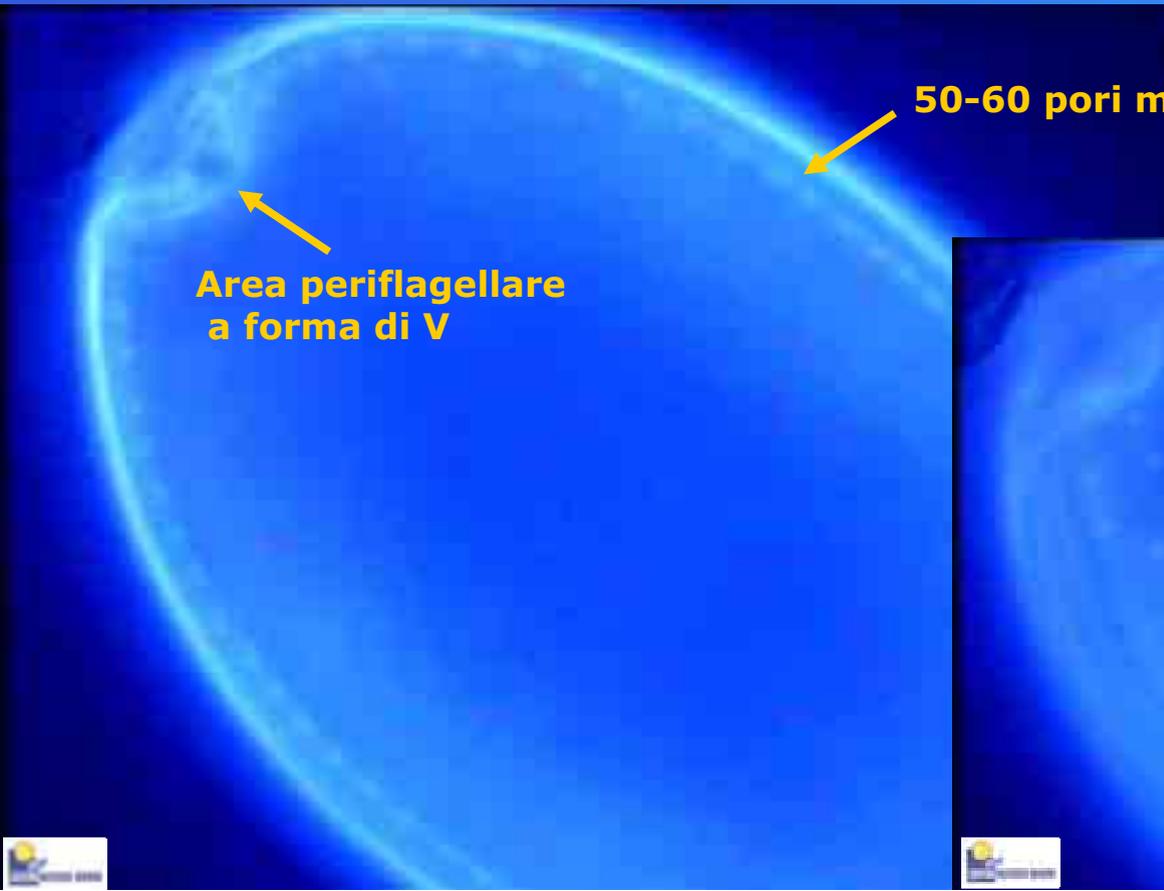
specie neritica ed estuarina, bentonica ed epifitica; può essere ticoplanctonica.

- cellula di taglia medio-piccola (lungh. 30-50 μ m; largh. 20-40 μ m)
- specie fotosintetica contenente 2 cloroplasti, 1 pirenoide centrale e 1 grande nucleo nella parte posteriore



Prorocentrum lima (Ehrenberg) Dodge

- L'area periflagellare consiste in una depressione superficiale di forma a V
- In ciascuna valva sono presenti 50-60 piccoli pori marginali (utili per la distinzione fra le specie) e 60-100 pori di dimensioni maggiori sparsi su tutta la superficie valvare tranne che nell'area centrale. Occasionalmente i pori marginali possono essere assenti. Nelle cellule più vecchie la superficie diviene vermiculata.



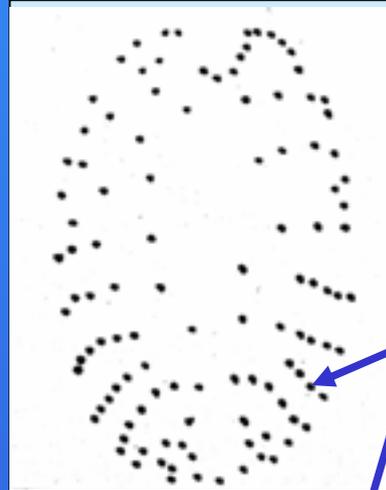
Prorocentrum rhathymum Loeblich, Sherley et Schmidt 1979

**Tossine
emolitiche**

- cellula asimmetrica, con forma di mandorla
- lunghezza 25-30 μ m; larga 20-22 μ m
- piccola spina apicale; valva destra con piccola dentellatura che può essere ornata da una linea di pori
- pirenoidi assenti



Prorocentrum rhathymum Loeblich, Sherley et Schmidt 1979



- pori marginali assenti
- pori valvari in sottili linee radiali perpendicolari al margine della cellula;



Genere *Coolia*

Tre specie bentiche:

Coolia areolata Ten-Hage, Turquet, Quod et Couté 2000

Coolia monotis Meunier 1919 **coliatossina**

Coolia tropicalis Faust 1995

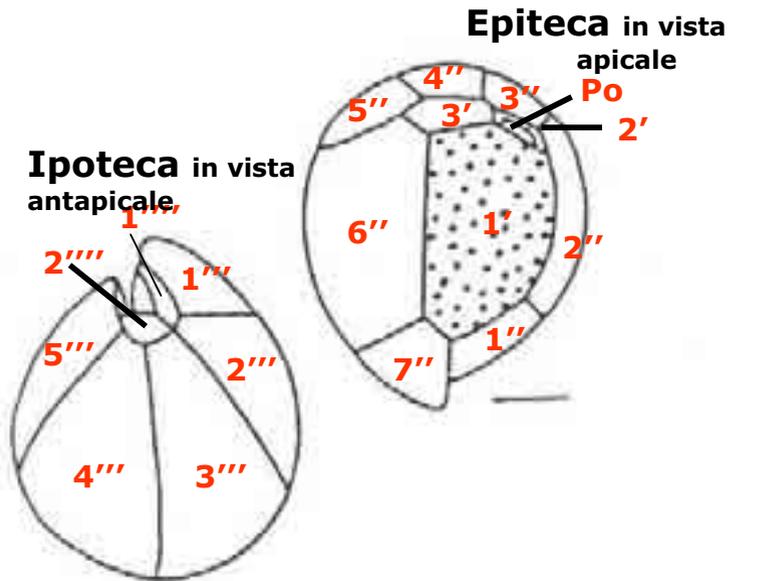
In Mediterraneo è stata ritrovata:

Coolia monotis

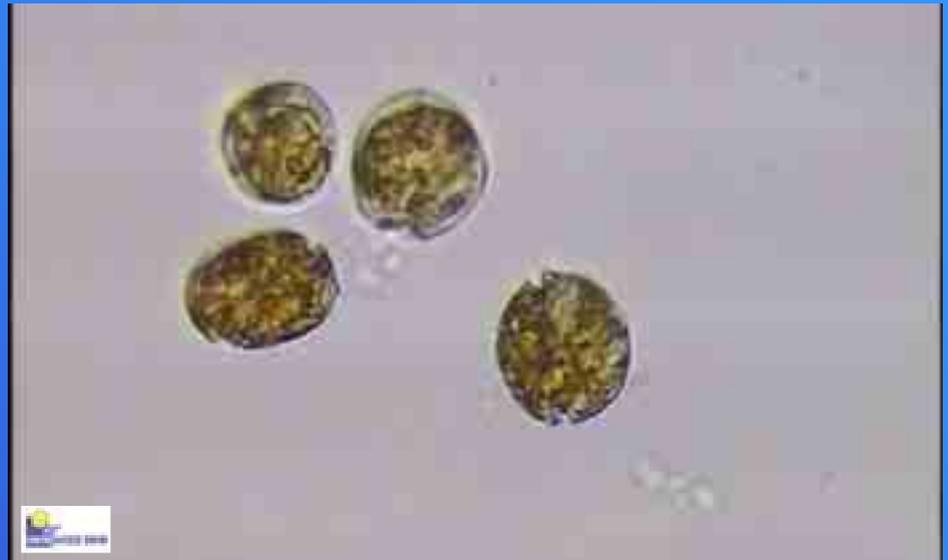
Coolia monotis Meunier

Cellula piccola (lunghezza 23-40 μ m) di forma lenticolare, con asse longitudinale obliquo. Epiteca pi \dot{u} piccola dell'ipoteca.

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



Faust 2002



- Cingolo equatoriale, diritto e profondo
- Solco corto, diritto e scavato
- Apice spostato dorsalmente
- Antapice spostato ventralmente
- Po eccentrico nella parte dorsale sinistra
- Cloroplasti giallo-bruni

Coolia monotis Meunier

Cooliatossina



Superficie tecale liscia e coperta da larghi pori

Genere *Ostreopsis*

Nove specie bentiche:

Ostreopsis belizeanus Faust

Ostreopsis caribbeanus Faust

Ostreopsis labens Faust & Morton

Ostreopsis marinus Faust 1999

Ostreopsis heptagona Noris, Bomber et Balech 1985

Ostreopsis lenticularis Fukuyo 1981

Ostreopsis mascarenensis Quod 1994

Ostreopsis ovata Fukuyo 1981

Ostreopsis siamensis Schmidt 1902

} **palitossine**

In Mediterraneo è stata ritrovata:

Ostreopsis ovata

Ostreopsis cf. siamensis

Ostreopsis spp

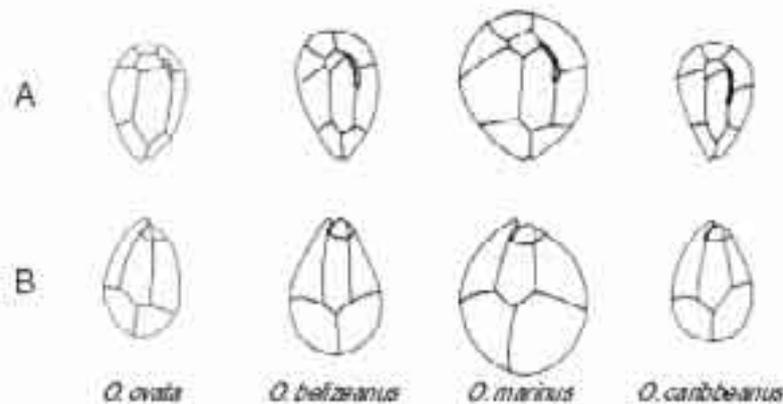
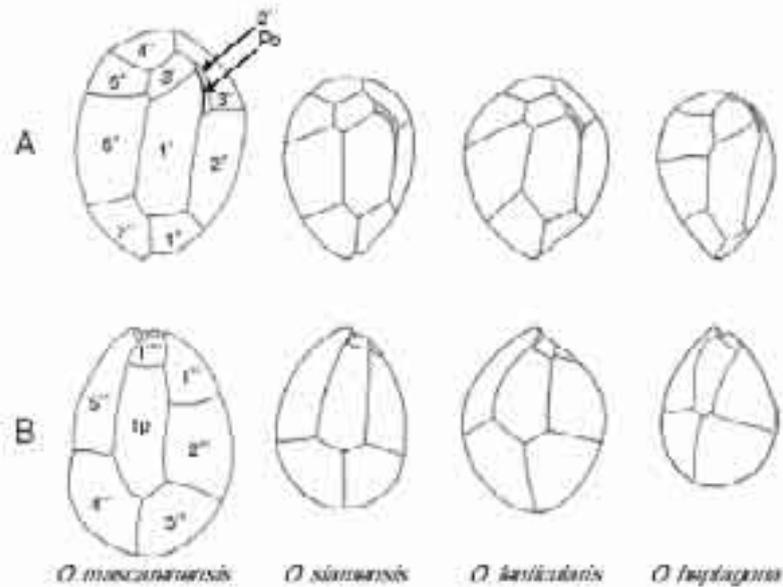


Fig. 15. Plate tabulation of *Ostreopsis* spp. A. epiborea, B. hypotheca (from Fukuyo 1981, Nomura et al. 1985, Quod 1984, Faint 1999).

Fig. 15. Tabulation de *Ostreopsis* spp. A. épibéque, B. hypothéque (tiré de Fukuyo 1981, Nomura et al. 1985, Quod 1984, Faint 1999).

caratteri di distinzione:

- forma e dimensioni della cellula
- forma e dimensioni delle placche della teca
- ornamentazioni della superficie tecale

Ostreopsis ovata Fukuyo 1981

Analoghi della Palitossina

Cellula di piccola-media dimensione

Lunghezza 47-55 μm

Larghezza 27-35 μm

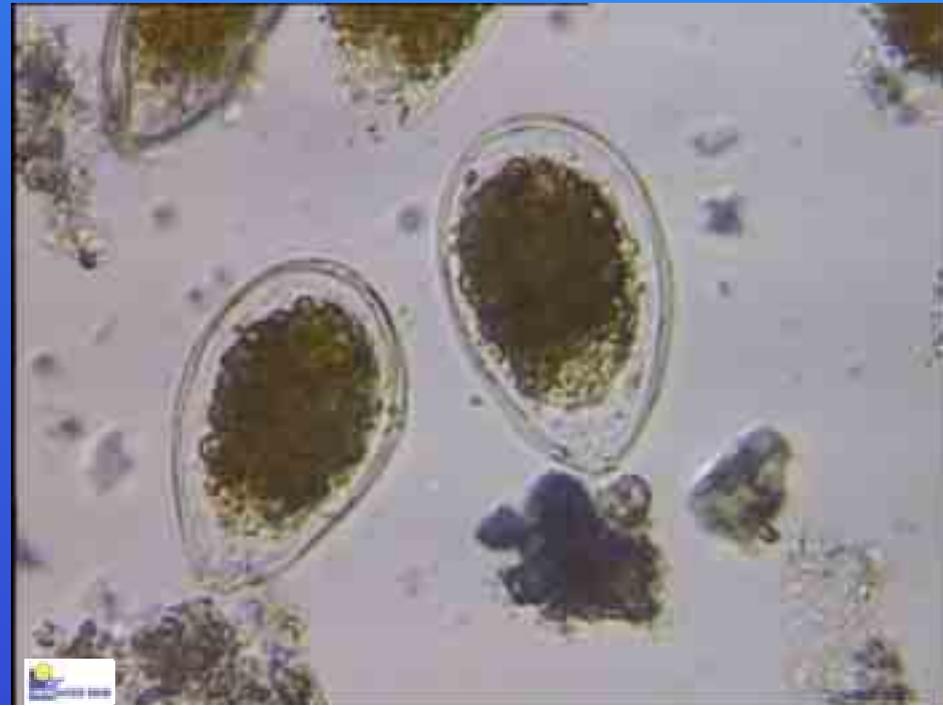
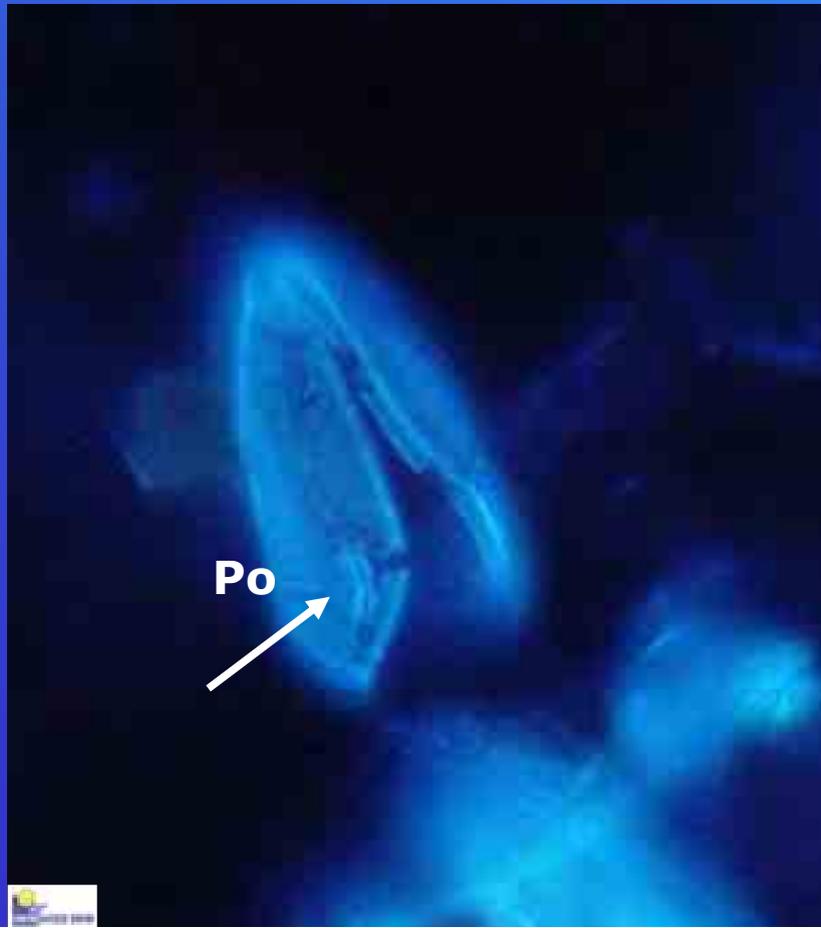
Specie epifita, bentonica, ticoplanctonica

fotosintetica, con molti cloroplasti



Ostreopsis ovata Fukuyo 1981

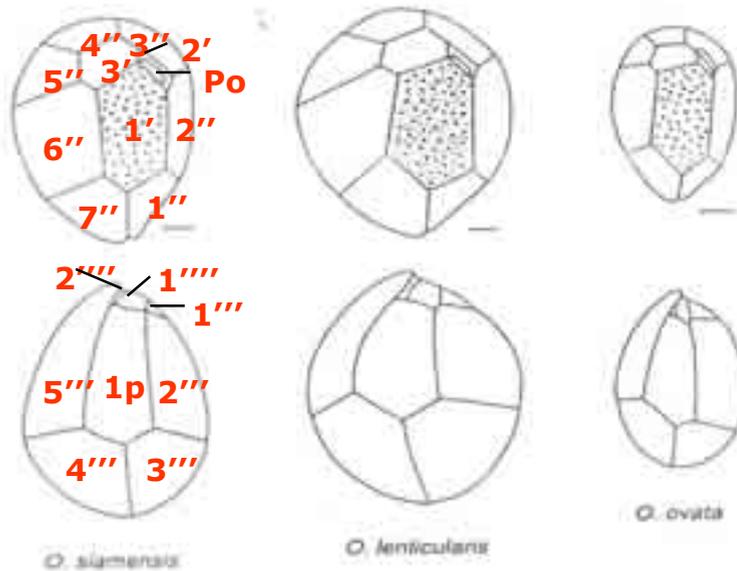
- forma ovoidale, appuntita verso il solco
- cingolo equatoriale, diritto e profondo; solco molto corto
- il Po è allungato (ca. 8 μm) ed eccentrico



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

Ostreopsis ovata:

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



epiteca

ipoteka

(Fukuyo 1981)

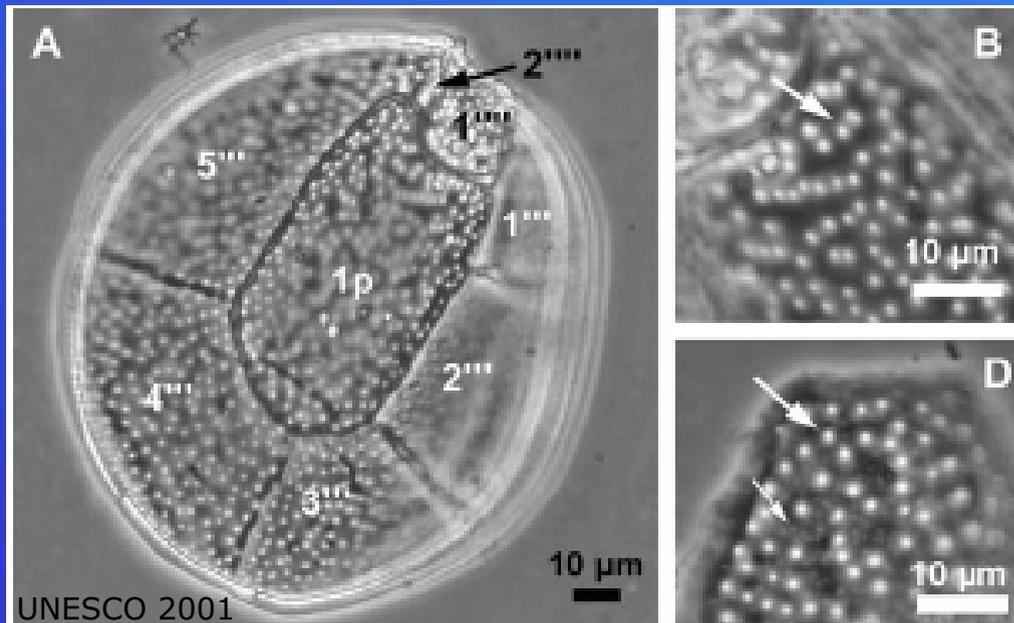
O.siamensis è più larga e più rotondeggiante di *O.ovata*

Ostreopsis siamensis Schmidt 1902

- Specie epifita, bentonica, ticoplanctonica
- fotosintetica, con molti cloroplasti
- forma ovoidale, talvolta arrotondata, appuntita verso il solco
- cingolo equatoriale, alcune volte ondulato
- il Po è allungato ed eccentrico
- placche coperte con grandi pori



Lunghezza 100-123 μm
Larghezza 75-85 μm



ostreocina D
(analogo della Palitossina)

un solo tipo di pori

Prorocentrum lima
Prorocentrum rhathymum

Ostreopsis ovata
Ostreopsis cfr. siamensis

Coolia monotis

Sono specie bentoniche potenzialmente tossiche rilevate lungo le coste italiane ma questo non esclude che altre specie epifitiche tossiche possano essere presenti nel nostro mare dal momento che fino ad ora sono stati effettuati solo monitoraggi delle acque superficiali.

Solamente eseguendo monitoraggi sistematici su campioni bentonici si potranno avere maggiori conoscenze.

Particolare attenzione dovrà essere data all'identificazione di specie non ancora segnalate nei nostri mari, procedendo con metodiche diverse come analisi al SEM, sonde molecolari nonché prove tossicologiche specifiche.

Bibliografia

- Faust, M. A. & Gulledge, R. A. 2002. *Identifying Harmful Marine Dinoflagellates*. Contributions of the United States National Herbarium, Department of Systematic Biology – Botany, National Museum of Natural History, Smithsonian Institution, Washington Volume 42: 1-144
- Fukuyo, Y. (1981) Taxonomical study on benthic dinoflagellates collected in coral reefs. Bull. Jap. Soc. Sci. Fish. 47, 967-978.
- Steidinger, K. A.. & Tangen, K. 1996. *Dinoflagellates*. In: Tomas, C. R. (ed.). *Identifying marine diatoms and dinoflagellates*. Academic Press, Inc., San Diego: 387-584.
- Potentially Harmful Microalgae of the Western Indian Ocean – a guide based on a preliminary survey IOC Manuals and Guides N° 41. Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO 2001