

S.I.B.M.



CORSO TEORICO-PRATICO SULL'INSORGENZA  
DI PROBLEMATICHE AMBIENTALI E SANITARIE  
RELATIVE ALLE FIORITURE DI OSTREOPSIS SPP.



Foto G.P. Felici, Dip. di Biologia e Patologia Vegetale - Uniba

Bari, Palazzo dell'Ateneo – Aula Magna  
14-15 Giugno 2007

# Proposte di metodiche e protocolli di monitoraggio

*Cecilia Totti*

*Dip. Scienze del mare*

*Università Politecnica delle  
Marche, Ancona*

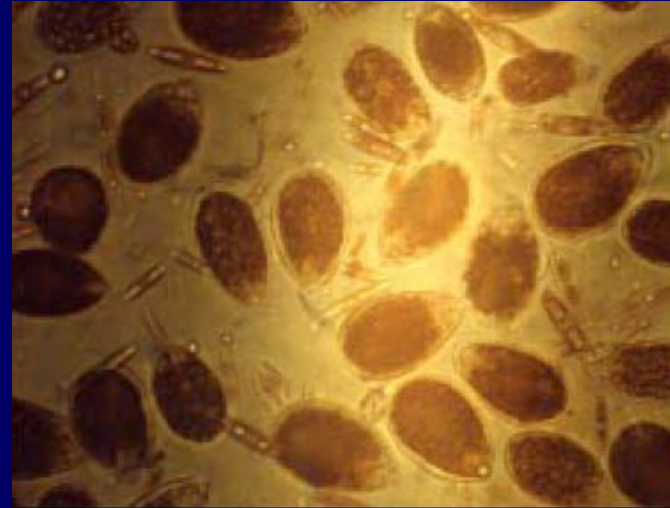
[c.totti@univpm.it](mailto:c.totti@univpm.it)

# *Ostreopsis* sp.

Le *Ostreopsis* spp. sono microalghe bentoniche e vivono sopra vari substrati:

- macrofite (macroalghe e angiosperme marine)
- substrati duri
- invertebrati marini
- sabbie

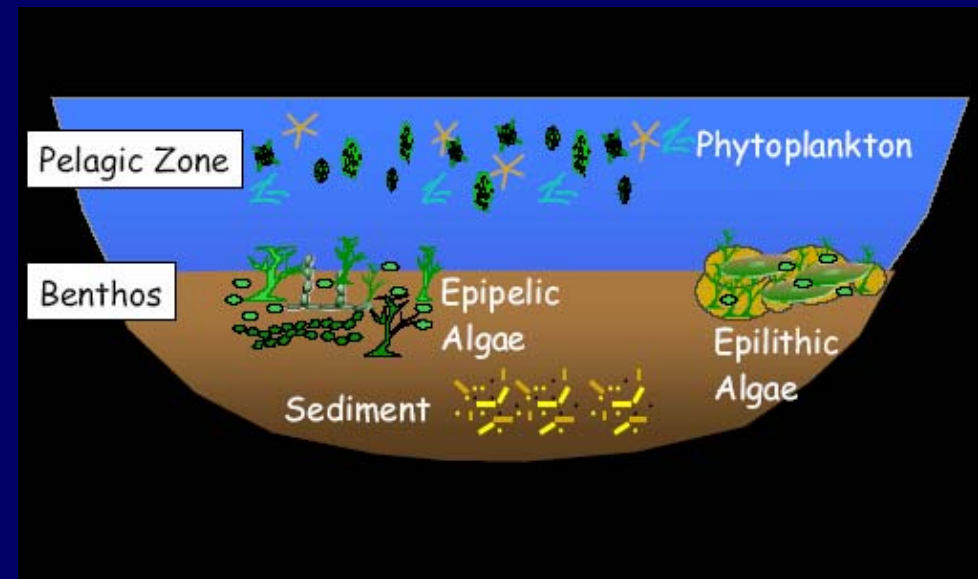
Fanno parte delle comunità **microfitobentoniche**.



# Le comunità microfitobentoniche

Round, 1981

- *Epipeliche* (sopra il sedimento molle)
- *Epipsammiche* (attaccate ai granelli di sabbia)
- *Endopeliche* (dentro il sedimento)
- *Epilitiche* (sopra substrati duri)
- *Endolitiche* (dentro substrati duri)
- *Epifitiche* (sopra altri vegetali)
- *Epizoiche* (sopra animali)



# Le comunità microfitobentoniche

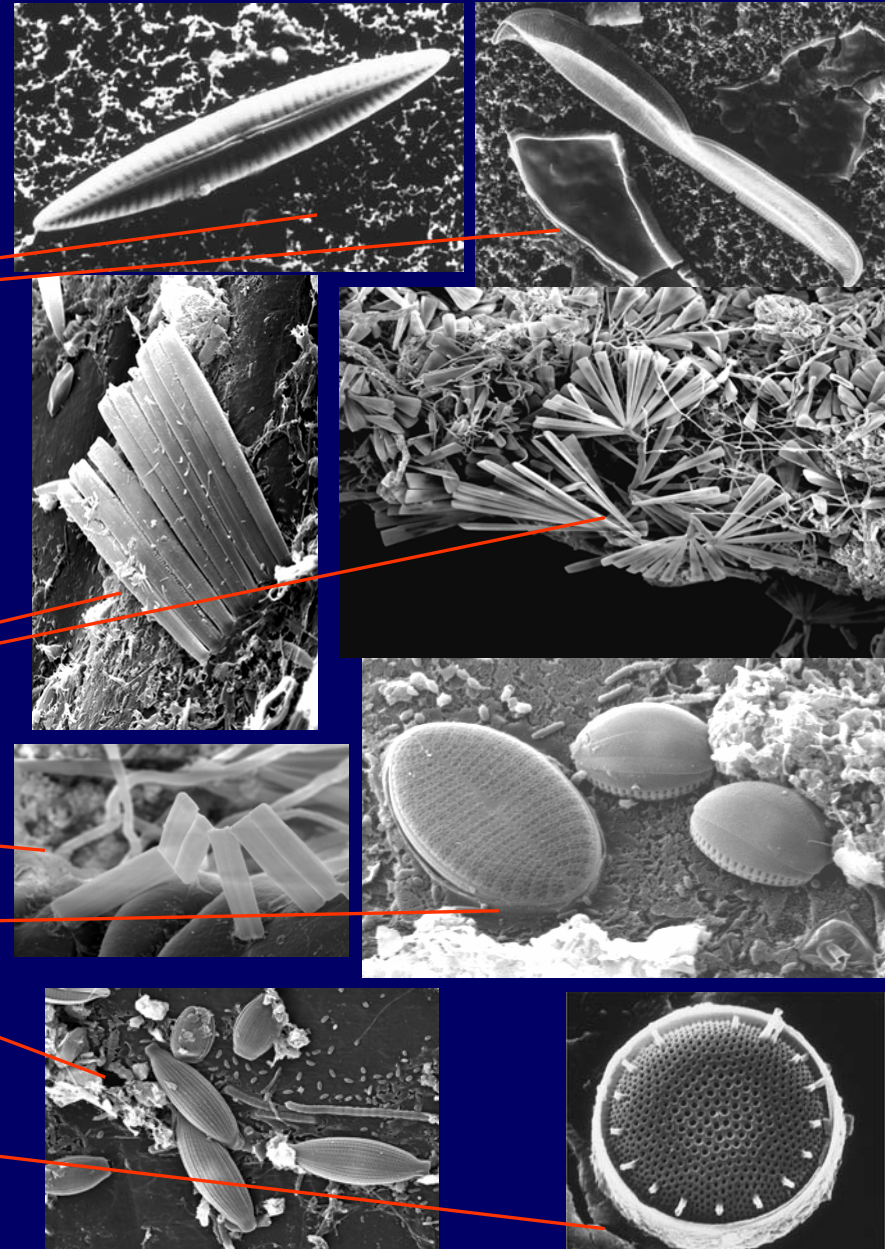
Tutte le **classi algali** sono rappresentate nel microfitobenthos:

- le **diatomee** sono quasi sempre le più abbondanti, sia in acqua dolce che in mare
- i **cianobatteri** sono più comuni nelle acque dolci, ma presenti e abbondanti anche in mare
- le **dinoflagellate** sono presenti a tutte le latitudini ma più comuni nei fondali dei mari tropicali.

# Diatomee bentoniche

Le diatomee rappresentano la più importante e diffusa componente delle comunità microfitobentoniche:

- forme **libere**: Birafidee più o meno dotate di motilità;
- forme **sessili**: per lo più Monorafidee e Arafidee; vari i meccanismi di attacco:
  - mediante filamenti o cuscinetti mucilluginosi prodotti all'apice (**erette**)
  - adesione al substrato mediante la faccia valvare (**adnate**)
- cellule **planctoniche** che sedimentano sul fondo dove possono continuare a vivere e fotosintetizzare.



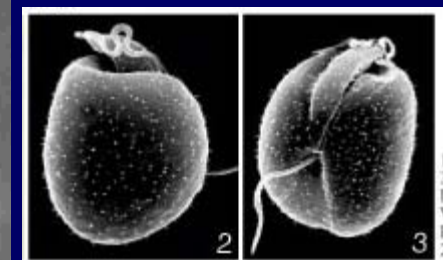
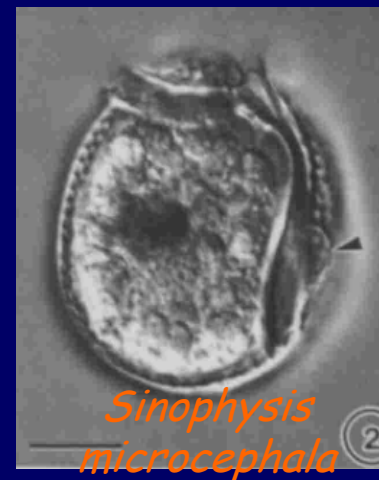
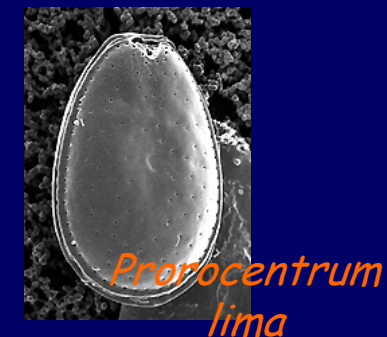
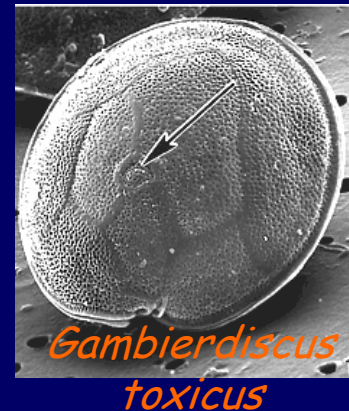
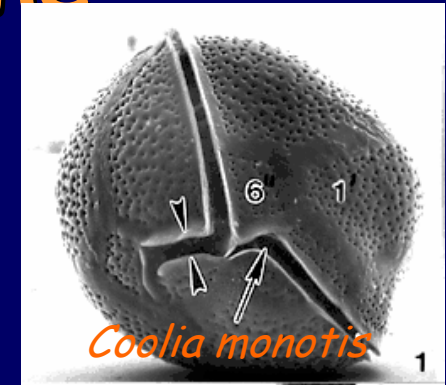
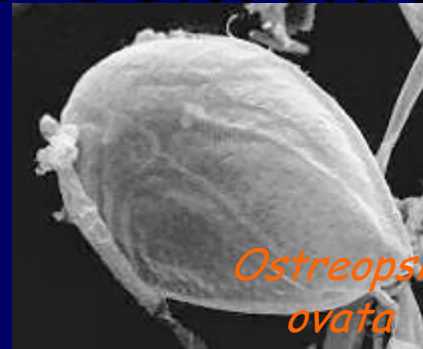
# Dinoflagellate bentoniche

Le dinoflagellate bentoniche sono presenti sia in habitat tropicali che temperati.

I cicli vitali delle dinoflagellate sono complessi e prevedono spesso fasi bentoniche (**cisti**).

Relativamente **poche specie** (tossiche o non tossiche) occupano stabilmente l'habitat bentonico:

- forme spesso **appiattite**: facilitano il movimento tra i granelli di sabbia;
- **adesività** molto forte: evita il dilavamento durante le escursioni di marea.



# Cianobatteri bentonici

Gruppo di estrema importanza e diffusione.

Principalmente forme filamentose.

L'importanza dei cianobatteri aumenta dalle regioni temperate ai **tropici**.

Nelle aree temperate il picco dei cianobatteri si ha in **estate**.

Importanza ecologica delle *mats* di cianobatteri:

1. **produzione primaria**
2. **fissazione dell'azoto atmosferico.**



# Distribuzione del microfitobenthos

## Orizzontale

- La distribuzione orizzontale del microfitobenthos è tipicamente a **patches**.

## Verticale

- Zona eufotica nei sedimenti: da qualche decimo di mm a diversi mm di profondità.

# Importanza ecologica del microfitobenthos

- Produzione primaria: in zone poco profonde **biomassa superiore** a quella del fitoplancton della colonna d'acqua soprastante
- Regolazione dei flussi di nutrienti e di ossigeno nel sedimento
- Relazioni trofiche con meiofauna e macrofauna

# Fattori che condizionano la produzione primaria microfitobentonica

La distribuzione e l'attività del microfitobenthos sono regolate da numerosi fattori biotici e abiotici che comprendono:

- luce
- nutrienti
- idrodinamismo
- *grazing*
- caratteristiche fisico-chimiche del substrato

# Luce

È il più importante fattore coinvolto nella variabilità della produttività primaria microfitobentonica.

Una produzione primaria netta sarà osservata solo quando la superficie del substrato riceve luce sufficiente a compensare le perdite dovute alla respirazione (ca. **1% dell'intensità di superficie**).

**Intertidale:** un'irradianza minima per la crescita delle diatomee è spesso presente in tutto l'arco dell'anno; solo in inverno la luce può essere limitante.

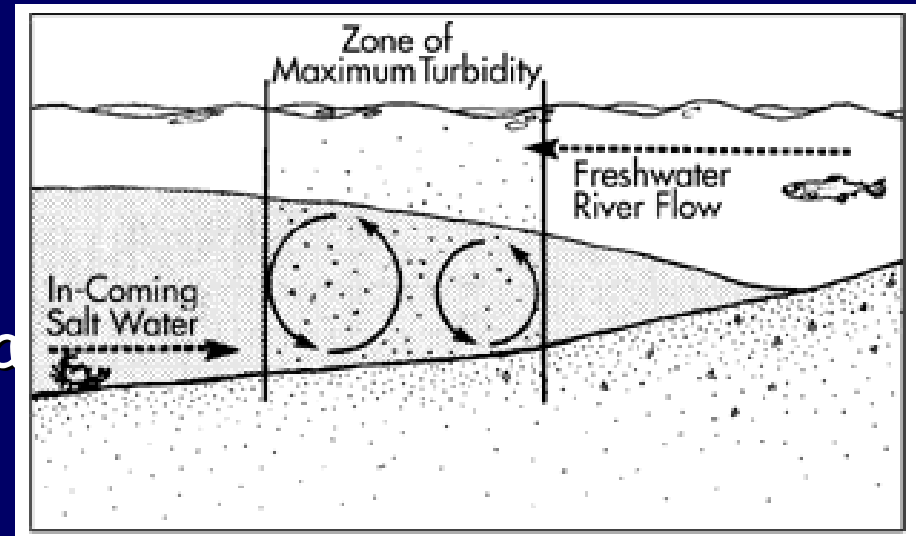
**Subtidale:** la luce è spesso il principale fattore limitante → trasparenza della colonna d'acqua. Spesso una quantità di luce  $>1\%$  riesce a raggiungere la superficie dei substrati anche a 40 m.

# Risospensione

Effetti dell'idrodinamismo →  
**risospensione**

In ambienti poco profondi e ad elevato idrodinamismo la clorofilla nella colonna d'acqua può essere in gran parte di origine microfitobentonica.

La distinzione tra fitoplancton e microfitobenthos, soprattutto in ambienti poco profondi è spesso **artificiale**.



*Paralia sulcata*, una diatomea centrica bentonica spesso presente anche nel plancton<sup>2</sup>

# Monitoraggio di *Ostreopsis* spp.

Campionamento e monitoraggio delle *Ostreopsis* spp. simile a quello delle altre comunità microfitobentoniche.

Nel campionamento è bene distinguere due finalità:

- monitoraggio a fini "istituzionali" → definire la presenza/assenza o la presenza oltre un valore soglia (Quale? Non lo sappiamo ancora)
- campionamento al fine di definire la reale distribuzione di queste specie in un'area, per studi ecologici più approfonditi (variabilità spaziale e temporale della fioritura, relazioni con il substrato, effetti dei parametri ambientali etc.)

# Protocollo di campionamento e analisi

Il presente protocollo è stato elaborato da un gruppo di ricercatori della Bentox-net ed è attualmente in fase di sperimentazione.

# Campionamento

# Scelta dell'area

*Ostreopsis* predilige ambienti protetti, poco profondi, con substrato roccioso disponibile.

Per una data area occorrerà campionare in più siti e su substrati differenti, al fine di rappresentare l'intera variabilità spaziale dell'area.

La scelta dei siti dovrebbe essere definita considerando le caratteristiche geomorfologiche di ciascuna area.



# Parametri

Nei punti di campionamento rilevare i seguenti parametri:

## Colonna d'acqua:

- temperatura, salinità
- nutrienti
- fitoplancton

## Condizioni meteorologiche:

- temperatura dell'aria
- vento
- moto ondoso

# Substrati

- Macrofite
- Rocce, sassi
- Invertebrati: idroidi, gusci di molluschi (patelle, mitili etc.)
- Sabbie
- Colonna d'acqua

Ciascun substrato andrebbe campionato in **tre repliche**.

Per il campionamento esistono **protocolli differenti** a seconda del substrato.

*I substrati devono essere mantenuti  
indisturbati*

# Macrofite

- È opportuno effettuare la raccolta di **specie diverse** di macroalghe.
- Il grado di epifitismo dipende dalla **morfologia del tallo**: alghe a tallo ramificato e complesso sono più epifitate di quelle a tallo laminare.
- Questa regola vale per tutte le microalghe epifite.



*Chondria*



*Ulva*

# Macrofite

- In **immersione**: in ogni punto di prelievo, raccogliere **separatamente 3** campioni della stessa specie (almeno 20g).
- Ricoprire il tallo con un sacchetto, recidere alla base con un coltello, quindi chiudere il sacchetto sott'acqua.
- A bordo trasferire il tutto in un barattolo.



## *Substrati duri*

- Campionare i vari substrati (gusci di molluschi, rocce, sassi) prelevandoli se necessario mediante l'aiuto di martello e scalpello.
- Avvolgere il substrato sott'acqua con un **sacchetto** e chiuderlo prontamente
- Porre separatamente i substrati raccolti in **barattoli** aggiungendo se necessario acqua di mare filtrata.

Durante il campionamento è importante **evitare di toccare la superficie del substrato** al fine di evitare la perdita di cellule.

# Sabbie

- Campionare mediante cilindro di Plexiglas o siringa decapitata.
- Inserire manualmente nel sedimento, fino a 3-5 cm ed estrarre.
- Capovolgere lo stantuffo inserendolo nella parte inferiore della carota e far fuoriuscire i 0.5 cm superiori.
- Tagliare con una lametta e raccogliere in una barattolino.
- Aggiungere un volume noto di acqua di mare filtrata e formalina.



# Trattamento per il distacco delle epifite e conservazione dei campioni

# Macrofite

- **Agitare** il barattolo per favorire il distacco delle epifite.
- Porre il barattolo all'interno di un **bagno a ultrasuoni** per 4'.
- Prelevare il tallo, conservando l'acqua di raccolta, e risciacquarlo accuratamente per almeno 3 volte con **acqua di mare filtrata** per rimuovere completamente le epifite, e **unire tutta l'acqua utilizzata per i risciacqui all'acqua di raccolta**.
- Controllare la superficie del tallo al binocolare o microscopio.
- Eventualmente procedere con altri trattamenti al sonicatore e risciacqui aggiuntivi finché la macroalga non risulterà "pulita".



# Macrofite

- L'**acqua di raccolta** del campione unita a quella dei **risciacqui** viene portata ad un **volume noto** mediante aggiunta di acqua di mare filtrata (annotare).
- Si aggiunge a questo punto il **fissativo**.
- Il campione viene conservato in **frigorifero** fino al momento dell'analisi al microscopio.

# Macrofite

Il tallo appena sottoposto al trattamento dovrà essere pesato:

- **peso fresco**: la macroalga viene pesata dopo sgocciolamento su carta assorbente per rimuovere l'acqua in eccesso;
- **peso secco**: i campioni vanno posti in contenitori termici pre-pesati, e messi in stufa a **60°C** fino al raggiungimento di un peso costante (pesare ad intervalli di 4 ore, finché 3 pesate consecutive non daranno lo stesso risultato).

In alternativa si può anche calcolare la **superficie** dell'alga:

- il tallo viene appiattito e aperto su un foglio e viene misurata l'area mediante un righello. Quindi il valore ottenuto va moltiplicato x 2.



# Macrofite

Per ogni campione annotare i seguenti dati:

- *volume di acqua finale* (acqua di raccolta del campione + acqua utilizzata per i risciacqui + eventuale acqua di mare filtrata utilizzata per portare a volume)
- *peso fresco* del tallo
- *peso secco*
- o
- *superficie* del tallo

# *Substrati duri*

- Togliere dal barattolo il substrato da analizzare, senza toccarne la superficie e **conservarne l'acqua di raccolta**.
- Rimuovere le microalghe tramite **raschiamento** raccogliendo il grattato in una vaschetta. Risciacquare più volte con **acqua di mare filtrata**, che sarà sempre raccolta assieme al grattato nella vaschetta.
- Aggiungere il grattato ottenuto all'acqua di raccolta del barattolo iniziale, e portare il tutto a un **volume noto**, mediante aggiunta di acqua di mare filtrata.
- Aggiungere il fissativo.
- Il campione così ottenuto va conservato in frigorifero fino al momento del conteggio al microscopio.
- Misurare l'**area** del substrato mediante l'uso di una **riga graduata**, cercando di ricondurre la forma del substrato alla figura geometrica più opportuna.

## *Substrati duri*

Per ogni campione annotare i seguenti dati:

- *volume di acqua finale* (acqua di raccolta del campione + acqua utilizzata per i risciacqui + eventuale acqua di mare filtrata utilizzata per portare a volume);
- *area del substrato* sottoposto a grattaggio.

# *Sabbie*

Il campione raccolto (sedimento più acqua di mare filtrata) può essere analizzato tal quale (vedi oltre) o sottoposto a trattamenti diversi per separare le cellule dal sedimento (Hallegraeff *et al.*, 2003; Totti *et al.*, 2003).

# Fissativo

Se il campione non viene trattato subito per il distacco delle epifite, aggiungere il fissativo immediatamente dopo il campionamento.

## Formalina

- Se aggiunta prima dei trattamenti (al campione di macroalga) → 4%
- Se aggiunta dopo il trattamento (all'acqua) → 2%

## Lugol

Soluzione di Lugol acida (0.5 - 1 ml di soluzione ogni 250 ml di campione)

*Isolamento cellule: non aggiungere fissativo!!*

# Nota

Se dopo le operazioni di risciacquo il campione avesse raggiunto un volume finale di acqua elevato (campione molto diluito) si può concentrarlo:

- Lasciar **decantare** il campione nel barattolo per **24-36 ore** senza agitarlo e rimuovere delicatamente con una pipetta l'acqua dalla superficie del campione senza mai neanche avvicinarsi al fondo del barattolo, fino al raggiungimento del volume desiderato.  
**Annotare il volume finale ottenuto.**
- **Filtrare** l'acqua su filtro con maglia da 20  $\mu\text{m}$ ; recuperare tutto il materiale, sciacquando accuratamente il filtro con acqua di mare filtrata. Portare a volume noto con acqua di mare filtrata.  
**Annotare il volume finale ottenuto.** Sconsigliato in quanto:
  - la filtrazione e il successivo recupero mediante risciacqui comportano sempre una perdita di cellule
  - le cellule di *Ostreopsis* sono delicate e si rovinano facilmente

# Analisi e conteggio

# Conteggio

Metodo **Utermöhl** (Zingone *et al.*, 1990). Il campione di acqua va agitato delicatamente e a lungo al fine di renderlo omogeneo e versato in un complesso cilindro/camera.

Scelta del volume → ottenere un campione con un numero di cellule significativo, e tale da poter essere analizzato agevolmente.

Si effettua il conteggio su **tutta la camera** o su porzioni ad area nota (**transetti** o **campi casuali**).



# Conteggio

Per campioni molto concentrati o campioni provenienti da sabbie occorre **sedimentare volumi molto piccoli** (100-200  $\mu$ l): pipettare e scaricare in un cilindro-camera precedentemente riempito con acqua di mare filtrata  $\rightarrow$  si produce una sedimentazione omogenea.



# Risultati

$$\text{cell. g}^{-1} fw = \left( \frac{c\_cont * fattore * vol\_fin}{vol\_sed} \right) / fw$$

$$\text{cell. cm}^{-2} = \left( \frac{c\_cont * fattore * vol\_fin}{vol\_sed} \right) / area$$

*c\_cont* = cellule contate;

*fattore* = rapporto tra area della camera e area esplorata (1 o 2 transetti, n campi casuali, mezza camera, 1 camera); se si osserva tutta la camera il fattore è = 1;

*vol\_fin* = volume finale del campione (in ml): acqua in cui è stato conservato il campione + acqua di lavaggio + acqua eventualmente aggiunta per portare a volume;

*vol\_sed* = volume di campione sedimentato (in ml);

*fw* = peso fresco del tallo (g);

*dw* = peso secco del tallo (g);

*area* = area del substrato sottoposto a grattaggio (cm<sup>2</sup>).

# Unità di misura

Esempio:

Se da un campione di acqua del volume finale di 500 ml (ottenuto da una macroalga avente peso fresco di 30 g), si sedimentano 10 ml e si contano 900 cellule di *Ostreopsis* su tutta la camera (fattore = 1), la densità per grammo di peso fresco sarà 1500 cell. g<sup>-1</sup> fw.

# Unità di misura

Epifite: cell.  $g^{-1}$  fw o cell.  $g^{-1}$  dw o cell.  $cm^{-2}$ .

Epilitiche: cell.  $cm^{-2}$ .

Epipeliche: cell.  $cm^{-2}$ ; cell.  $cm^{-3}$ ; cell  $g^{-1}$ .

Studi ecologici → è necessario dare anche un'idea della distribuzione dei substrati nell'area:

- stimare la **effettiva copertura macroalgale** e **riportare la misura per  $m^2$** .
- stimare la densità delle rocce e degli altri substrati.

Ad esempio per un'area di mare, una baia etc. si può pensare di esprimere le concentrazioni di  $O_2$  per  $m^2$  dando un valore medio o anche differenziando le misure riferendole alle macrofite o alle rocce o agli invertebrati.

# Metodi alternativi

Marinella Abbate (ENEA, La Spezia)

- Si utilizza una **siringa** in plastica da 50 cc con il puntale **tagliato** in modo da avere una superficie di prelievo di 20 mm<sup>2</sup>.
- Appoggiare la siringa sul substrato (macroalga, roccia), inclinata di 30°.
- Aspirare la superficie del substrato su una superficie di 20 mm<sup>2</sup> per un volume di 20 ml.
- Scaricare la siringa in una bottiglietta.
- Per ogni substrato ripetere il prelievo in tre punti diversi.
- Per campionamenti in immersione chiudere la siringa con una tettarella e riportarla in superficie
- In questo modo si possono dare i risultati in cell. ml<sup>-1</sup> con riferimento ad una superficie nota.



**Non è un metodo quantitativo, ma può essere utile in quanto rapido e pratico. Inoltre fornisce abbondanze relative tra loro comparabili.** <sup>39</sup>

# Protocolli

I protocolli di campionamento devono essere aggiustati sulla base della finalità che si persegue.

Per una finalità istituzionale (ARPA), la conoscenza delle densità di *Ostreopsis* in tutti i substrati e su tutta l'area è troppo dettagliata.

*Ostreopsis* potrebbe essere ricercata solo su substrati scelti (alcune macrofite, alcuni substrati duri, colonna d'acqua) e solo in siti "chiave".

Valore soglia: andrebbe definito solo in relazione ai livelli di tossicità.

# Bibliografia

## Metodi per campionamento e analisi di microalghe bentoniche:

Hallegraeff G.M., Anderson D.M., Cembella A.D., 2003 *Manual on harmful marine microalgae*. UNESCO.

Totti C., De Stefano M., Facca C., Ghirardelli L.A., 2003. Il microfitobenthos. In: Gambi M.C., Dappiano M. (eds) *Manuale di metodologie di campionamento e studio del benthos marino mediterraneo*. *Biol. Mar. Medit.*, 10 (Suppl.): 263-284.

## Metodi per campionamento e analisi di macrofite

Buia M.C., Gambi M.C., Dappiano M., 2003. I sistemi a fanerogame marine. In: Gambi M.C., Dappiano M. (eds) *Manuale di metodologie di campionamento e studio del benthos marino mediterraneo*. *Biol. Mar. Medit.*, 10 (Suppl.): 145-198.

Cormaci M., Furnari G., Giaccone G., 2003. Macrofitobenthos. In: Gambi M.C., Dappiano M. (eds) *Manuale di metodologie di campionamento e studio del benthos marino mediterraneo*. *Biol. Mar. Medit.*, 10 (Suppl.): 233-262.

## Metodi per campionamento e analisi di fitoplancton

Zingone A., Honsell G., Marino D., Montresor M., Socal G., 1990. Fitoplancton. *Nova Thalassia*, 11: 183-198.