

A. PENNA, E. BERTOZZINI, C. BATTOCCHI, M.G. GIACOBBE¹, L. GALLUZZI², A. LUGLIÉ³,
M. MASÒ⁴, S. PRIOLI⁵, A. MILANDRI⁶, M. POMPEI⁶, M. MAGNANI

Centro di Biologia Ambientale, Università di Urbino "Carlo Bo", Viale Trieste, 296 – 61100 Pesaro (PU), Italia.
a.penna@uniurb.it

¹Istituto per l'Ambiente Marino Costiero, CNR, Messina, Italia.

²Centro di Biotecnologie, Università di Urbino "Carlo Bo", Fano (PU), Italia.

³Dip. Botanica ed Ecologia Vegetale, Università di Sassari, Sassari, Italia.

⁴Institut de Ciències del Mar, ICM-CSIC, Barcelona, Spagna.

⁵Mare Soc. Coop. a.r.l., Cattolica (RN), Italia.

⁶Centro Ricerche Marine, Cesenatico (FC), Italia.

MONITORAGGIO DI AREE COSTIERE INTERESSATE DA FIORITURE DI FITOPLANCTON TOSSICO: APPROCCI MOLECOLARI E NUOVE PROPOSTE DI CONTROLLO

MONITORING OF COASTAL AREAS AFFECTED BY HAB PHYTOPLANKTON BLOOMS: MOLECULAR APPROACHES AND NEW PROPOSALS FOR MANAGEMENT

Abstract

Molecular technologies of PCR were applied on seawater fixed samples and molluscs to reveal the presence of some potentially toxic phytoplankton taxa in the Mediterranean Sea. PCR assays on field samples permitted a rapid identification of different genera and species of HAB microalgae. The molecular techniques are able to discriminate HAB target cells at lower detection limit for the traditional microscopy methods. Species-specific PCR assay for HABs applied on molluscs permitted to reveal the presence of toxic cells also in absence of toxicity determined by chemical and mouse bioassay analyses.

Key-words: *phytoplankton, HABs (Harmful Algal Blooms), molluscs, PCR, toxins.*

Introduzione

Per ridurre l'impatto delle fioriture di fitoplancton tossico sulla salute pubblica e sulle attività economiche, è necessario considerare un'adeguata strategia di monitoraggio che possa consentire di conoscere meglio il fenomeno e fornire nuovi e più efficaci strumenti per il controllo e la mitigazione di questi eventi. Il monitoraggio del fitoplancton tossico e delle relative tossine in molluschicoltura viene attualmente effettuato tramite analisi al microscopio dei taxa microalgali, saggi biologici e analisi chimiche con HPLC; queste procedure richiedono personale specializzato e lunghi tempi di procedure in laboratorio. Le moderne tecniche di biologia molecolare possono fornire un valido supporto al monitoraggio di fitoplancton HAB. I geni ribosomiali sono spesso utilizzati come regioni target per lo sviluppo di sonde molecolari specifiche, poiché tali geni sono altamente conservati e ripetuti in tandem ad alto numero di copie nel DNA genomico. In questo studio sono stati sviluppati metodi basati sull'analisi di PCR per la rilevazione di generi e specie fitoplanctoniche potenzialmente tossiche, più diffuse nel bacino del Mediterraneo, sia in campioni di acqua di mare concentrati e fissati con il colorante di Lugol, sia in molluschi (*Mytilus galloprovincialis*) prelevati da impianti di acquacoltura.

Materiali e metodi

Il DNA genomico totale di campioni di fitoplancton è stato estratto utilizzando DNeasy Plant Kit (Qiagen) e/o il metodo di Bertozzini *et al.* (2004). Il DNA genomico di mollusco è stato estratto da epatopancreas e branchie utilizzando il metodo di Galluzzi *et al.* (2005). Sono stati utilizzati primers genere specifici per *Alexandrium* spp. (Galluzzi *et al.*, 2004), *Dinophysis* spp. e *Pseudo-nitzschia* spp. (dati non pubblicati) e primers specie-specifici per *A. minutum* (Galluzzi *et al.*, 2005), *A. tamarense*, *A. catenella*, *L. polyedrum* (dati non pubblicati). I primers sono stati disegnati nelle regioni ribosomali 5.8S rDNA e ITS. La specificità dei primers è stata verificata *in silico* tramite BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) e sperimentalmente tramite amplificazione del DNA di diversi dinoflagellati e diatomee. Le reazioni di PCR sono state eseguite secondo i protocolli di Penna e Magnani (1999) e Galluzzi *et al.* (2005). L'identificazione delle microalghe è stata effettuata mediante l'uso della microscopia ottica e/o a epifluorescenza solo per i dinoflagellati tectati secondo il metodo di Fritz e Triemer (1985).

Risultati

Le reazioni di PCR applicate sul DNA genomico di campioni di fitoplancton e di molluschi (dati non riportati) contaminati da fitoplancton tossico sono risultate specifiche sia utilizzando i primers disegnati sulle sequenze consenso dei generi sia utilizzando i primers disegnati per le specie microalgali target (Tab. 1).

Tab. 1 - Risultati delle analisi di PCR per la rilevazione di cellule di fitoplancton potenzialmente tossico in campioni concentrati (retino 10 µm) di acqua di mare.

Results of PCR analysis for the detection of HAB target cells in concentrated (net mesh size 10 µm) seawater samples.

Località e data	Identificazione PCR genere-specifica	Identificazione PCR specie-specifica	Identificazione per microscopia (cellule totali)
Mar Adriatico, Croce, Marzo 2005	Positivo per <i>Alexandrium</i> spp.	Positivo per <i>L. polyedrum</i>	<i>L. polyedrum</i> (assente) <i>Alexandrium</i> spp. (85)
Mar Tirreno, Oristano, Agosto 2003	Positivo per <i>Dinophysis</i> spp. <i>Alexandrium</i> spp.	Positivo per <i>A. catenella</i>	<i>A. catenella</i> (assente) <i>Dinophysis</i> spp. (10)
Mar Catalano, Tarragona, Barcellona (Spagna), Giugno/Agosto 2004	Positivo per <i>Pseudo-nitzschia</i> spp. <i>Alexandrium</i> spp.	Positivo per <i>A. catenella</i>	<i>A. catenella</i> (4.557) <i>Pseudo-nitzschia</i> spp. (assente)
Mar Ionio, Mezzolungi, (Grecia), Aprile 2004	Positivo per <i>Alexandrium</i> spp.	Positivo per <i>A. minutum</i>	<i>A. minutum</i> (n. d.) ^a <i>Alexandrium</i> spp. (12)
Mar Tirreno, Oliveri, Marzo 2003	Positivo per <i>Alexandrium</i> spp.	Positivo per <i>A. tamarense</i>	<i>A. tamarense</i> (4.370) <i>Alexandrium</i> spp. (4.370)
Mar Ionio, Siracusa, Marzo 2003	Positivo per <i>Alexandrium</i> spp.	Positivo per <i>A. minutum</i>	<i>A. minutum</i> (n. d.) ^a <i>Alexandrium</i> spp. (n. d.) ^a

^a(n.d. = non determinato)

Conclusioni

I risultati hanno dimostrato che il DNA algale di generi e specie HAB può essere specificamente rilevato in campioni di acqua di mare e molluschi (dati non riportati). Il metodo molecolare è in grado di determinare la presenza di cellule di fitoplancton tossico anche a concentrazioni al limite della sensibilità per il metodo microscopico. Infatti, il metodo basato sulla PCR ha rilevato il 30% in più di positività rispetto all'analisi al microscopio. Inoltre, nei mitili è stato possibile rilevare la presenza di DNA genomico di cellule tossiche (*A. minutum* e *Dinophysis* spp.) anche in assenza di tossicità determinata tramite analisi chimiche (HPLC) e biologiche consentendo una strategia di pre-allarme per la presenza di specie potenzialmente tossiche nel sito di acquacoltura. Dal nostro studio si evince che i metodi molecolari possono essere integrati in campagne di monitoraggio assieme alle tecniche tradizionali. Inoltre, riteniamo che lo sviluppo di nuove tecniche molecolari potrà incrementare le potenzialità di screening delle comunità fitoplanctoniche tossiche negli ecosistemi marini costieri.

Bibliografia

- BERTOZZINI E., PENNA A., PIERBONI E., BRUCE I., MAGNANI M. (2005) - Development of new procedures for the isolation of phytoplankton DNA from fixed samples. *Appl. J. Phycol.*, **17**: 223-229.
- FRITZ L., TRIEMER R.E. (1985) - A rapid and simple technique utilizing calcofluor white MR2 for visualization of thecal plates. *J. Phycol.*, **21**: 662-664.
- GALLUZZI L., PENNA A., BERTOZZINI E., VILA M., GARCES E., GIACOBBE M.G., PRIOLI S., MAGNANI M. (2005) - Development of a qualitative PCR method for the *Alexandrium* (Dinophyceae) detection in contaminated mussels (*Mytilus galloprovincialis*). *Harmful Algae*, **4**: 673-695.
- PENNA A., MAGNANI M. (1999) - Identification of *Alexandrium* (Dinophyceae) species using PCR and rDNA-targeted probes. *J. Phycol.*, **35**: 615-621.

Ricerca svolta nell'ambito dei Progetti MiPA VI, Strategy EVK3-CT-2001-00046 con il supporto delle Politiche Agricole e Forestali (Pesca e Acquacoltura) e della Comunità Europea, Regione Emilia-Romagna e Regione Marche (CIPE 2003).