
9. Caratterizzazione della distribuzione di cisti di Dinoflagellate sul Dosso di S. Croce (*Golfo di Trieste, Alto Adriatico*)

Unità Operativa

Responsabile: prof. Guido BRESSAN

Collaboratrice: dott.ssa Elena TONZAR

Introduzione

Le Dinoflagellate sono organismi eucarioti, unicellulari, tra i componenti principali del fitoplancton sia marino, che di acqua dolce. Comprendono circa 2000 specie viventi classificate in 130 generi (Taylor, 1987), si trovano prevalentemente in acque costiere temperate e in condizioni di stabilità della colonna d'acqua. Le loro dimensioni variano da 10 μ m a 200 μ m.

Le Dinoflagellate possono sviluppare, in caso di condizioni avverse, una forma di resistenza detta *cisti* (Matsuoka *et al.*, 1989), che può rimanere vitale nel sedimento anche per lungo tempo (Jux, 1968).

In condizioni favorevoli, la cisti può rimanere vitale nel sedimento per 5-10 anni, ma anche più a lungo, fino alla comparsa dei fattori che ne indurranno la germinazione.

Obiettivi

Secondo Binder e Anderson (1987) la cisti può essere considerata come indicatore delle mutate condizioni ambientali, dell'andamento delle correnti e delle variazioni nel tasso di sedimentazione. Su questa base questa ricerca cerca di chiarire la correlazione tra la distribuzione delle cisti di Dinoflagellate ed i fattori abiotici e biotici, che si determinano in presenza di barriere artificiali, come quelle immerse in corrispondenza del Dosso di Santa Croce-Golfo di Trieste; infatti la circolazione delle masse d'acqua potrebbe essere alterata dalle modificate condizioni idrodinamiche dell'energia di fondo, che generano turbolenze o depositi di particellato.

Cenni metodologici

La campagna di campionamento si è svolta nei mesi di luglio e di dicembre 2005, in relazione al ciclo vitale delle Dinoflagellate. I siti di campionamento si identificano nelle piramidi del dosso di Santa Croce (Fig. 9.1).

Data: 26/07/2005

Stazione	Rilevamento GPS	Profondità	Temperatura (C°)	Corrente
D1	45°42.092' N 13°37.381' E	12,4	20	NO
D2	45°42.087' N 13°37.396' E	11,8	20	NO
D3	45°42.068' N 13°37.399' E	12,5	20	NO
D4	45°42.110' N 13°37.382' E	11,8	20	NO
D5	45°42.098' N 13°37.412' E	11,9	20	NO
D6	45°42.077' N 13°37.420' E	12,6	20	NO

Data: 22/12/2005

Stazione	Rilevamento GPS	Profondità	Temperatura (C°)	Corrente
D1	45°42.092' N 13°37.381' E	12,9	10	NO
D2	45°42.087' N 13°37.396' E	12,1	8	NO
D3	45°42.068' N 13°37.399' E	13,0	10	NO
D4	45°42.110' N 13°37.382' E	13,0	10	NO
D5	45°42.098' N 13°37.412' E	12,0	10	NO
D6	45°42.077' N 13°37.420' E	13,0	10	NO

Le tecniche di campionamento adottate per il prelievo di sedimento marino sono quelle del carotaggio con metodo diretto effettuato durante immersioni subacquee con autorespiratore (12 immersioni).

Nella presente ricerca vengono prese in considerazione le sezioni più superficiali delle carote, in quanto i primi strati del substrato sono maggiormente coinvolti nei fenomeni di risospensione e ridistribuzione dovuti alle correnti di fondo. Le carote utilizzate sono tubi di "plexiglass" siglati, aventi 4cm di diametro interno e 30cm di lunghezza. Le carote vengono infisse nel substrato mediante l'ausilio di una maz-zetta fino ad una profondità di circa 20-25cm (Fig. 9.2), chiuse da entrambe le estremità con un tappo in gomma, issate a bordo e poste in frigo in bagno d'acqua di mare. Vengono effettuate tre repliche del campionamento per ogni sito per avere la possibilità di scegliere tra le carote più compatte e meglio conservate durante il trasporto verso il laboratorio.

Il campione viene conservato in frigorifero alla temperatura di circa 4°C per impedirne il deterioramento. L'estrusione del campione dalla carota viene ottenuta mediante l'utilizzo di uno stantuffo manuale, che viene fatto scorrere dall'estremità inferiore del tubo a quella superiore; il campione viene tagliato con una spatola, in sezioni aventi lo spessore di 1cm. Le frazioni ottenute vengono inserite in contenitori di plastica nei quali viene aggiunta acqua di mare filtrata per mantenere il campione umido. Anche le frazioni dei campioni di sedimento vengono conservate al buio, ad una temperatura di circa 4°C in modo da non interferire con la vitalità delle cisti di Dinoflagellate (Anderson, 1980). Successivamente all'estrusione e alla conservazione i campioni vengono preparati per l'analisi microscopica qualitativa.

È stato realizzato un metodo per la preparazione di campioni di cisti di Dinoflagellati vitali aventi il minor contenuto possibile di sedimento. La presenza di sedimento infatti rende difficile sia l'individuazione sia la determinazione degli organismi. La procedura metodologica seguita può essere riassunta nei seguenti punti:

1. omogeneizzazione del campione mediante leggero scuotimento;
2. prelievo di un subcampione omogeneo di sedimento (1gr.) e diluizione con acqua di mare filtrata;
3. trattamento con ultrasuoni del subcampione, per un minuto, in modo da ottenere la disaggregazione delle cisti dal sedimento per consentire una più agevole osservazione. Il trattamento con ultrasuoni di per se stesso rappresenta potenzialmente un problema, in quanto non è conosciuto appieno l'effetto degli ultrasuoni e del calore da essi prodotto sulla fisiologia delle cisti (è ipotizzata la capacità degli ultrasuoni di accelerare il processo di excistamento – E. Erard, comunicaz. verb.). Questa tecnica è però la sola possibilità attualmente conosciuta per ottenere cisti prive di detriti;
4. filtrazione del subcampione su filtri di nylon con maglie decrescenti (100µm, 60µm, 40µm, 20µm), montati su una torre di filtrazione "Millipore". Per campioni con prevalente componente pelitica, la filtrazione viene facilitata collegando il sistema ad una pompa a vuoto ed applicando una depressione pari a 10mBar. I

setacci da 100 e 60 μ m vengono eliminati poiché relativi ad una frazione di sedimentazione di granulometria maggiore rispetto a quella delle cisti. La frazione ottenuta con filtri di maglia 40 μ m contiene la maggior parte delle specie di cisti; quella ottenuta con i filtri di maglia 20 μ m è caratterizzata dalla presenza di cisti appartenenti a specie di dimensioni inferiori (es. *Alexandrium* sp. e *Scrippsiella* sp.);

5. trattamento con ultrasuoni (per 2 minuti) dei filtri da 40 e 20 μ m, posti in un bicchiere contenente 10ml di acqua di mare filtrata e scuotimento con movimenti circolari in modo da creare un vortice per far disaggregare i componenti del sedimento e far concentrare la decantazione del materiale più pesante del campione (componenti sabbiose) al centro del contenitore e tenere in sospensione le cisti ed il materiale più leggero;

6. prelievo della sospensione che viene posta in una camera di sedimentazione e osservazione del campione con il microscopio ad ottica invertita (microscopio “Leica” modello DM IL).

Determinazione delle specie

La determinazione delle specie è un processo logico che implica l’individuazione della corrispondenza biunivoca tra la realtà oggettiva (l’individuo da osservare) e la realtà soggettiva (immagine astratta della specie come appare all’osservatore). Nei processi conoscitivi, logici, applicati al mondo della natura, l’analisi oggettiva è stata razionalizzata per pervenire a strumenti di indagine conoscitiva. Processi logici sono ad esempio, le chiavi di determinazione, che aiutano a stabilire un contatto tra le parti: quella oggettiva e quella soggettiva, separando così un individuo di una specie da un insieme più ampio. Costruire un modello per la determinazione significa ottimizzare l’osservazione oggettiva e ridurre quanto più possibile ogni interpretazione soggettiva (Bressan, 1986). Questo processo logico rappresenta il superamento di difficoltà tanto più gravi quanto maggiore è il numero dei caratteri determinanti come nel caso delle cisti (ad es.: *Lingulodinium polyedrum* (Stein) Dodge (Fig. 9.3).

Nel presente lavoro sono stati utilizzati dei processi logici per la determinazione, di seguito descritti, che hanno portato alla determinazione delle specie come esemplificato nel “decodificatore” originale appositamente realizzato in base alla chiave di determinazione ideata in lavori pregressi (Tonzar, 2005).

Chiave di determinazione

Organizzazione cellulare:

1A. FLAGELLATA 2.

Habitat:

2A. SPECIE MARINE 3.

2B. SPECIE DI ACQUA DOLCE 3.

Forma del corpo:

3A. SFERICA 4.

3B. GLOBIFORME IRREGOLARE 4.

3C. OVALE 4.

3D. POLIEDRICA 4.

3E. PIRIFORME 4.

3F. A GOCCIA 4.

Dimensioni del corpo (dati bibliografici):

4A. 20-45 μm 5.

4B. 46-55 μm 5.

4C. 56-65 μm 5.

4D. 66-75 μm 5.

4F. 76-90 μm 5.

Espansioni:

5A. PRESENZA DI SPINE 6.

5B. ASSENZA DI SPINE

Morfologia delle espansioni:

6A. SPINE CON TERMINAZIONE APPUNTITA DIRITTA 7.

6B. SPINE CON TERMINAZIONE APPUNTITA RICURVA 7.

6C. SPINE CON TERMINAZIONE A IMBUTO 7.

6D. SPINE CON TERMINAZIONE TRONCA 7.

6E. ORNAMENTAZIONE IRREGOLARE 7.

Dimensioni delle espansioni:

7A. 1-5 μm

7B. 6-15 μm

7C. 16-25 μm

Decodificatore

Codici							Genere e Specie
1A	2A	3A	4C	5B			<i>Alexandrium pseudogonyaulax</i>
1A	2A	3A	4A	5A	6B	7B	<i>Gonyaulax grindleyi</i>
1A	2A	3F	4B	5A	6C	7B	<i>Gonyaulax spinifera</i>
1A	2A	3A	4A	5A	6A	7B	<i>Lingulodinium polyedrum</i>
1A	2A	3C	4B	5A	6A	7C	<i>Protoperidinium conicum</i>
1A	2A	3A	4A	5B			<i>Scrippsiella trochoidea</i>
1A	2A	3C	4B	5A	6C	7C	<i>Spiniferites</i> sp.

Risultati

Caratteristiche dei sedimenti

È stata eseguita una valutazione macroscopica dei sedimenti mediante una stima della granulometria del sedimento, secondo Udden-Wentworth (U.S. Standard) (Tab.9.1). La valutazione macroscopica dei sedimenti ha condotto alla costituzione di raggruppamenti omogenei dei siti di campionamento:

- sedimento pelitico molto plastico, di colore grigio chiaro, omogeneo in tutta la carota (piramide D2);
- sedimento pelitico di colore scuro, omogeneo lungo tutta la carota (piramide D4);
- sedimento più grossolano al livello superiore della carota con presenza di mitili e conchiglie; sedimento più fine al livello inferiore della carota di colore grigio scuro (piramidi D1, D3, D5 e D6).

Elenco floristico

Sono stati determinati 7 taxa , di cui uno solo a livello di genere.

Genere e Specie	Riferimento bibliografico
<i>Alexandrium pseudogonyaulax</i> (Biecheler)	Montesor, 1993
<i>Gonyaulax grindleyi</i> Reinecke	Bolch & Hallegraeff, 1990; Blanco, 1989
<i>Gonyaulax spinifera</i> (Claparide & Lachman)	Bolch & Hallegraeff, 1990
<i>Lingulodinium polyedrum</i> (Stein) Dodge	Ruth, 1987
<i>Protoperidinium conicum</i> (Gran) Balech	Bolch & Hallegraeff, 1990; Ruth, 1987
<i>Scrippsiella trochoidea</i> (Stein) Loeblich III	Bolch & Hallegraeff, 1990; Montesor <i>et al.</i> , 1994
<i>Spiniferites</i> sp.	Blanco, 1989

I dati sono stati acquisiti su base qualitativa della distribuzione verticale di cisti nel sedimento e sono stati ordinati in tabelle (Tab. 9.2-9.3) di specie e di stazioni (dati di presenza/assenza) e sono stati elaborati in termini di statistica univariata. Nelle comparazioni sono stati utilizzati i valori percentuali per la normalizzazione dei dati.

È stato scelto di analizzare i dati prendendo come riferimento il mese di dicembre in quanto, trattandosi di uno studio sulle cisti di Dinoflagellate, è preferibile riferire le osservazioni al momento in cui il fenomeno dell'incistamento è al suo massimo di manifestazione.

Su questa base sono state ottenute delle classi di frequenza di presenza derivate dall'analisi empirica degli istogrammi (Fig. 9.4-9.5). Sono così state individuate quattro classi di frequenza:

- I presenza percentuale di individui maggiore del 25,00% (=cisti "dominanti");
- II presenza percentuale di individui tra il 24,99% e maggiore del 10,00% (=cisti "poco presenti");
- III presenza percentuale di individui tra il 9,99% e maggiore 0,00% (=cisti ± "rare");
- IV "assenza" di cisti (presenza percentuale di individui uguale a 0,00%).

Il trattamento dei campioni ha portato all'analisi di 3 frazioni ciascuna di un centimetro di spessore per ogni carota:

- frazione 0,0-1,0cm;
- frazione 1,0-2,0cm;
- frazione 2,0-3,0cm;

I dati sono stati acquisiti tenendo anche conto del parametro (Tab. 9.4-9.5):

"vitalità" (presenza di "eye spot" e/o presenza del contenuto cellulare);

"non vitalità" (assenza di "eye spot" o rottura della teca).

Analisi della variazione floristica (luglio)

È stata analizzata la percentuale di presenza delle cisti di Dinoflagellate rilevate nei sedimenti delle diverse stazioni nel mese di luglio:

- classe I (cisti molto frequenti o persino "dominanti"): *Lingulodinium polyedrum* (4) con una frequenza di presenza del 53,30%;
- classe II (cisti "poco presenti"): *Alexandrium pseudogonyaulax* (1) con una frequenza di presenza del 20,00% e *Spiniferites* sp. (7) con una frequenza di presenza del 13,30%;
- classe III (cisti ± "rare"): *Gonyaulax spinifera* (3) e *Scrippsiella trochoidea* (6) con una frequenza di presenza del 6,67%;
- classe IV (cisti "assenti" rispetto a dicembre) appartengono: *Gonyaulax grindleyi* (2) e *Protoperidinium conicum* (5) con una frequenza di presenza di 0,00%.

Analisi della variazione floristica (dicembre)

È stata analizzata la percentuale di presenza delle specie di cisti di Dinoflagellate rilevate nei sedimenti delle diverse stazioni nel mese di dicembre:

- classe I (cisti molto frequenti o persino "dominanti"): *Lingulodinium polyedrum* (4) con una frequenza di presenza del 31,00%;

- classe II (cisti “poco presenti”): *Alexandrium pseudogonyaulax* (1) con una frequenza di presenza del 20,70%, *Spiniferites* sp. (7) con una frequenza di presenza del 13,80%, *Gonyaulax grindleyi* (2) e *Gonyaulax spinifera* (3) con una frequenza di presenza del 10,30%;
- classe III (cisti ± “rare”): *Protoperidinium conicum* (5) e *Scrippsiella trochoidea* (6) con una frequenza di presenza del 6,90%;
- classe IV (cisti “assenti”): nessuna specie.

Analisi della variazione floristica (luglio-dicembre)

È stato analizzato il confronto nella percentuale di presenza delle specie di cisti di Dinoflagellate rilevate nei sedimenti delle diverse stazioni nei mesi di luglio e di dicembre (Fig. 9.6).

Dall’analisi dell’istogramma è stata evidenziata una differenza di distribuzione delle specie, nei due diversi campionamenti. Si possono così identificare tre tendenze:

specie per le quali a giugno si evidenzia un valore di presenza percentuale maggiore rispetto al mese di novembre: *Lingulodinium polyedrum* (4);

specie per le quali a dicembre si evidenzia un valore di presenza percentuale maggiore rispetto al mese di luglio: *Gonyaulax spinifera* (3), *Gonyaulax grindleyi* (2) e *Protoperidinium conicum* (5);

specie per le quali si evidenzia un valore di presenza percentuale uguale nelle due stagioni: *Alexandrium pseudogonyaulax* (1), *Spiniferites* sp. (7) e *Scrippsiella trochoidea* (6).

Confronto dell’analisi della variazione floristica nelle frazioni (luglio)

È stata analizzata la presenza percentuale di cisti di Dinoflagellate rilevate nei sedimenti delle diverse frazioni (0,0-1,0cm, 1,0-2,0cm e 2,0-3,0cm), delle 6 stazioni, del mese di luglio (Fig. 9.7):

D1 mostra una distribuzione maggiore di cisti nelle frazioni 1,0-2,0cm e 2,0-3,0cm;

D3, D4 e D6 mostrano una distribuzione maggiore di cisti nella frazione 1,0-2,0cm;

D2 e D5 mostrano una distribuzione maggiore di cisti nella frazione 0,0-1,0cm.

Confronto dell’analisi della variazione floristica nelle frazioni (dicembre)

È stata analizzata la presenza percentuale di cisti di Dinoflagellate rilevate nei sedimenti delle diverse frazioni (0,0-1,0cm, 1,0-2,0cm e 2,0-3,0cm), delle 6 stazioni, del mese di dicembre (Fig. 9.8): in tutte le stazioni è stata evidenziata una maggiore distribuzione delle cisti nelle frazioni 0,0-1,0cm e 1,0-2,0cm con graduale diminuzione nella frazione successiva. Solo nella stazione D1 si evidenzia una distribuzione simile in tutte tre frazioni.

Distribuzione delle cisti di Dinoflagellate nelle diverse stazioni (luglio-dicembre)

È stato analizzato il confronto nella percentuale di presenza di cisti di Dinoflagellate rilevate nei sedimenti delle diverse stazioni nei mesi di luglio e di dicembre (Fig. 9.9).

L'analisi dell'istogramma ha evidenziato la maggiore presenza di cisti nelle stazioni D1, D2 e D6. Nella stazione D6 è stata rilevata la maggiore concentrazione di cisti, sia nel mese di luglio, che nel mese di dicembre.

Conclusioni

Dall'analisi della distribuzione delle cisti nei due mesi oggetto di studio nelle 6 stazioni di campionamento, relativamente alle specie presenti, è stato evidenziato:

- *Lingulodinium polyedrum* (4), è specie ubiquitaria avente distribuzione percentuale maggiore sia nel mese di luglio che nel mese di dicembre;
- le specie *Alexandrium pseudogonyaulax* (1), *Spiniferites* sp. (7), *Gonyaulax grindleyi* (2), *Gonyaulax spinifera* (3), *Protoperidinium conicum* (5) e *Scrippsiella trochoidea* (6) sono specie aventi distribuzione percentuale maggiore nel mese di dicembre.

Relativamente alle stazioni:

le stazioni D6 e D1 sono state evidenziate come stazioni, che hanno la maggiore presenza percentuale di cisti, senza significative differenze legate alla stagionalità; la stazione D2 è risultata essere la stazione che ha una maggiore distribuzione di cisti a luglio rispetto a dicembre;

le stazioni D3, D4 e D5 sono risultate essere le stazioni che hanno una maggiore distribuzione di cisti a dicembre rispetto a luglio.

Relativamente alle frazioni:

nel mese di dicembre è stata evidenziata una maggiore distribuzione percentuale di cisti nelle frazioni 0,0-1,0cm e 1,0-2,0cm;

nel mese di luglio è stata evidenziata una diminuzione della distribuzione percentuale di cisti nella frazione 0,1-1,0cm;

relativamente alla frazione 2,0-3,0cm, la distribuzione percentuale di cisti è risultata molto scarsa in entrambi in mesi di campionamento.

Per quanto concerne la differenza di presenza di cisti nei due mesi oggetto di studio, si può ipotizzare un esaurimento dopo il mese di luglio. Questa ipotesi è stata proposta in relazione alla differente distribuzione di cisti tra il mese di luglio e quello di dicembre.

Per le stazioni in oggetto c'è una distribuzione degradante di cisti nelle frazioni sottostanti. Questa osservazione, basata sulle osservazioni preliminari di cui sopra, potrebbe essere in accordo con l'ipotesi di una scarsa risospensione dovuta alla presenza delle barriere artificiali, che potrebbero alterare le condizioni idrodinamiche dell'energia di fondo.

I risultati ottenuti preliminarmente devono essere soppesati in relazione al monitoraggio della presenza di specie potenzialmente tossiche per la salute umana (come ad es. *Gonyaulax grindleyi* Reinecke che è un organismo produttore di tossine che inducono nell'uomo la sindrome DSP), che possono danneggiare le risorse ittiche come anche alterare la componente bentonica originaria.

In relazione all'analisi dei risultati fin qui ottenuti, è in corso d'opera una valutazione di impatto ambientale dal momento che è da ritenere necessario un monitoraggio continuo del sito. Sarà pertanto opportuno proseguire la presente ricerca anche ampliando a raggiera l'area d'indagine.

Bibliografia

- ANDERSON, D.M. - 1980 - Effects of temperature conditioning on development and germination of *Gonyaulax tamarensis* (Dinophyceae) hypnozygotes. *J. Phycol.*, 16: 166-172.
- BINDER, B.J. & ANDERSON, D.M. - 1987 - Physiological and environmental control of germination in *Scrippsiella trochoidea* (Dinophyceae) resting cysts. *J. Phycol.*, 23: 99-107.
- BLANCO, J. - 1989 - Quistes de Dinoflagelados de las costas de Galicia. I. Dinoflagelados gonyaulacoides. *Scien., Mar.*, 53 (4): 785-796.
- BOLCH, C. J. & HALLEGRAEFF, G.M. - 1990 - Dinoflagellate Cysts in Recent Marine Sediments from Tasmania, Australia. *Botanica Marina*, 33: 173-192.
- BRESSAN, G. - 1986 - Un metodo diacritico per la determinazione: il glossario - Atlante. *Estratto dagli Atti del Museo Civico di Storia Naturale - Trieste*. Vol. XXXIX - Fasc. 2.
- JUX, U. - 1968a - Uber den Feinbau der Wand und bei Cordosphaeridium inodes (KLUMPP, 1953). *Palaentographica, Ser. B.*, 122: 48-54, pls. 13-14.
- MATSUOKA, K., FUKUYO, Y. & ANDERSON, D.M. - 1989a - Methods for modern dinoflagellate cyst studies: 461-480. In: OKAICHI, T., ANDERSON, D.M. & NEMOTO, T. (eds), *Red Tides: Biology, Environmental Science and Toxicology*, Elsevier, New York.
- MONTRESOR, M., MONTESARCHIO, E., MARINO, D. & ZINGONE, A. - 1994 - Calcareous dinoflagellate cysts in marine sediments of the Gulf of Naples (Mediterranean Sea). *Review of Palaeobotany and Palynology*, 84: 45-56.
- MONTRESOR, M., ZINGONE, A. & MARINO, D. - 1993 - The paratabulate resting cysts of *Alexandrium pseudogonyaulax* (Dinophyceae). In: SMAYDA T.J. & SHIMIZU, Y. (eds.) *Toxic Phytoplankton Blooms in the Sea*: 159-164.
- RUTH BALDWIN, P. - 1987 - Dinoflagellate resting cysts isolated from sediments in Marlborough Sounds, New Zealand. *New Zealand J. of Marine and Freshwater Research*, 21: 543-553.
- TAYLOR, F.J.R. - 1987 - Dinoflagellate morphology. In *The Biology of Dinoflagellates*, ed. F.J.R. TAYLOR, 24-91. Blackwell Scientific Publications, Oxford.
- TONZAR E. - 2005 - Osservazioni preliminari sulla distribuzione di cisti di Dinoflagellate nel Golfo di Trieste (Alto Adriatico). *Informatore Botanico Italiano*, vol. 37 - Numero 1, parte B. Gennaio- Giugno 2005: 606-607.