



**UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE**  
**DIPARTIMENTO SCIENZE DELLA VITA E**  
**DELL'AMBIENTE**

**Corso di Laurea Magistrale**

**Biologia Marina**

**Effetto dei copepodi su crescita e tossicità di *Pseudo-nitzschia multistriata***

**Copepods' influence on growth and toxicity of *Pseudo-nitzschia multistriata***

Tesi di Laurea Magistrale  
di  
Giulia Bellanti

Relatore Chiar.mo  
Prof. Stefano Accoroni

Correlatore:  
Prof. Cecilia Maria Totti

**Sessione estiva - luglio 2022**

**Anno Accademico 2021/2022**

## INDICE

Capitolo primo .....	4
PREFAZIONE.....	4
Capitolo secondo .....	6
INTRODUZIONE .....	6
2.1 Bacillariophyceae .....	6
2.2 Il genere <i>Pseudo-nitzschia</i> .....	12
2.3 <i>Pseudo-nitzschia</i> nel Mare Adriatico.....	16
2.3 <i>Pseudo-nitzschia multistriata</i> .....	16
2.3 Acido domoico .....	18
Capitolo terzo .....	23
MATERIALI E METODI .....	23
3.1 Valutazione preliminare dell'influenza dei copepodi sulla crescita di <i>Pseudo-nitzschia multistriata</i> : introduzione.....	23
3.2 Valutazione preliminare dell'influenza dei copepodi sulla crescita di <i>Pseudo-nitzschia multistriata</i> : coltura dei copepodi.....	24
3.3 Valutazione preliminare dell'influenza dei copepodi sulla crescita di <i>Pseudo-nitzschia multistriata</i> : terreni di coltura per <i>Pseudo-nitzschia multistriata</i> .....	26
3.4 Valutazione preliminare dell'influenza dei copepodi sulla crescita di <i>Pseudo-nitzschia multistriata</i> : monitoraggio delle colture.....	28
3.5 Valutazione degli effetti dei copepodi mantenuti in condizioni di stress (starving) su crescita e tossicità di <i>Pseudo-nitzschia multistriata</i> .....	28
3.6 Analisi statistiche.....	30
Capitolo Quarto .....	32
RISULTATI.....	32
4.1 Identificazione dei copepodi.....	32
4.2 Crescita di <i>Pseudo-nitzschia multistriata</i> : esperimento di valutazione preliminare dell'influenza dei copepodi .....	33
4.3 Crescita e tossicità di <i>Pseudo-nitzschia multistriata</i> : valutazione degli effetti dei copepodi mantenuti in condizioni di stress (starving).....	40
Capitolo Quinto .....	42
DISCUSSIONE .....	42
Capitolo Sesto.....	50
CONCLUSIONI.....	50

Bibliografia..... 52

## Capitolo primo

### PREFAZIONE

Le diatomee del genere *Pseudo-nitzschia* sono una componente comune del fitoplancton marino e sono regolarmente presenti in tutti gli oceani. Grazie alla sua capacità di produrre la neurotossina acido domoico (DA), *Pseudo-nitzschia* ha ottenuto una considerevole attenzione da parte della comunità scientifica. La presenza di zooplancton potrebbe essere uno dei fattori che influenzano la tossicità delle fioriture di *Pseudo-nitzschia* in natura (Tammilehto et al., 2015).

L'obiettivo principale di questa tesi è quindi quello di indagare le condizioni in cui la presenza di zooplancton altera la crescita della specie *Pseudo-nitzschia multistriata* (Takano) Takano, 1995, e potenzialmente ne stimola la produzione della neurotossina, lungo la costa Adriatica nord-occidentale.

La prima fase del lavoro è durata un mese ed è stata svolta con il fine di identificare la condizione di crescita maggiormente stressante per il ceppo algale scelto. Inoculi di *Pseudo-nitzschia multistriata* sono stati fatti crescere in tre diversi terreni, tre repliche ciascuno, contenenti segnali rilasciati da specie miste di copepodi (per lo più onnivore con preferenza per una dieta erbivora) messi a confronto con tre repliche di controllo. Ogni trattamento è stato ricavato da un filtrato di acqua marina nella quale i copepodi sono stati

tenuti in vita per 72h in diverse condizioni di nutrizione. La seconda fase del lavoro è durata due settimane ed è stata svolta con il fine di analizzare la produzione di acido domoico dal ceppo algale scelto. Inoculi di *Pseudo-nitzschia multistriata* sono stati fatti crescere in tre repliche, in grandi volumi (in modo da ottenere quantità di biomassa sufficiente per le analisi delle tossine), di un unico trattamento corrispondente alla condizione di maggiore stress evidenziata durante la fase preliminare.

Al termine delle due settimane previste per l'esperimento, i campioni sono stati inviati all'Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche "Togo Rosati" che ha provveduto ad effettuare le analisi di concentrazione della biotossina mediante analisi in LC-MS/MS (Cromatografia liquida con spettrometro di massa).

Questo lavoro di tesi ha permesso di evidenziare che la percezione indiretta della presenza di copepodi influisce profondamente sulla crescita delle cellule appartenenti alla specie *Pseudo-nitzschia multistriata*, confermando i dati presenti in letteratura circa altre specie appartenenti al genere; tuttavia, sebbene le condizioni fossero potenzialmente ottimali per la produzione di acido domoico, la presenza di biotossina non è stata rilevata nel ceppo analizzato.

## Capitolo secondo

### INTRODUZIONE

#### *2.1 Bacillariophyceae*

Le microalghe appartenenti alla classe Bacillariophyceae vengono comunemente chiamate diatomee. Si tratta di organismi unicellulari, spesso coloniali, con dimensioni variabili da 2  $\mu\text{m}$  a 2 mm, in grado di colonizzare ambienti marini e dulciacquicoli, come anche ambienti terrestri umidi. Le diatomee rappresentano la componente più importante del fitoplancton e del microfitobenthos, se ne conoscono oltre 250 generi, con circa 200,000 specie descritte e circa  $10^6$  specie totali stimate.

La classificazione informale delle diatomee è basata su raggruppamenti morfologici:

- Diatomee centriche, cellule a simmetria radiale;
- Diatomee pennate, cellule a simmetria bilaterale, a loro volta suddivise in arafidee e rafidee.

La classificazione moderna prevede invece la suddivisione in due cladi (Fig. 1):

- Clade 1, diatomee centriche a simmetria radiale;

- Clade 2, diatomee centriche polari, diatomee pennate rafidee e diatomee pennate arafidee.

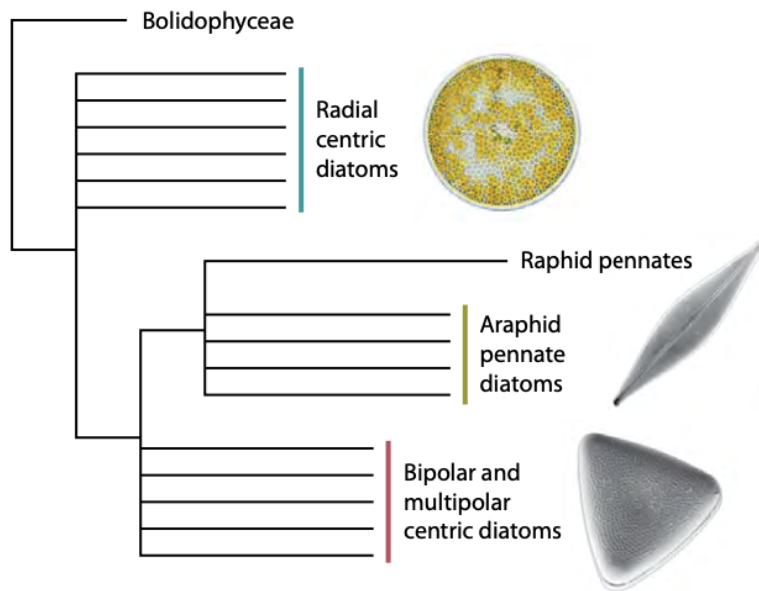


Fig. 1 Rappresentazione delle relazioni filogenetiche nel gruppo delle diatomee, sono visibili diverse ramificazioni non ancora risolte. Da Graham et al. (2016).

Le diatomee presentano diversi caratteri morfologici distintivi come la presenza del frustulo siliceo, l'assenza di flagelli, la presenza di plastidi con 4 membrane e tilacoidi impilati a gruppi di 3. I pigmenti predominanti in questo gruppo sono la clorofilla *a*, le clorofille *c1* e *c2*, la fucoxantina, la diadinoxantina ed il  $\beta$ -carotene. Le diatomee, inoltre, accumulano tipicamente, come sostanza di riserva, la crisolaminarina ( $\beta$ -1,3 glucano). Il vacuolo, che rappresenta tra il 35% ed il 61% dell'intero volume cellulare, svolge importanti

funzioni come l'accumulo dei nutrienti, e determina la capacità di galleggiamento. Il ciclo vitale è di tipo diplonte (Fig. 3).

Il frustulo è formato da silicati amorfi  $(\text{SiO}_2)_n(\text{H}_2\text{O})$  ed è composto da due porzioni: un'epiteca superiore ed esterna che avvolge e si sovrappone parzialmente ad un'ipoteca inferiore interna, leggermente più piccola. Le due teche sono formate da una valva, più o meno piatta, denominata epivalva, per l'epiteca, o ipoalva, per l'ipoteca; ogni valva è bordata da una banda silicea che forma, rispettivamente, epicingolo ed ipocingolo; la sovrapposizione di queste componenti costituisce il cingolo del frustulo. La sutura è la linea di congiunzione tra le due valve. Ogni valva è inoltre suddivisa in faccia e mantello valvare. Nella Fig. 2 vengono rappresentati i principali caratteri morfologici:

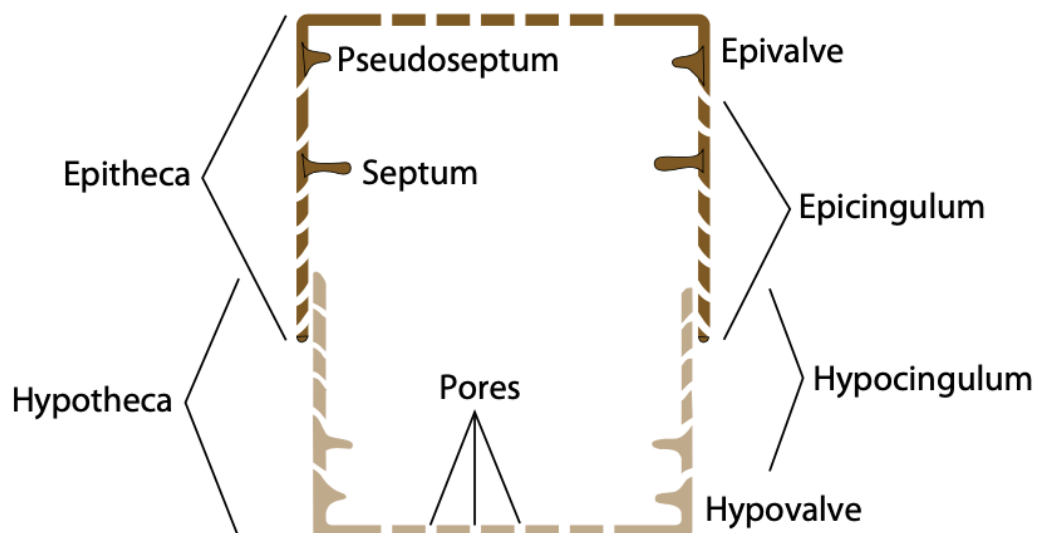


Fig. 2 Rappresentazione schematica del frustulo di una diatomea che mostra i principali caratteri in sezione. Da Graham et al. (2016).



La silice formante il frustulo viene deposta con pattern regolari che determinano svariate ornamentazioni specie-specifiche. L'ultrastruttura può essere caratterizzata dalla presenza di perforazioni che sono distinte in pori semplici e areole, ossia camere separate da setti verticali e coperte da una membrana unilaterale. L'aerolazione può avere disposizione radiale o tangenziale. La disposizione dei pori può portare alla formazione di strie, definite come una o più file di pori, e interstrie, definite come porzioni prive di perforazioni presenti tra due strie; a seconda dell'organizzazione dei pori si possono distinguere strie uniseriate, biseriate e multiseriate. L'ultrastruttura comprende anche la presenza di processi, ossia, proiezioni con silicizzazione omogenea della parete, che si dividono in: processi labiati o rimoportulae, processi strutturati o fultoportulae e spine.

Una modificazione dei processi labiati ha portato all'evoluzione del rafe, un solco più o meno complesso presente esclusivamente nelle diatomee pennate birafidee (su entrambe le valve) e monorafidee (su una sola valva). La dimensione, la posizione e la struttura del rafe costituiscono importanti caratteri tassonomici.

Le diatomee proliferano per riproduzione agamica semiconservativa, in cui la cellula parentale si divide mitoticamente. Ogni cellula figlia eredita un'emiteca e ne produce una nuova, internamente, che andrà a costituire l'ipoteca; come

conseguenza di questo processo riproduttivo, si andranno a sviluppare due diverse generazioni: una che mantiene sempre le stesse dimensioni e una che va incontro a una progressiva riduzione di taglia. Al raggiungimento della taglia critica (ca. 1/3 della taglia di partenza) le dimensioni originarie vengono ripristinate tramite auxosporulazione, che avviene prevalentemente attraverso la riproduzione sessuale. La Fig. 3 mostra una schematizzazione del ciclo vitale delle diatomee pennate.

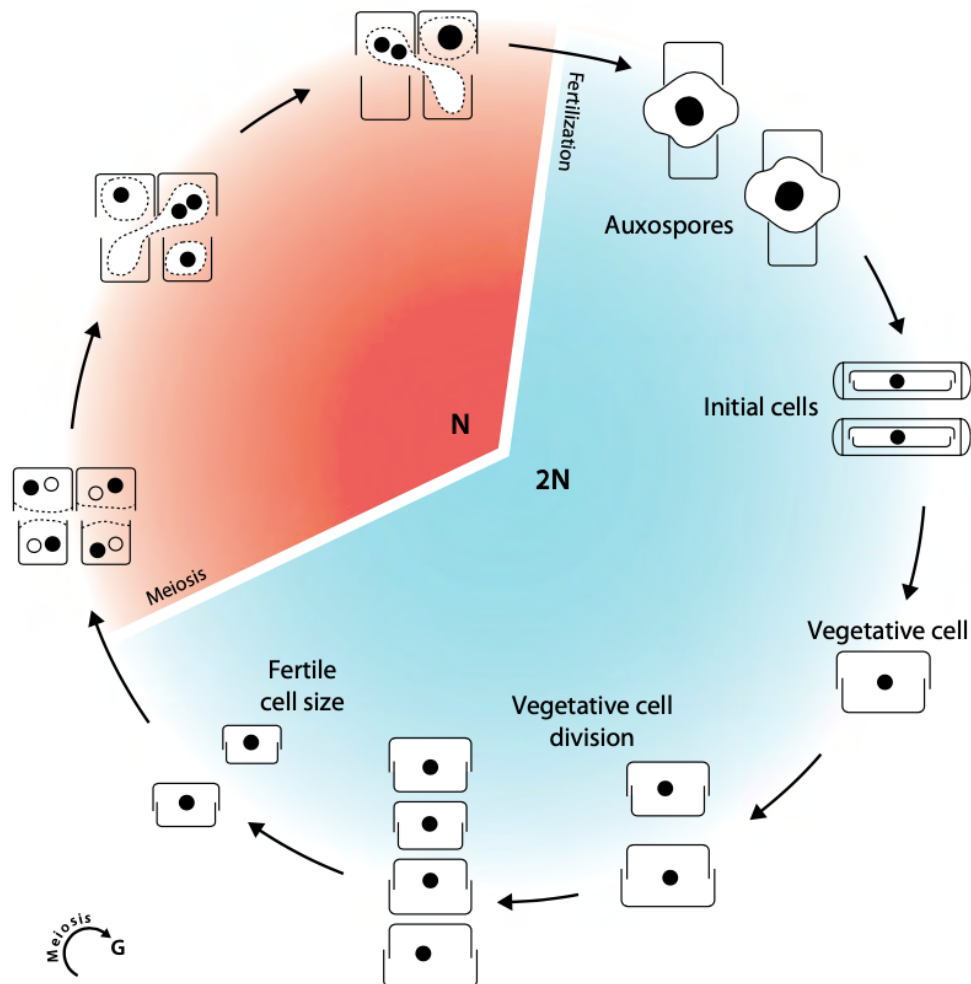


Fig. 3 Ciclo vitale tipico delle diatomee pennate (Da Graham et al., 2016).

Un altro carattere distintivo del gruppo delle diatomee è la capacità di formare colonie, separabili o inseparabili, tramite diverse tipologie di attacco:

- Denti marginali o denti terminali;
- Spine e setole;
- Filamenti chitinosi;
- Tubi silicei;
- Dischi mucosi che possono essere prodotti sull'intera faccia valvare o solo su una parte di essa.

Le diatomee sono abbondanti a elevate latitudini dove producono fioriture estive, e in acque temperate dove producono fioriture prevalentemente in inverno-primavera e autunno. Per la crescita necessitano soprattutto di silice e di composti azotati ad alte concentrazioni.

Le diatomee vengono predate dagli organismi erbivori e, in particolare, rappresentano l'alimento preferenziale di diverse specie di copepodi, per questo motivo sono caratterizzate da difese anti-grazing come la produzione di metaboliti tossici:

- Aldeidi polinsature, con effetti teratogeni sui copepodi;
- Acido domoico, biotossina prodotta solo da alcune specie.

## 2.2 Il genere *Pseudo-nitzschia*

*Pseudo-nitzschia* H. Peragallo 1899 è uno dei generi di diatomee più comune nel fitoplancton. È presente nelle aree polari, temperate, subtropicali e tropicali di tutto il mondo (Lundholm et al., 2002). Si tratta di un genere appartenente all'ordine Bacillariales e famiglia Bacillariaceae. Il genere *Pseudo-nitzschia* comprende 57 specie descritte (*AlgaeBase*), tra cui 28 confermate come tossiche (Lundholm et al., 2022). Nonostante l'interesse destato da questo genere, la determinazione al livello di specie rimane complessa, dato che l'esistenza di specie criptiche e pseudo-criptiche rende inadeguata l'identificazione basata esclusivamente su caratteri morfologici (Arapov et al., 2020a).

Le microalghe del genere *Pseudo-nitzschia* sono diatomee pennate rafidee a simmetria bilaterale. La taglia può variare tra 2 e 8 µm di asse transapicale e tra 40 e 175 µm di asse apicale; la forma è allungata e fusiforme in vista valvare, con il rafe in posizione eccentrica, mentre può essere rettangolare in vista cingolare. *Pseudo-nitzschia*, in natura, forma tipicamente colonie del tipo “stepped chains”, ossia lunghe *catene* composte da numerose cellule (anche più di 20) mediante sovrapposizione parziale della parte apicale grazie a dischi di muco.

La filogenesi di *Pseudo-nitzschia* è stata studiata facendo uso di diversi marker molecolari: nucleari ribosomali (LSU, SSU and ITS1-5.8s-ITS2), plastidiali (rbcL and rbcS) e mitocondriali (coxI) (Giulietti, 2021). Tradizionalmente il genere è stato suddiviso in due gruppi sulla base della larghezza della valva (asse transapicale, TA):

- TA > 3 μm (*seriata* group), che include ad esempio *Pseudo-nitzschia fraudulenta*, *P. subfraudulenta* e *P. pungens*;
- TA < 3 μm (*delicatissima* group); quest'ultimo includeva, inizialmente, le specie *Pseudo-nitzschia delicatissima* e *P. pseudodelicatissima* che sono invece attualmente classificate come due diversi complessi che includono ciascuno un elevato numero di specie criptiche e pseudo-criptiche (Giulietti et al., 2021) riportate nella Fig. 4.

<b><i>delicatissima</i> complex</b>	<b>References</b>
<i>P. sabit</i>	Teng et al. (2015)
<i>P. dolorosa</i>	Lundholm et al. (2006)
<i>P. arenysensis</i>	Quijano-Scheggia et al. (2009)
<i>P. delicatissima</i>	Heiden and Kolbe (1928)
<i>P. decipiens</i>	Lundholm et al. (2006)
<i>P. galaxiae</i>	Lundholm and Moestrup (2002)
<i>P. bucculenta</i>	Gai et al. (2018)
<i>P. hallegraeffii</i>	Ajani et al. (2018)
<i>P. micropora</i>	Priisholm et al. (2002)
<i>P. multistriata</i>	Takano (1995)
<i>P. hainanensis</i>	Chen et al. (2020)
<i>P. allochirona</i>	Percopo et al., in prep.
<b><i>pseudodelicatissima</i> complex</b>	
<i>P. inflatula</i>	Hasle (1993)
<i>P. abrensis</i>	Orive et al. (2013)
<i>P. kodamae</i>	Teng et al. (2014)
<i>P. limii</i>	Teng et al. (2016)
<i>P. lineola</i>	Hasle (1993)
<i>P. roundii</i>	Hernandez-Becerril and Diaz-Almeyda (2006)
<i>P. sinica</i>	Qi et al. (1994)

<i>P. granii</i>	Hasle (1993)
<i>P. cuspidata</i>	Hasle (1993)
<i>P. subcurvata</i>	Hasle (1993)
<i>P. pseudodelicatissima</i>	Hasle (1993)
<i>P. caciantha</i>	Lundholm et al. (2003)
<i>P. calliantha</i>	Lundholm et al. (2003)
<i>P. mannii</i>	Amato and Montresor (2008)
<i>P. batesiana</i>	Lim et al. (2013)
<i>P. lundholmiae</i>	Lim et al. (2013)
<i>P. fukuyoi</i>	Lim et al. (2013)
<i>P. hasleana</i>	Lundholm et al. (2012)
<i>P. fryxelliana</i>	Lundholm et al. (2012)
<i>P. circumspora</i>	Lim et al. (2012)
<i>P. arctica</i>	Percopo et al. (2016)
<i>P. plurisecta</i>	Orive et al. (2013)
<i>P. simulans</i>	Li et al. (2017)
<i>P. qiana</i>	Huang et al. (2019)
<i>P. taiwanensis</i>	Chen et al. (2020)

Fig. 4 Lista delle specie appartenenti ai *delicatissima* e *pseudodelicatissima* complexes (da Giulietti, 2021).

*Pseudo-nitzschia* colonizza acque ricche di nutrienti e zone caratterizzate da intensa radiazione, queste diatomee sono in grado di tollerare ampi range di temperatura e salinità (Arapov et al., 2017). Alcuni studi hanno evidenziato come le abbondanze di alcune specie siano fortemente influenzate dalla

temperatura; mentre altre specie sono fortemente influenzate dalla salinità (Thessen et al., 2005; Arapov et al., 2020b).

### **2.3 Pseudo-nitzschia nel Mare Adriatico**

Nell'Adriatico sono state attualmente riportate 11 specie, tra cui 7 potenzialmente tossiche: *P. calliantha*, *P. decipiens*, *P. delicatissima*, *P. fraudulenta*, *P. galaxiae*, *P. heimii*, *P. manni*, *P. multistriata*, *P. pseudodelicatissima*, *P. pungens*, *P. subfraudulenta*. (Ljubešić et al., 2011; Arapov et al., 2017; Turk Dermastia et al., 2020).

Il genere *Pseudo-nitzschia* è presente nelle acque dell'Adriatico durante tutto l'anno (Arapov et al., 2020a,b,c; Turk Dermastia et al., 2020); tuttavia, le diverse specie vengono registrate con massimi di abbondanza in diversi periodi: *P. delicatissima* e *P. pseudodelicatissima* sono maggiormente abbondanti in estate e primavera rispettivamente, i generi *P. fraudulenta* e *P. galaxiae* sono maggiormente abbondanti in inverno, il genere *P. multistriata* è maggiormente abbondante in autunno (Giulietti et al., 2021).

### **2.3 Pseudo-nitzschia multistriata**

*Pseudo-nitzschia multistriata*, in vista valvare risulta lanceolata, lineare nella parte mediana con estremità arrotondate. In vista cingolare la forma è leggermente sigmoidale. L'asse apicale tipicamente misura tra i 34 e 60  $\mu\text{m}$ ,



mentre l'asse transapicale misura tra 2.2 e 4.0  $\mu\text{m}$  (Turk Dermastia et al., 2020). Il nodulo centrale è assente. I frustuli sono debolmente silicizzati, con larghe strie e strette interstrie. Le strie sono composte principalmente di due (occasionalmente uno o tre) file di piccoli pori. Le estremità opposte della stessa valva possono differire in termini di ultrastruttura (Arapov et al., 2020a). La densità di fibule e strie in 10  $\mu\text{m}$  varia tra 36-46 e 22-28, rispettivamente (Turk Dermastia et al., 2020). I parametri morfometrici sono sintetizzati nella Fig. 5.

Species	Apical axis ( $\mu\text{m}$ )	Transapical axis ( $\mu\text{m}$ )	CIS	Fibulae in 10 $\mu\text{m}$	Rows of poroids per stria	Poroids in 1 $\mu\text{m}$	Poroids in 1 $\mu\text{m}$	Poroid sectors
<i>P. multistriata</i>	<b>30-60</b> 50.15 $\pm$ 7.48 (45, 4)	<b>2.4-4.6</b> 3.35 $\pm$ 0.51 (45, 4)	-	<b>24-28</b> 25.3 $\pm$ 1.2 (29, 4)	<b>34-45</b> 38.7 $\pm$ 2.3 (29, 4)	<b>2</b>	<b>7-13</b> 10.7 $\pm$ 1.17 (29, 4)	not segmented

Fig. 5 Parametri morfometrici di ceppi di *Pseudo-nitzschia multistriata* isolati nel Golfo di Trieste. CIS = Central Interspace. Da Turk Dermastia et al. (2020).

In media in Adriatico le maggiori abbondanze si riscontrano tra settembre e gennaio, con picco massimo a ottobre, mentre in primavera ed estate, la specie, si osserva raramente; inoltre, è stata riportata una correlazione positiva per il parametro ambientale di salinità (Giulietti et al., 2021).

Questa specie viene riportata come tossica in diverse aree del mondo, con produzione di acido domoico anche in condizioni controllate con concentrazioni da 0.0001 a 0.282  $\text{pg cell}^{-1}$  (Amato et al., 2010; Tenorio et al., 2021).

### 2.3 Acido domoico

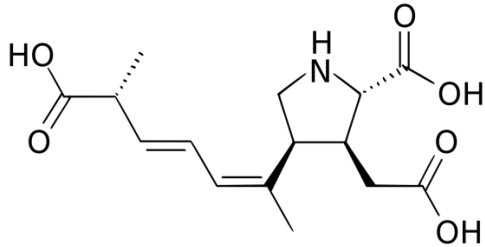


Fig. 6 struttura chimica dell'Acido domoico.

L'acido domoico ( $C_{15}H_{21}NO_6$ ) è un aminoacido idrosolubile, di cui si conoscono diversi isomeri come l'acido epi-domoico e l'acido isodomoico. Si tratta di una neurotossina, responsabile di una biointossicazione nota come Amnesic Shellfish Poisoning (ASP).

L'acido domoico è stato ritrovato in diversi organismi marini, zooplancton, molluschi bivalvi (che rappresentano i principali vettori per l'uomo), crostacei, echinodermi, vermi, mammiferi marini e uccelli marini; può causare gravi intossicazioni nell'uomo e può avere un impatto negativo sulla vita marina (Ephane et al., 2014; Mos, 2001). Sono stati ad esempio riportati casi di intossicazione di sardine, nutritesi di specie tossiche di *Pseudo-nitzschia*, con conseguenze avverse sul comportamento e sulla sopravvivenza (Lefebvre et al., 2001); alcuni effetti negativi, riconducibili all'acido domoico, sono stati osservati anche in esemplari di foche (Scholin et al., 2000). Gli effetti dell'acido domoico sono stati studiati su uccelli marini, leoni marini e diverse specie di pesci (Fritz et al., 1992; Scholin et al., 2000; Lefebvre et al., 2012).

L'acido domoico è stato isolato per la prima volta in Giappone dalla macroalga *Chondria armata* nel 1958; il nome del composto deriva dal termine giapponese “*domoi*”, che significa macroalga (Villac et al., 1993).

Il primo caso documentato di intossicazione umana si è verificato nel 1987 in Canada, quando 3 persone morirono e più di un centinaio si ammalarono dopo aver mangiato mitili (Bates et al., 1998). Dall'analisi dei molluschi risultò la presenza di una quantità considerevole di acido domoico. La fonte della neurotossina venne ricollegata a una fioritura algale della specie allora nota come *Nitzschia pungens*, oggi *Pseudo-nitzschia multiseriata* (Hasle, 1995). In Adriatico, la presenza di acido domoico nei molluschi mitili è stata confermata per la prima volta nel 2000 con concentrazioni tra 63 e 190 ng/g, ben al di sotto dei limiti regolatori (20 mg/kg) (Ciminiello et al., 2005).

In seguito, la presenza di acido domoico nei mitili è stata registrata molte volte ma raramente ha raggiunto valori superiori ai 2 mg/kg (Ljubešić et al., 2011; Arapov et al., 2017; Giulietti, 2021); nonostante specie di *Pseudo-nitzschia* potenzialmente tossiche siano presenti con elevate abbondanze, in genere la biotossina viene ritrovata in piccole quantità nelle cellule microalgali (Giulietti et al., 2021).

Il meccanismo di azione dell'acido domoico si svolge al livello della trasmissione sinaptica dove la molecola si lega ai recettori dell'acido

glutammico; entrambi i composti hanno funzione eccitatoria, tuttavia, l'acido domoico è 100 volte più potente dell'acido glutammico (Todd, 1993). La tossina causa la depolarizzazione dei neuroni, con aumento della concentrazione intracellulare di calcio che porta all'attivazione di enzimi con un conseguente importante consumo energetico, causando infiammazione neuronale e morte cellulare (Mos, 2001). I neuroni interessati dal meccanismo si trovano principalmente nell'ippocampo, sito che svolge un ruolo importante nella formazione delle memorie esplicite (dichiarativa e semantica), nella trasformazione della memoria a breve termine in memoria a lungo termine e nella navigazione spaziale; questo spiega il più eclatante effetto dell'intossicazione da acido domoico, ossia la perdita di memoria a breve termine (Todd, 1993). La tossicità di questa neurotossina dipende dalla specie colpita e dallo stadio di crescita; nell'uomo solitamente non si riscontrano effetti con dosi inferiori a 0.5 mg/kg di peso corporeo e i sintomi compaiono dopo 3 o 5 ore e comprendono: vomito e diarrea, perdita di memoria e stato confusionale, mutismo e coma.

Studi di laboratorio dimostrano come la produzione della neurotossina da parte di *Pseudo-nitzschia* sia un fenomeno complesso in quanto influenzato da fattori abiotici (limitazione da fosfati o silicati, azoto in forma organica o inorganica,

temperatura, salinità, irradiazione) e biotici (batteri, zooplancton), come anche dall'interazione di due o più fattori (Arapov et al., 2020c).

La presenza di grazers può influenzare il fitoplancton nella sua morfologia, come, ad esempio, la lunghezza delle colonie e nella sua ecofisiologia (Tammilehto et al., 2015). È possibile che i composti rilasciati dai grazers e dalle cellule fitoplanctoniche danneggiate producano un segnale che potenzialmente induce la reazione difensiva nelle alghe (Van Donk et al., 2011); a questo proposito Lundholm et al. (2018) ha identificato i composti rilasciati dai grazers come copepodamidi, ossia lipidi coniugati con taurina (Grebner et al., 2019), che svolgono il ruolo di segnale chimico responsabile per l'innesco della produzione della tossina. Le copepodamidi note sono 21; queste contengono gli acidi grassi più comuni nell'ambiente marino (eg. acido eicosapentaenoico) e le loro composizioni sono specie specifiche; i copepodi sono caratterizzati da molte tipologie di acidi grassi, è quindi possibile che esistano più copepodamidi rispetto a quelle attualmente conosciute (Grebner et al., 2019; Haroardóttir et al., 2019).

L'acido domoico ha ripercussioni negative sui copepodi, infatti studi sperimentali hanno mostrato casi di mortalità già a basse concentrazioni, come anche alterazioni fisiologiche che si sono manifestate come nutrizione discontinua dei grazers (Tammilehto et al., 2015). L'ipotesi che l'acido

domoico possa influenzare l'attività di grazing dei copepodi ha delle ripercussioni sulle comunità fitoplanctoniche, in quanto le specie tossiche sono avvantaggiate rispetto a quelle non tossiche (Huntley et al., 1986).

## Capitolo terzo

### MATERIALI E METODI

#### ***3.1 Valutazione preliminare dell'influenza dei copepodi sulla crescita di Pseudo-nitzschia multistriata: introduzione***

La prima fase della ricerca è stata svolta con l'obiettivo di identificare la condizione di crescita più stressante per *Pseudo-nitzschia multistriata*. L'ipotesi da testare con questo esperimento è che i copepodi cresciuti in presenza di *P. multistriata*, o cresciuti in condizioni di impossibilità di alimentazione, potessero produrre molecole segnale stressanti per le cellule di *P. multistriata* stessa.

Un ceppo di *P. multistriata* è stato fatto crescere in terreni ricavati da acqua marina filtrata a 0.45 µm in cui erano stati in precedenza coltivati specie miste di copepodi cresciuti in diverse condizioni:

- Trattamento *A*, terreno in cui erano stati allevati copepodi nutriti per 72h con cellule di *Pseudo-nitzschia multistriata*;
- Trattamento *B*, con terreno in cui erano stati allevati copepodi nutriti per 72h con cellule di *Skeletonema marinoi*;
- Trattamento *C*, con terreno in cui erano stati allevati copepodi mantenuti in condizioni *starving* (senza nutrimento) per 72h.

Nei due trattamenti A e B, i copepodi sono stati nutriti seguendo il protocollo sperimentale di Petrucciani et al. (2022): per ogni copepode è stata fornita una biomassa algale compresa tra 0.2-0.7 mg C in modo da evitare colture eccessivamente dense limitando quindi un possibile ‘self-shading’ come anche un eccessivo consumo di ossigeno e nutrienti.

### ***3.2 Valutazione preliminare dell’influenza dei copepodi sulla crescita di Pseudo-nitzschia multistriata: coltura dei copepodi***

I copepodi sono stati raccolti nella costa di Ancona utilizzando un retino da zooplancton con maglia 200 µm. Il campione, una volta portato in laboratorio, è stato concentrato in un becher utilizzando il sistema della camera oscura con fonte di attrazione luminosa. I copepodi più attivi sono stati quindi selezionati, contati, e sono stati trasferiti in 1 L di acqua di mare filtrata a 45 µm facendo uso di una pipetta Pasteur tramite osservazione allo stereomicroscopio. Durante la prima selezione sono stati raccolti in totale 700 copepodi, mantenuti in condizioni di ossigenazione con pietra porosa, temperatura ambiente e nessun ciclo di luce-buio. Successivamente è stata effettuata una seconda selezione in cui 160 copepodi non più vitali sono stati rimossi, i restanti 540 copepodi sono stati suddivisi equamente in tre becher, corrispondenti ai tre trattamenti, con 500 mL di acqua di mare filtrata ciascuno.



Il trattamento *C*, con copepodi *starving*, è stato mantenuto per 72 ore in condizioni di ossigenazione con pietra porosa, dopodiché il contenuto è stato filtrato a 0.45 µm e conservato a -20 °C. I due trattamenti *A* e *B*, con copepodi *non-starving*, sono stati nutriti tramite volumi di inoculi algali calcolati in modo tale da somministrare 0.5 mg C di biomassa per ogni copepode (totale 90 mg C per 180 copepodi).

La biomassa da inoculare è stata calcolata a partire dalla densità cellulare dalla coltura microalgale tramite i biovolumi cellulari secondo Menden-Deuer & Lessard (2000), come segue.

Densità cellulare: 1 mL di campione è stato lasciato a sedimentare 1 ora in una camera di sedimentazione. Quindi è stato effettuato il conteggio su 10 campi casuali utilizzando un microscopio Zeiss Axiovert 25 a ingrandimento 200x, nel caso di *Pseudo-nitzschia multistriata*, e 400x, nel caso di *Skeletonema marinoi*; il calcolo della densità viene effettuato con la seguente la formula:

$$\frac{(n^{\circ} \text{ cellule contate})(\text{coefficiente microscopio})}{(\text{volume sedimentato})(\text{numero di campi})}$$

in cui il coefficiente microscopio corrisponde al rapporto tra l'area totale e l'area del campo.

La biomassa è stata ottenuta mediante i biovolumi medi secondo il metodo di Menden-Deuer & Lessard (2000).

I due trattamenti *A* e *B*, dopo 72 ore, sono stati filtrati a 0.45 µm e conservati a -20 °C. I filtri sono stati utilizzati per l'identificazione dei copepodi presenti nel campione.

### ***3.3 Valutazione preliminare dell'influenza dei copepodi sulla crescita di Pseudo-nitzschia multistriata: terreni di coltura per Pseudo-nitzschia multistriata***

Il terreno per le repliche di controllo è stato realizzato avendo come base acqua di mare filtrata, con salinità di 37.4; i nutrienti sono stati aggiunti seguendo il protocollo di preparazione del terreno F/2, adattando le quantità per un volume di 1800 mL:

- Nitrato di sodio (NaNO<sub>3</sub>) 1.8 mL
- Diidrogenofosfato di sodio (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) 1.8 mL
- Silicato di sodio (Na<sub>2</sub>SiO<sub>3</sub>) 1.8 mL
- Soluzione tampone (hepes) 1.8 mL
- Metal solution 1.8 mL
- Vitamine 0.90 mL

I terreni per le repliche dei trattamenti sono stati realizzati avendo come base il filtrato corrispondente. La salinità è stata mantenuta invariata in quanto la divergenza tra repliche e con il controllo è risultata trascurabile per questo esperimento; infatti, il terreno derivato da copepodi nutriti con *Skeletonema marinoi* presentava un valore di salinità di 38.4, il terreno derivato da copepodi

nutriti con *P. multistriata* presentava un valore di salinità di 37.8 e il terreno derivato da copepodi *starving* presentava un valore di salinità di 37.3. Ogni filtrato è stato quindi arricchito seguendo il protocollo di preparazione del terreno F/2, adattando le quantità per un volume di 450 mL:

- Nitrato di sodio ( $\text{NaNO}_3$ ) 0.45 mL
- Diidrogenofosfato di sodio ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ) 0.45 mL
- Silicato di sodio ( $\text{Na}_2\text{SiO}_3$ ) 0.45 mL
- Soluzione tampone (hepes) 0.45 mL
- Metal solution 0.45 mL
- Vitamine 0.23 mL

La preparazione delle colture è stata effettuata prelevando 300 mL da ogni terreno, questi sono quindi stati trasferiti in 12 beute da 250 mL, precedentemente autoclavate, ricavando tre repliche da 100 mL per ogni trattamento e tre repliche da 100 mL per il controllo.

L'inoculo del ceppo *Pseudo-nitzschia multistriata* è stato ancora una volta calcolato in modo da ottenere 0.5 mg C di biomassa algale per ogni copepode nei 100 mL stimato tramite una proporzione basata sulla quantità di copepodi nota nei 500 mL di partenza:

$$500:180=100:36$$

il quantitativo di biomassa da aggiungere ad ogni replica, per 36 copepodi, è risultato quindi essere 18 mg C corrispondenti ad 1.6 mL di coltura madre data la densità cellulare (nuovamente stimata tramite il metodo dei 10 campi).

### ***3.4 Valutazione preliminare dell'influenza dei copepodi sulla crescita di Pseudo-nitzschia multistriata: monitoraggio delle colture***

Le 12 repliche preparate sono state mantenute in camera di coltura per 1 mese; i controlli della crescita sono stati effettuati ogni 48 ore, durante la prima settimana, e una volta a settimana a partire dalla seconda settimana. I prelievi sono stati effettuati risospendendo le cellule presenti nelle beute e trasferendone 1 mL nella camera di sedimentazione, si è quindi proceduto con il conteggio seguendo il metodo dei 10 campi casuali (v. Par 3.2). I dati di ogni controllo sono stati elaborati in modo tale da costruire delle curve di crescita che hanno consentito di valutare quale dei 3 trattamenti fosse quello più stressante per la microalga. A tal proposito (v. Risultati) la condizione *starving* è risultata essere inaspettatamente quella più stressante in termini di crescita.

### ***3.5 Valutazione degli effetti dei copepodi mantenuti in condizioni di stress (starving) su crescita e tossicità di Pseudo-nitzschia multistriata***

In questo esperimento sono state utilizzate concentrazioni maggiori sia di copepodi, che di alghe allo scopo di produrre una quantità di biomassa sufficiente per le analisi delle tossine. Si è provveduto quindi a realizzare 3 repliche da 1000 mL ciascuna, in cui le cellule di *P. multistriata* sono state

poste nel terreno in cui erano stati allevati copepodì mantenuti in condizioni *starving*.

I copepodì (raccolti come precedentemente esposto, v. Par. 3.2) sono stati selezionati allo stereomicroscopio tramite pipetta Pasteur. Sono stati raccolti in totale 1080 copepodì, equamente suddivisi nelle 3 repliche, mantenuti in condizioni di ossigenazione con pietra porosa, temperatura ambiente e nessun ciclo di luce-buio per 72 ore. Al termine dei 3 giorni le repliche sono state filtrate a 45 µm.

I terreni di coltura sono stati preparati aggiungendo i nutrienti necessari, a ogni filtrato, seguendo il protocollo di preparazione del terreno F/2, riadattando le quantità per un volume di 1 L:

- Nitrato di sodio (NaNO<sub>3</sub>) 1 mL
- Diidrogenofosfato di sodio (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) 1 mL
- Silicato di sodio (Na<sub>2</sub>SiO<sub>3</sub>) 1 mL
- Soluzione tampone (hepes) 1 mL
- Metal solution 1 mL
- Vitamine 0.50 mL

La salinità è stata portata a valori equivalenti a quelli dei terreni utilizzati nel precedente esperimento. L'inoculo del ceppo *Pseudo-nitzschia multistriata* è

stato ancora una volta calcolato in modo da ottenere 0.5 mg C di biomassa algale per ogni copepode stimato nei 1 L (180 mg C per replica).

Le 3 repliche sono state mantenute in camera di coltura per 2 settimane, prelevando ogni 48 ore un subcampione fino al termine dell'esperimento (fatta eccezione per l'ultimo controllo che per motivi logistici è stato effettuato a distanza di 4 giorni dal precedente). I campionamenti sono stati effettuati risospendendo le cellule presenti nelle beute e trasferendone 1 mL nella camera di sedimentazione, si è quindi proceduto con il conteggio seguendo il metodo precedentemente descritto (v. Par 3.2). I dati di ogni controllo sono stati elaborati in modo tale da costruire delle curve di crescita e da analizzare i tassi di crescita (v. Par 3.6).

Al termine della fase sperimentale le singole repliche sono state unite, ricavando un unico campione da 3 L che è stato spedito all'Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche "Togo Rosati" per l'analisi dell'acido domoico mediante LC-MS/MS (Cromatografia liquida con spettrometro di massa).

### ***3.6 Analisi statistiche***

L'andamento delle colture è stato valutato facendo uso dei tassi di crescita, espressi come  $\mu = \text{day}^{-1}$ , e calcolati seguendo la formula:

$$\frac{(\ln N_1 - \ln N_0)}{(t_2 - t_1)}$$

dove  $N_1$  è la densità finale,  $N_0$  è la densità iniziale e  $T$  è il numero di giorni trascorso tra le due misurazioni (Accoroni et al., 2018).

I dati sono stati analizzati facendo uso del software Statistica (StatSoft 12.0) realizzando un'analisi di tipo One Way ANOVA, ossia l'analisi della varianza che permette di studiare uno o più gruppi di dati confrontandone la variabilità interna e tra gruppi, basata su una singola variabile dipendente (abbondanze e tassi di crescita). Il software ha permesso di visionare i descrittori statistici e di approfondire i risultati con il Test HSD di Tukey che mette a confronto tutte le possibili coppie di valori medi identificandone le differenze e riportandone la rilevanza statistica indicata come p-level (livello di significatività osservato).

Per l'interpretazione del p-level sono stati stabiliti 3 valori soglia *alfa* (0.05; 0.01; 0.001) al di sotto dei quali i dati osservati sono statisticamente significativi.

## Capitolo Quarto

### RISULTATI

#### 4.1 Identificazione dei copepodi

Durante l'analisi dei filtri è stata osservata la presenza di specie onnivore (con preferenze verso una dieta erbivora) appartenenti all'ordine Calanoida (*Temora longicornis*, *Euchirella* sp. e *Gaetanus minutus*), e specie carnivore appartenenti all'ordine Cyclopoida (*Corycaeus* sp.) (Schnetzer & Steinberg, 2002; Fanelli et al., 2022); nella Fig. 7 è possibile osservare l'inquadratura filogenetica dei diversi ordini di copepodi con la corrispondente rappresentazione morfologica.

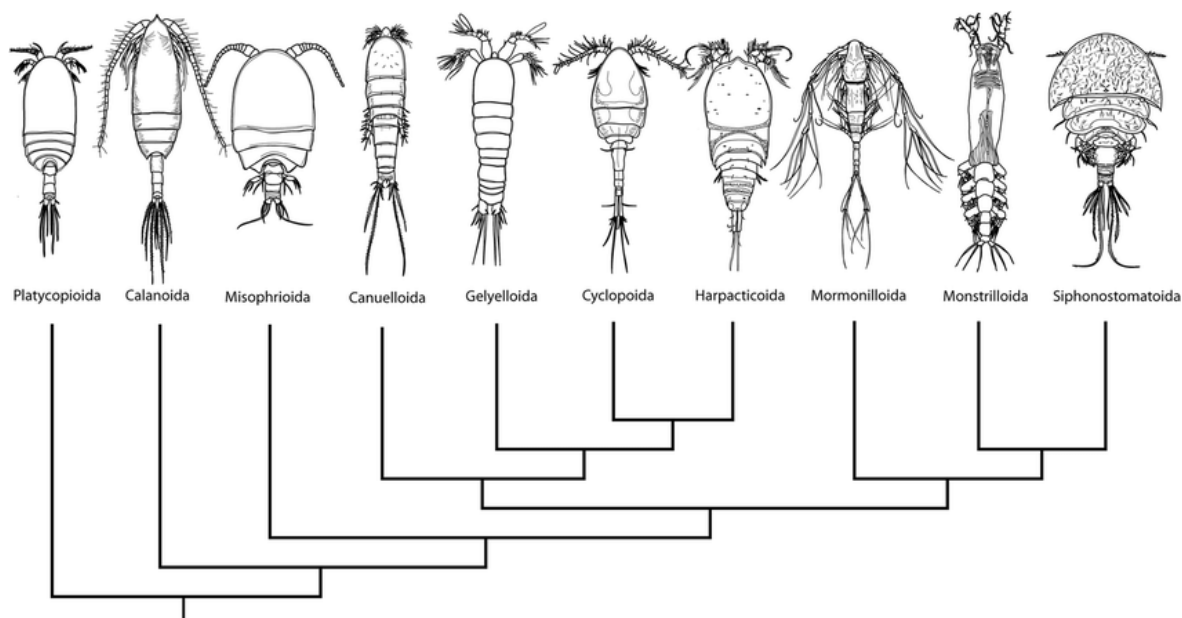


Fig. 7 Filogramma degli ordini di copepodi (da Khodami et al. 2017).



#### ***4.2 Crescita di Pseudo-nitzschia multistriata: esperimento di valutazione preliminare dell'influenza dei copepodi***

Nelle Fig. 8; Fig. 9; Fig. 10; Fig. 11 si possono osservare le curve di crescita di ciascun trattamento. Per nessuno dei trattamenti è stata osservata una fase *lag* (ad eccezione della replica 1 del controllo, dove la fase *lag* si è osservata per i primi 4 giorni); quindi le colture mostrano una fase di crescita esponenziale della durata di 13 giorni nei controlli, 6 giorni nei trattamenti A, B e C, fatta eccezione per la replica 3 di quest'ultimo che termina la fase esponenziale già dopo 4 giorni.

Le abbondanze massime sono state raggiunte a distanza di 13 giorni dal  $T_0$  nelle repliche di controllo e del trattamento A con  $658,000 \pm 362,326$  e  $63,260 \pm 53,960$  cell./mL, rispettivamente; sono state raggiunte invece a distanza di 6 giorni dal  $T_0$  nei trattamenti B e C con  $125,518 \pm 116,375$  e  $34,550 \pm 14,435$  cell./mL, rispettivamente. Infine, in tutte le colture è stata osservata la fase di declino; in particolare solo nel controllo è stato possibile osservare una fase stazionaria della durata di 7 giorni.

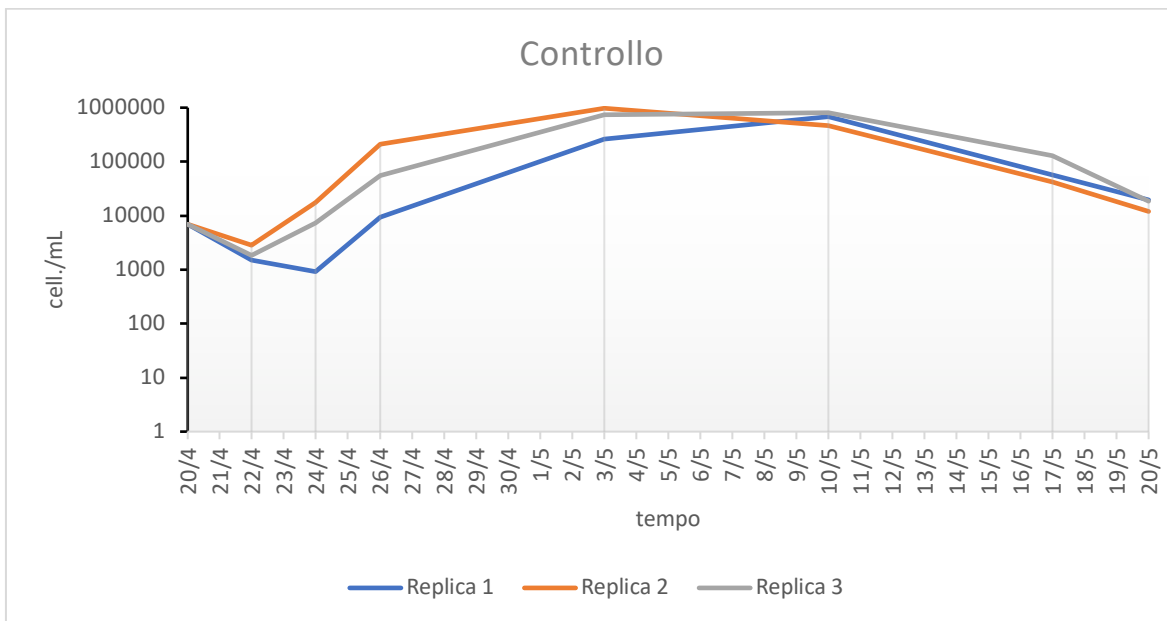


Fig. 8 Curva di crescita delle repliche del controllo.

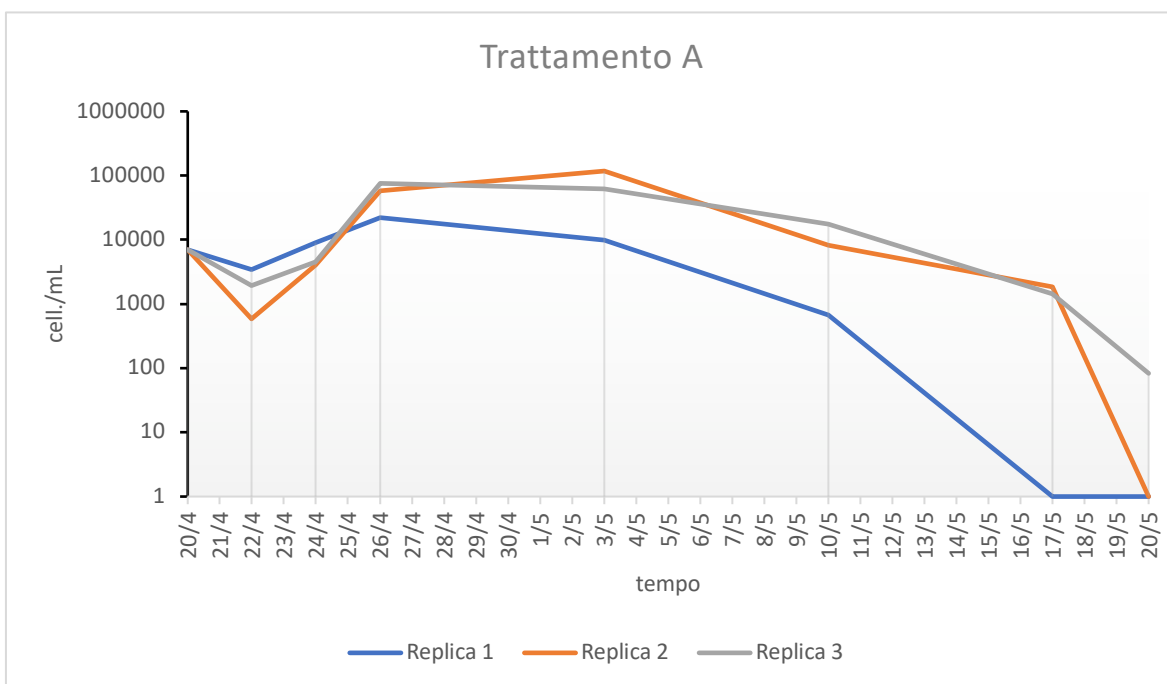


Fig. 9 Curva di crescita delle repliche del trattamento A (terreno ricavato dal filtrato dei copepodi nutriti con *Pseudo-nitzschia multistriata*).

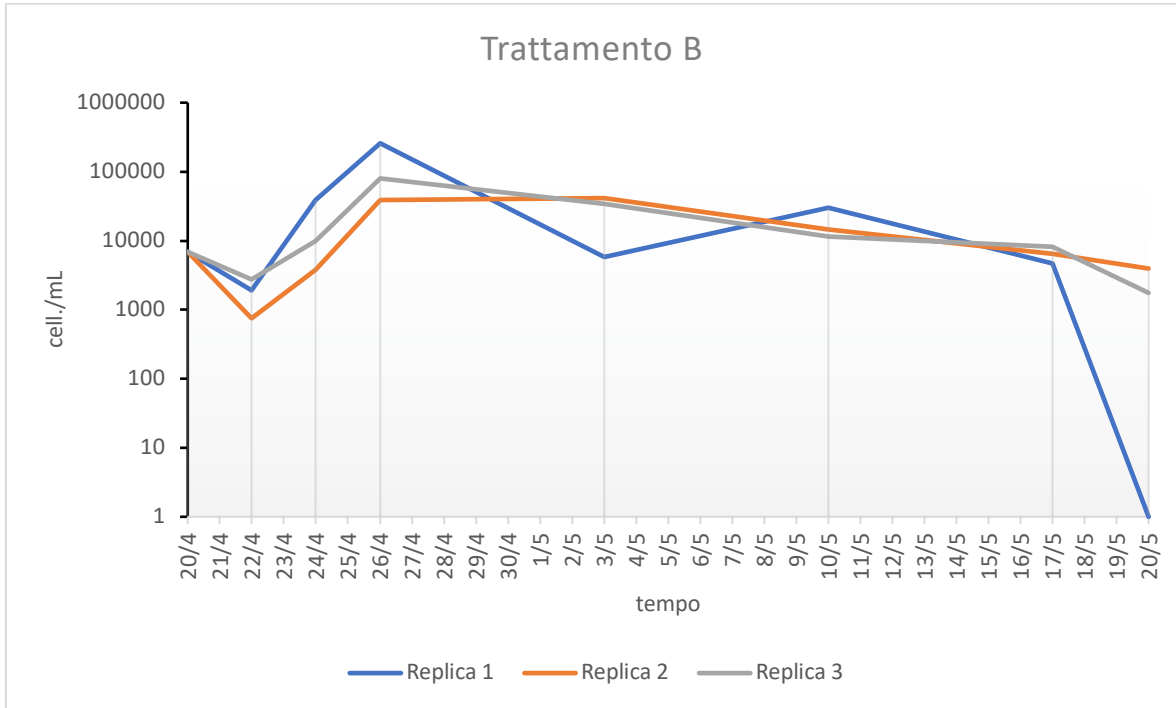


Fig. 10 Curva di crescita delle repliche del trattamento B (terreno ricavato dal filtrato dei copepodi nutriti con *Skeletonema marinoi*).

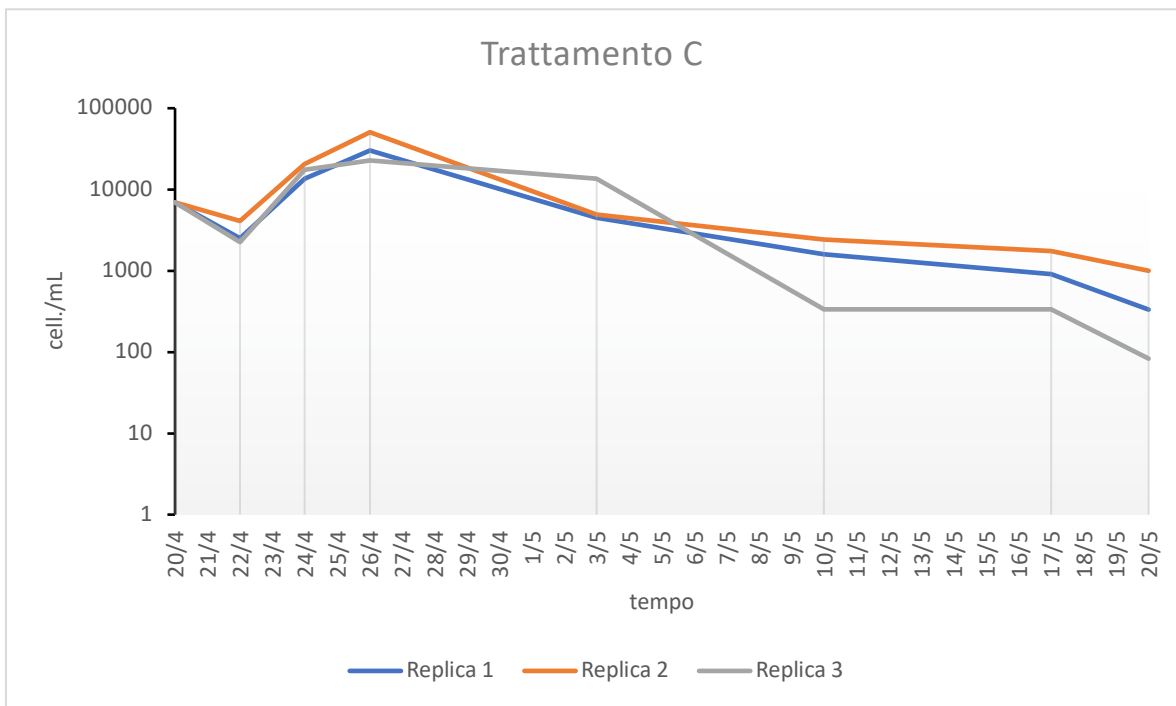


Fig. 11 Curva di crescita delle repliche del trattamento C (terreno ricavato dai copepodi mantenuti in condizioni 'starving').

Nella Fig. 12 vengono riportate le curve di crescita di ciascun trattamento, ricavate mediando i valori delle 3 repliche: le fasi di crescita, stazionarie e di declino delle colture tendono a differire molto tra loro. In particolare, analizzando gli andamenti nel periodo di crescita esponenziale (ricavate dalle medie delle repliche), il trattamento C, a differenza degli altri, termina la fase già a distanza di 4 giorni dall'inoculo.

Considerando le abbondanze medie degli esperimenti per tutta la durata del test, abbondanze significativamente maggiori sono state osservate nel controllo ( $188,880 \pm 302,685$  cell./mL) rispetto al trattamento A ( $17,457 \pm 29,990$  cell./mL,  $p\text{-level} < 0.01$ ), al B ( $25,729 \pm 52,975$  cell./mL,  $p\text{-level} < 0.01$ ) e al C ( $9,045 \pm 12,117$  cell./mL,  $p\text{-level} < 0.001$ ), mentre le differenze non risultano significativa tra i trattamenti.

Il *maximum yield* raggiunto dal controllo ( $658,000 \pm 362,326$  cell./mL) è superiore a quello di ciascun trattamento. È possibile osservare inoltre come il trattamento C (starving) sia caratterizzato da un *maximum yield* più basso rispetto ai trattamenti A e B ( $34,550 \pm 14,435$ ,  $63,260 \pm 53,960$  e  $125,518 \pm 116,375$  cell./mL, rispettivamente), benché la differenza non sia significativa. Osservando la fase di declino delle colture, il trattamento C mostra un declino iniziale delle abbondanze cellulari più marcato, al punto da raggiungere valori di densità cellulare di  $1,446 \pm 1,050$  cell./mL dopo 20 giorni dal  $T_0$ , mentre le

densità dei trattamenti A e B che nello stesso tempo presentavano valori di  $8,818 \pm 8,489$  cell./mL e  $18,666 \pm 9,895$  cell./mL rispettivamente. Al termine dell'esperimento il trattamento A è stato quello caratterizzato dalle abbondanze più basse ( $27 \pm 47$  cell./mL).

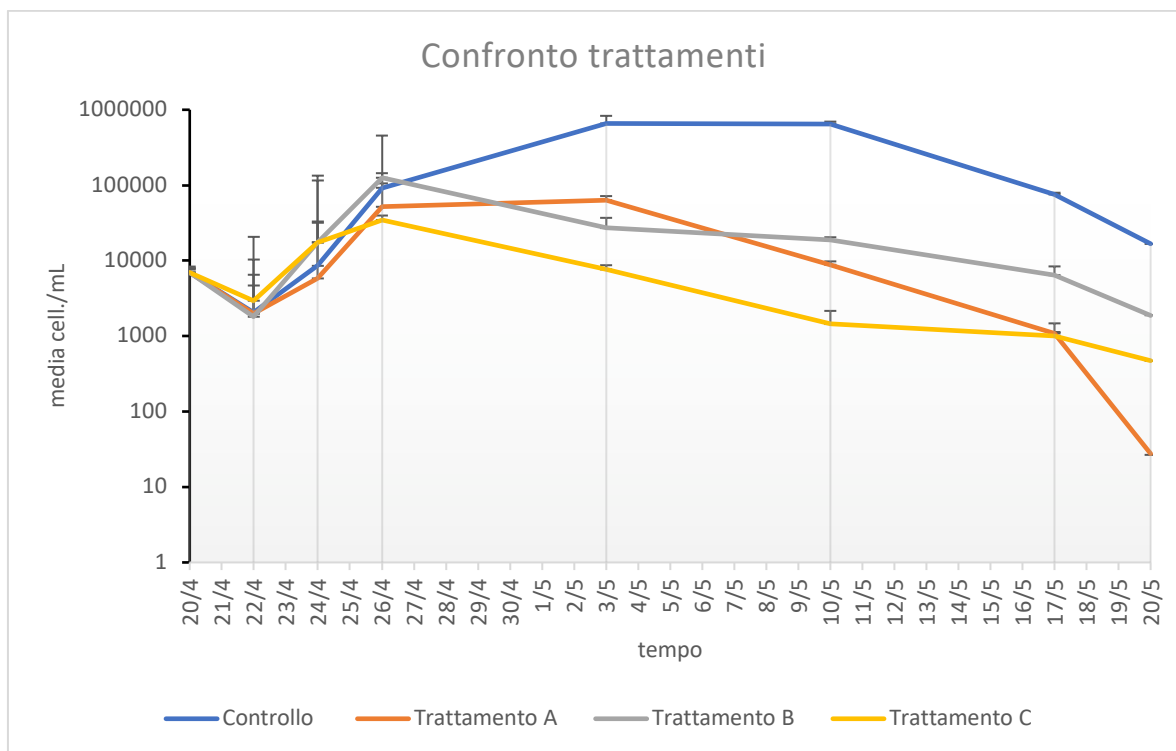


Fig. 12 Curve di crescita mediate tra le repliche di ogni trattamento  $\pm$  la deviazione standard.

Il forte stress subito dalle cellule microalgali è stato rilevato anche tramite alterazioni morfologiche delle singole cellule e delle colonie; difatti a differenza delle cellule osservate nel controllo e nel trattamento B, che hanno

mantenuto la morfologia tipica della specie, nei trattamenti A e C, le cellule sono risultate deformi; inoltre, le colonie, di tipo “stepped-chain sono state sostituite da gruppi di cellule disposte in modo parallelo tra loro.

Nella Fig. 13 possiamo osservare l’andamento dei tassi di crescita dei trattamenti (calcolati sui valori precedentemente mediati delle 3 repliche di ciascun trattamento) nell’arco temporale dell’esperimento. Il controllo e il trattamento A raggiungono il tasso di crescita massimo a distanza di 4 giorni dal  $T_0$ , mentre i trattamenti B e C hanno il loro massimo a distanza di 2 giorni dal  $T_0$ .

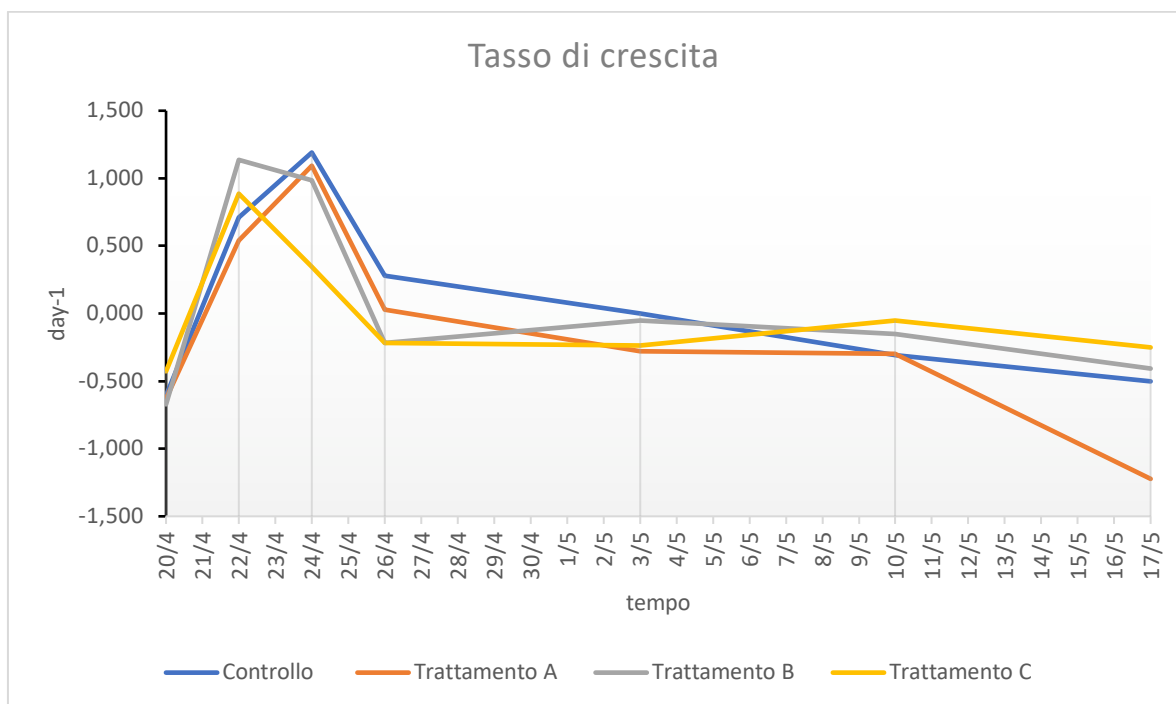


Fig. 13 Andamento del tasso di crescita di ogni coltura.

Considerando i tassi di crescita medi degli esperimenti per tutta la durata del test, valori maggiori sono stati osservati nel controllo ( $0.076 \pm 0.627 \text{ day}^{-1}$ ) rispetto ai trattamenti ( $-0.148 \pm 0.880$ ,  $-0.036 \pm 0.928$  e  $-0.012 \pm 0.465 \text{ day}^{-1}$ , per A, B e C, rispettivamente) ma non in maniera significativa ( $p\text{-level} > 0.05$ ).

Nella Fig. 14 possiamo osservare il tasso di crescita massimo (calcolato sui valori precedentemente mediati delle 3 repliche di ciascun trattamento): come era intuibile già dalle curve, il controllo risulta avere il tasso di crescita maggiore ( $1.191 \text{ day}^{-1}$ ) rispetto ai trattamenti, mentre il trattamento C (*starving*) presenta un tasso di crescita inferiore ( $0.886 \text{ day}^{-1}$ ) a tutti gli altri trattamenti ( $1.093$  e  $1.137 \text{ day}^{-1}$ , rispettivamente per A e B).

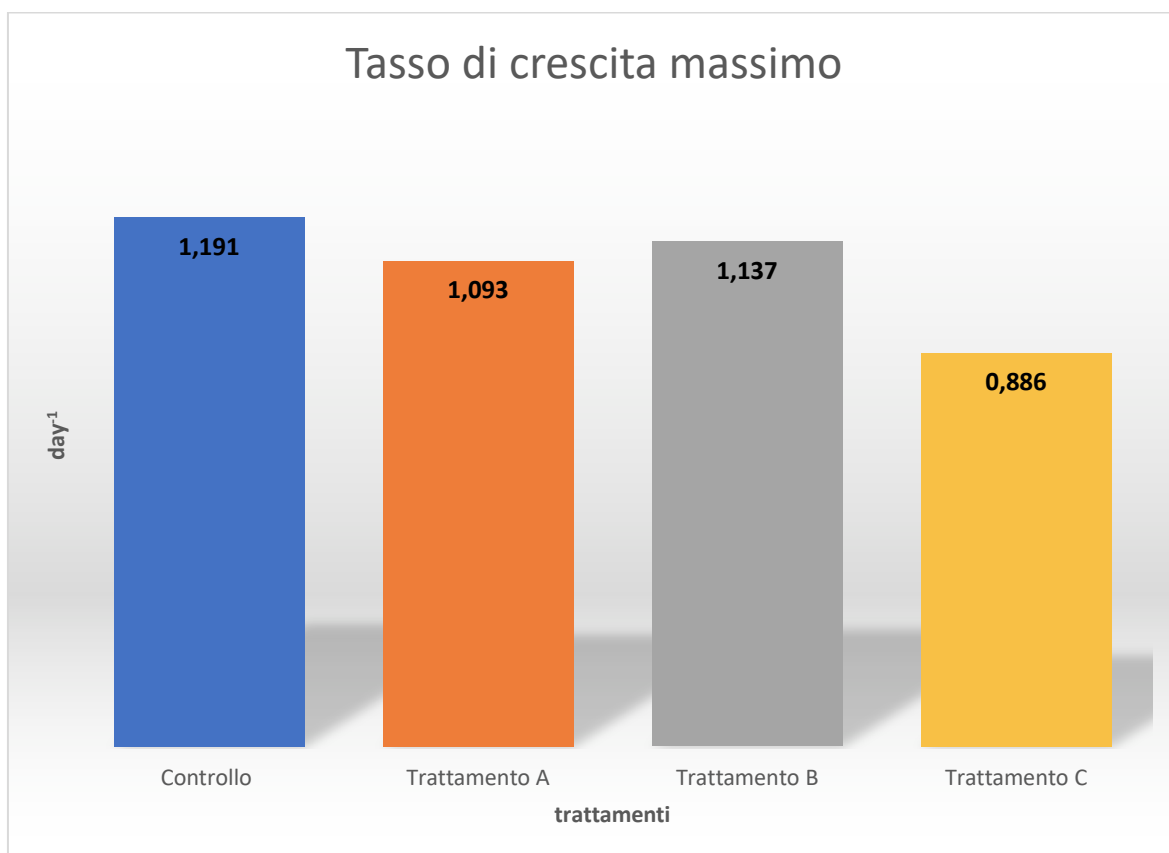


Fig. 14 Tasso di crescita massimo di ogni coltura.

#### ***4.3 Crescita e tossicità di Pseudo-nitzschia multistriata: valutazione degli effetti dei copepodi mantenuti in condizioni di stress (starving)***

Nella Fig. 15 si può osservare l'andamento della curva di crescita di *Pseudo-nitzschia multistriata* inoculata nel terreno ricavato dal filtrato di copepodi mantenuti nella condizione *starving* che (dal precedente esperimento) è risultata essere la più stressante.

Si osserva una fase di crescita *lag* della durata di 2 giorni, dopodiché le colture mostrano una fase di crescita esponenziale della durata di 6 giorni. Il *maximum yield* è stato raggiunto il giorno 8 con  $19,6401 \pm 32,605$  cell./mL. Le colture sono passate quindi per una fase stazionaria della durata di 2 giorni, per poi andare incontro al declino. Il tasso di crescita massimo ( $0.899 \text{ day}^{-1}$ ) è stato raggiunto al giorno 2, mentre tassi di crescita negativi si evidenziano a partire dal giorno 8 (Fig. 16).

Durante tutto l'esperimento il forte stress subito dalle cellule microalgali è stato rilevato anche per la presenza delle alterazioni morfologiche descritte precedentemente (v. Par. 4.1).

Per quanto riguarda la produzione di acido domoico i risultati ottenuti dall'esame in LC-MS/MS mostrano una totale assenza della biotossina tossina nelle cellule algali esaminate.



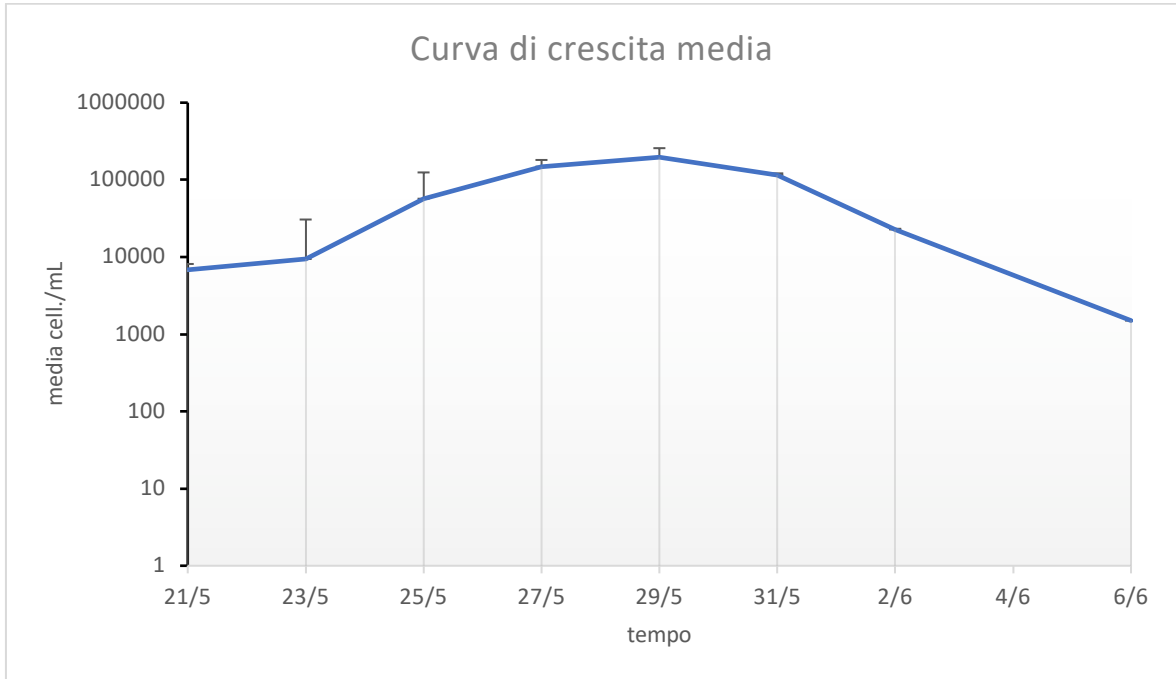


Fig. 15 Curve di crescita mediate tra le repliche  $\pm$  la deviazione standard.

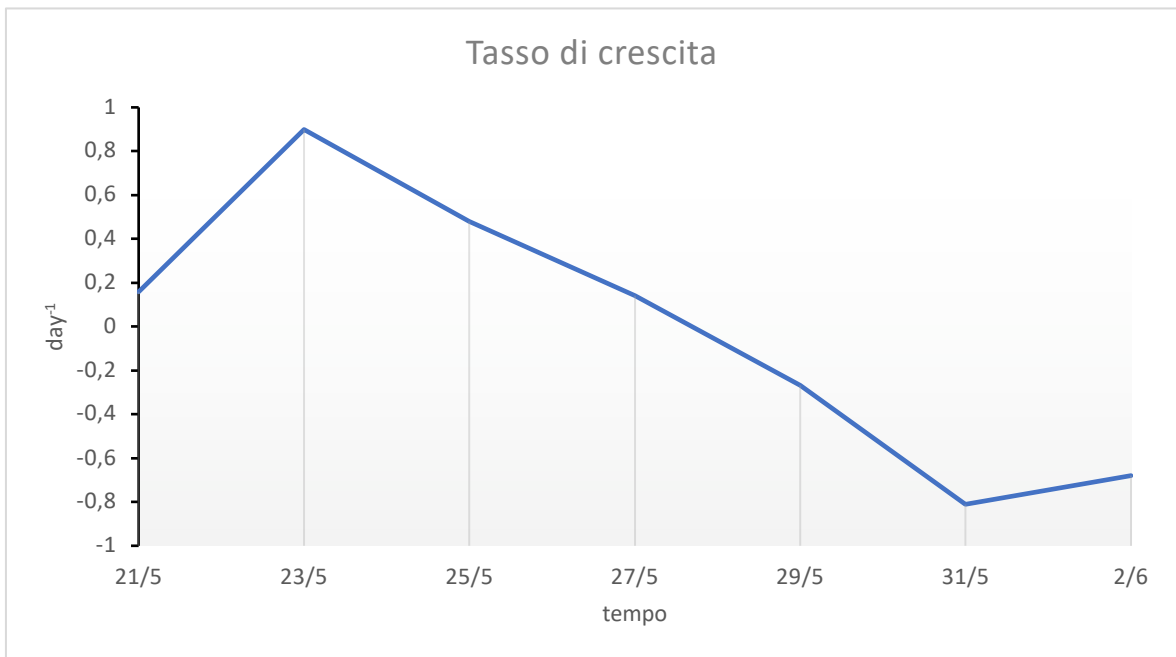


Fig. 16 Andamento del tasso di crescita.

## Capitolo Quinto

### DISCUSSIONE

Questo studio ha messo in evidenza che la presenza di copepodi influisce sulla crescita e morfologia delle cellule algali appartenenti alla specie *Pseudonitzschia multistriata*.

Le interazioni tra diatomee e copepodi sono state studiate per quanto riguarda sia gli effetti delle prime sui secondi che viceversa.

È noto da tempo che le diatomee (ad esempio *Skeletonema marinoi*, *Thalassiosira rotula*), come anche altri gruppi fitoplanctonici (ad esempio cianobatteri, criptofite, primnesiofite, crisofite and sinurofite), sono in grado di produrre composti citotossici responsabili dell'inibizione della crescita delle popolazioni zooplanctoniche, con effetti teratogeni che potenzialmente ne sabotano le generazioni successive. I composti citotossici sono aldeidi polinsature a catena corta (PUAs) e altri acidi grassi ossidati (Ianora et al., 2010; Pichierri et al., 2016). Pohnert, (2000) ha dimostrato che quando le diatomee sono danneggiate dai grazers, si verifica un rapido rilascio di PUAs; queste aldeidi, prodotte da diversi ceppi algali, sono in grado di indurre effetti eterogenei su differenti specie di copepodi (Md Amin et al., 2011).

La microalga *Skeletonema marinoi* è in grado, inoltre, di produrre ossilipine capaci di inibire, nei copepodi, una serie di geni coinvolti nella risposta allo

stress, nella detossificazione delle aldeidi e nella regolazione dell'apoptosi (Lauritano et al., 2011).

D'altra parte, anche i copepodi sono in grado di influenzare la crescita delle diatomee e di questo si ritrovano numerosi riscontri in letteratura. Ad esempio Tammilehto et al. (2015) hanno studiato come la presenza di grazers, sia a contatto diretto che indiretto, possa influenzare colture di fitoplancton nella morfologia cellulare, nella lunghezza delle catene e nella fisiologia, dimostrando che i segnali prodotti dai copepodi, assieme ai segnali prodotti dalle cellule danneggiate, potenzialmente interagiscono a favore della produzione di tossine. Petrucciani et al. (2022) hanno dimostrato come la presenza di copepodi influenzi fortemente il tasso di crescita di diverse specie di diatomee (non solo *Pseudo-nitzschia*); infatti i composti secreti dai grazers funzionano come segnali precoci della presenza di predatori, per cui gli organismi predati rispondono con una riduzione della lunghezza delle colonie, la produzione di biotossine, l'aumento di bioluminescenza e una maggiore silicizzazione della parete (Grebner et al., 2019). La riduzione della lunghezza delle colonie nelle diatomee, esposte alla presenza di grazers, è stata generalmente interpretata come il risultato di una rottura meccanica delle catene; tuttavia, Bergkvist et al. (2012) hanno mostrato come aggiustamenti nella taglia delle colonie, nel caso di *S. marinoi*, si verificano anche senza

contatto fisico tra copepodi e alghe. La variazione nella lunghezza della catena fa sì che le cellule algali ricadano al di fuori del range di taglia ottimale dei grazers dominanti (per difetto o per eccesso), in particolare la riduzione delle colonie, a singole cellule o coppie di cellule, risulta vantaggiosa nei periodi in cui i copepodi sono dominanti rispetto al microzooplancton e alle forme larvali del mesozooplancton. Un altro esempio ci è dato dalla dinoflagellata *Alexandrium tamarense*, che risponde alla presenza di grazers con una riduzione della taglia delle catene e della velocità di nuoto limitando il tasso di incontro dei predatori, in aggiunta alla produzione di tossicità (Selander et al., 2012)

In questo studio l'effetto indotto dalla presenza di grazers cresciuti in tutte le condizioni sperimentali è stato una diminuzione del tasso di crescita. Tale diminuzione potrebbe essere una conseguenza della riallocazione delle risorse energetiche in condizioni di rischio per le colonie algali. Il meccanismo di difesa indotto dalla presenza di grazers comporta un complesso meccanismo di segnalazione, con conseguenti variazioni fisiologiche, Haroardóttir et al. (2019) mostrano nel loro lavoro che l'esposizione di *Pseudo-nitzschia* ai copepodi è in grado di influenzare l'espressione differenziale di geni coinvolti in diversi pathway metabolici (aminoacidi, carboidrati, lipidi) e nelle vie di segnalazione che possono portare alla produzione di acido domoico; ad ogni

modo nel loro studio sottolineano come la produzione della biotossina, sebbene correlata con un ridotto tasso di crescita delle colture, non implichi costi energetici tali da compromettere le abbondanze cellulari; lo stesso non si può dire per l'ispessimento della parete silicizzata, Pančić et al. (2019) dimostrano infatti come l'aumento della deposizione di silice nelle diatomee si riduca all'aumentare del tasso di crescita delle microalghe, suggerendo un possibile costo del meccanismo di difesa.

In questo lavoro, osservando i risultati della coltura cresciuta nel terreno ricavato dal filtrato di copepodi nutritisi di *Skeletonema marinoi*, la presenza dei grazers risulta influenzare le abbondanze cellulari medie che sono inferiori rispetto al controllo. Tuttavia, le cellule non hanno mostrato segni di alterazione morfologica, come è stato possibile osservare invece negli altri trattamenti. Questo fa ipotizzare che i copepodi alimentati con *Skeletonema* abbiano rilasciato segnali in grado di inibire la crescita di *P. multistriata* senza però alterarne la morfologia, e che le molecole segnale prodotte dalle cellule danneggiate di una diversa specie, non siano recepite o non siano in grado di innescare cambiamenti fisiologici nel ceppo considerato, come ad esempio l'aumento della silicizzazione che nelle diatomee è un tipico carattere fenotipicamente plastico modulato dal grazing (Pondaven et al., 2007).

La situazione cambia osservando la coltura di *P. multistriata*, cresciuta nel terreno ricavato dal filtrato di copepodi alimentati con la stessa specie, che ha evidenziato condizioni di stress, manifestatosi sia come calo della crescita sia come alterazioni morfologica delle cellule e delle colonie. Tenendo conto di questi risultati, possiamo ipotizzare che la causa primaria dello stress riscontrato nella coltura cresciuta nel terreno ricavato dal filtrato di copepodi alimentati con *P. multistriata*, non risiede esclusivamente nelle molecole rilasciate dai copepodi, ma soprattutto nella combinazione di queste con i segnali rilasciati dalle cellule danneggiate di *P. multistriata* che, a differenza di quelli prodotti da *S. marinoi*, sono in grado di influenzare la fisiologia e morfologia della microalga.

È interessante notare come i grazers mantenuti in condizioni di digiuno producano dei segnali che risultano stressanti per la specie in maniera più intensa rispetto ai copepodi regolarmente alimentati (indipendentemente dalla specie predata); infatti la significatività statistica riferita alla differenza delle abbondanze medie dei trattamenti rispetto al controllo è risultata, in questo caso, di gran lunga maggiore. Anche qui, lo stress si evidenzia non solo come forte inibizione della crescita, ma anche come alterazioni morfologiche delle cellule e delle colonie. Verosimilmente i copepodi, mantenuti in condizioni di digiuno per un tempo prolungato, potrebbero produrre dei segnali che inducono

uno stress maggiore nelle popolazioni microalgali, rispetto ai segnali prodotti dai grazers regolarmente alimentati.

Le condizioni di stress indotte dai copepodi mantenuti in condizioni *starving* sono state riconfermate nel secondo esperimento. I risultati hanno mostrato che questa condizione è potenzialmente in grado di provocare la produzione della biotossina. Il rilascio da parte delle microalghe di sostanze allelopatiche, tra cui le biotossine, è spesso associata a condizioni di stress in quanto modulata dallo status fisiologico della cellula che può subire l'influenza di un ampio spettro di fattori (Granéli et al., 2008; Accoroni et al., 2018).

Lundholm et al. (2018) hanno ottenuto risultati paragonabili per *P. seriata*, le cui cellule sono state esposte alla presenza indiretta di diverse specie di copepodi mantenuti in diverse condizioni di nutrizione, mostrando che i copepodi mantenuti in condizioni di digiuno per 5 giorni hanno rilasciato una quantità di copepodamidi (v. par 2.3) maggiore rispetto ai copepodi regolarmente alimentati; come conseguenza vi è stata inibizione della crescita e una maggiore produzione di acido domoico nelle colture algali esposte a tale trattamento. Secondo quanto osservato nel loro lavoro, il fitoplancton non risponde solamente a specifici segnali relativi all'attività di grazing, ma anche a segnali più generali relativi alla sola presenza dei grazers (copepodamidi) dal momento che la biotossina è stata osservata anche nelle colture di *P. seriata*

esposte alla presenza di copepodi morti. Questo fenomeno è stato osservato anche in altre microalghe. Ad esempio, Selander et al. (2015) hanno dimostrato come la produzione di tossine, nel genere *Alexandrium*, sia correlata con l'esposizione a segnali chimici prodotti dai copepodi che svolgono il ruolo di 'proxy', importanti per la percezione della densità dei copepodi che può essere estremamente variabile nella colonna d'acqua sia in termini di spazio che di tempo.

Un'altra considerazione, riportata ancora nel lavoro Lundholm et al. (2018) ma applicabile anche a questo lavoro di tesi, è che nelle colture in cui i copepodi sono alimentati ci si aspetta una maggiore concentrazione di batteri dovuta alla presenza di un maggior numero organismi vitali e reattivi. Una maggiore concentrazione di batteri potrebbe risultare in una più rapida degradazione delle copepodamidi rispetto alle colture di copepodi *starving*.

Ad ogni modo, l'analisi della produzione di acido domoico ha mostrato una totale assenza di questa biotossina nelle cellule algali esaminate. Questo risultato conferma quanto riportato in letteratura, ovvero una esigua e occasionale presenza di acido domoico da parte di specie di *Pseudo-nitzschia* sia da popolazioni naturali dell'Adriatico (Ljubešić et al., 2011; Arapov et al., 2017; Giuliotti, 2021) sia da esperimenti di laboratorio (Pistocchi et al., 2012; Penna et al., 2013).



Alla luce delle informazioni ottenute è quindi possibile ipotizzare che i ceppi adriatici di *Pseudo-nitzschia multistriata*, diversamente dai ceppi tossici della stessa specie isolati da altre aree (Amato et al., 2010; Tenorio et al., 2021) , utilizzino meccanismi di difesa differenti nei confronti dei grazers come, ad esempio, la modifica della lunghezza delle colonie (Bergkvist et al., 2012; Tammilehto et al., 2015; Grebner et al., 2019).

## Capitolo Sesto

### CONCLUSIONI

Questo lavoro di ricerca ha permesso di approfondire le conoscenze sulle relazioni ecologiche tra l'alga potenzialmente tossica *Pseudo-nitzschia multistriata* e specie miste di copepodi, in condizioni controllate. Le informazioni finora ottenute sono rilevanti per comprendere come i segnali prodotti dai grazers possano indirettamente influenzare la crescita della microalga causandole stress che porta alla diminuzione del tasso di crescita e ad alterazioni nella forma delle colonie e delle cellule, ma non alla produzione di acido domoico come meccanismo di difesa.

I risultati ottenuti sembrano confermare quanto noto in letteratura riguardo altre specie del genere *Pseudo-nitzschia*, ossia che i grazers sono in grado di produrre delle molecole segnale, indici della loro presenza, che innescano nelle diatomee risposte sia a livello morfologico che fisiologico. In particolare, i copepodi mantenuti in condizioni di digiuno per un tempo prolungato sono stati quelli che hanno causato le condizioni più stressanti.

I risultati di questo lavoro di tesi, assieme ai dati presenti in letteratura sulle popolazioni di *Pseudo-nitzschia* nel Mare Adriatico, suggeriscono che i ceppi autoctoni non producono acido domoico, neanche in condizioni di stress. Questo conferma quanto riportato da studi precedenti ovvero che, nonostante

la frequente presenza di specie potenzialmente tossiche anche a concentrazioni molto elevate, l'acido domoico viene segnalato a concentrazioni estremamente limitate.

Sarebbe interessante approfondire i risultati ottenuti in questo lavoro di tesi, (i) analizzando la natura chimica di questi segnali, (ii) studiando la modalità di interazione con le cellule algali, i loro recettori e la cascata di segnali che ne deriva e (iii) identificando le differenze in tali risposte tra ceppi tossici e non tossici.

## Bibliografia

- Accoroni, S., Ceci, M., Tartaglione, L., Romagnoli, T., Campanelli, A., Marini, M., Giulietti, S., Dell'Aversano, C. & Totti, C. (2018). Role of temperature and nutrients on the growth and toxin production of *Prorocentrum hoffmannianum* (Dinophyceae) from the Florida Keys. *Harmful Algae*, 80, 140–148.  
<https://doi.org/10.1016/j.hal.2018.11.005>
- Amato, A., Lüdeking, A. & Kooistra, W. H. C. F. (2010). Intracellular domoic acid production in *Pseudo-nitzschia multistriata* isolated from the Gulf of Naples (Tyrrhenian Sea, Italy). *Toxicon*, 55(1), 157–161.  
<https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2009.07.005>
- Arapov, J., Skejić, S., Bužančić, M., Bakrač, A., Vidjak, O., Bojanić, N., Ujević, I. & Ninčević-Gladan, Ž. (2017). Taxonomical diversity of *Pseudo-nitzschia* from the Central Adriatic Sea. *Phycological Research*, 65(4), 280–290.  
<https://doi.org/10.1111/pre.12184>
- Arapov, J., Bužančić, M., Penna, A., Casabianca, S., Capellacci, S., Andreoni, F., Skejić, S., Bakrač, A., Straka, M., Mandić, J. & Ninčević-Gladan, Ž. (2020a). High proliferation of *Pseudo-nitzschia* cf. *arenysensis* in the Adriatic Sea: ecological and morphological characterisation. *Mediterranean Marine Science*, 21(3), 759–774.  
<https://doi.org/10.12681/mms.22932>
- Arapov, J., Bužančić, M., Skejić, S., Mandić, J., Bakrač, A., Straka, M. & Ninčević-Gladan, Ž. (2020b). Phytoplankton dynamics in the middle Adriatic estuary, with a focus on the potentially toxic genus *Pseudo-nitzschia*. *Journal of Marine Science and Engineering*, 8(8). <https://doi.org/10.3390/JMSE8080608>
- Arapov, J., Ujević, I., Straka, M., Skejić, S., Bužančić, M., Bakrač, A. & Ninčević-Gladan, Ž. (2020c). First evidence of domoic acid production in *Pseudo-nitzschia calliantha* cultures from the central Adriatic Sea. *Acta Adriatica*, 61(2), 135–144.
- Bates, S.S., Opher Bolch, C., Garrison, D.L. & Horner, R.A. (1998). Bloom dynamics and physiology of Domoic-Acid-producing *Pseudo-nitzschia* species. *Physiological Ecology of Harmful Algal Blooms*, 267–292.

- Bergkvist, J., Thor, P., Jakobsen, H. H., Wängberg, S.Å. & Selander, E. (2012). Grazer-induced chain length plasticity reduces grazing risk in a marine diatom. *Limnology and Oceanography*, 57(1), 318–324. <https://doi.org/10.4319/lo.2012.57.1.0318>
- Ciminiello, P., Dell’Aversano, C., Fattorusso, E., Forino, M., Magno, G.S., Tartaglione, L., Quilliam, M.A., Tubaro, A. & Poletti, R. (2005). Hydrophilic interaction liquid chromatography/mass spectrometry for determination of domoic acid in Adriatic shellfish. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 19(14), 2030–2038. <https://doi.org/10.1002/rcm.2021>
- Ephane, S., Barre, L., Bates, S.S. & Quilliam, M.A. (2014). Outstanding Marine Molecules: Chemistry, Biology, Analysis. *Outstanding Marine Molecules: Chemistry, Biology, Analysis*, 189–215.
- Fanelli, E., Menicucci, S., Malavolti, S., de Felice, A. & Leonori, I. (2022). Spatial changes in community composition and food web structure of mesozooplankton across the Adriatic basin (Mediterranean Sea). *Biogeosciences*, 19(6), 1833–1851. <https://doi.org/10.5194/bg-19-1833-2022>
- Fritz, L., Quilliam M.A., Wright J.L.C., Beale A.M., & Work T.M. (1992). An outbreak of domoic acid poisoning attributed to the pennate diatom *Pseudo-nitzschia australis*. *Journal of Phycology*, 28, 439–442.
- Giulietti S. (2021). Unveiling the hidden biodiversity of potentially toxic diatoms in the NW Adriatic Sea through integrated taxonomy approach. *PhD Thesis, Università Politecnica delle Marche*.
- Giulietti, S., Romagnoli, T., Campanelli, A., Totti, C. & Accoroni, S. (2021). Ecology and seasonality of *Pseudo-nitzschia* species (Bacillariophyceae) in the northwestern Adriatic Sea over a 30-year period (1988-2020). *Mediterranean Marine Science*, 22(3), 505–520. <https://doi.org/10.12681/mms.26021>
- Graham, L.E., Graham, J.M., Wilcox, L.W. & Cook, M.E. (2016). *Algae 3rd edition*. *LJLM Press*.
- Granéli, E., Weberg, M. & Salomon, P.S. (2008). Harmful algal blooms of allelopathic microalgal species: The role of eutrophication. *Harmful Algae*, 8(1), 94–102. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2008.08.011>

- Grebner, W., Berglund, E. C., Berggren, F., Eklund, J., Harðadóttir, S., Andersson, M.X., & Selander, E. (2019). Induction of defensive traits in marine plankton—new copepodamide structures. *Limnology and Oceanography*, *64*(2), 820–831. <https://doi.org/10.1002/lno.11077>
- Haroardóttir, S., Wohlrab, S., Hjort, D. M., Krock, B., Nielsen, T.G., John, U. & Lundholm, N. (2019). Transcriptomic responses to grazing reveal the metabolic pathway leading to the biosynthesis of domoic acid and highlight different defense strategies in diatoms. *BMC Molecular Biology*, *20*(1). <https://doi.org/10.1186/s12867-019-0124-0>
- Huntley, M., Sykes, P., Rohan, S. & Marin, V. (1986). Chemically mediated rejection of dinoflagellate prey by the copepods *Calanus pacificus* and *Paracalanus parvus*: mechanism, occurrence and significance. *Marine Ecology Progress Series*, *28*, 105–120.
- Ianora, A., & Miralto, A. (2010). Toxigenic effects of diatoms on grazers, phytoplankton and other microbes: A review. *Ecotoxicology*, *19*(3), 493–511. <https://doi.org/10.1007/s10646-009-0434-y>
- Khodami, S., McArthur, J. V., Blanco-Bercial, L. & Martinez Arbizu, P. (2017). Molecular phylogeny and revision of Copepod orders (Crustacea: Copepoda). *Scientific Reports*, *7*(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-017-06656-4>
- Lauritano, C., Borra, M., Carotenuto, Y., Biffali, E., Miralto, A., Procaccini, G. & Ianora, A. (2011). Molecular evidence of the toxic effects of diatom diets on gene expression patterns in copepods. *PLoS ONE*, *6*(10). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0026850>
- Lefebvre, K. A., Frame, E. R., & Kendrick, P. S. (2012). Domoic acid and fish behavior: A review. *Harmful Algae* *13*, 126–130. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2011.09.011>
- Lefebvre K.A., Dovel S.L. & Silver M.W. (2001). Tissue distribution and neurotoxic effects of domoic acid in a prominent vector species, the northern anchovy *Engraulis mordax*. *Marine Biology*, *138*, 693–700.
- Ljubešić, Z., Bosak, S., Viličić, D., Borojević, K. K., Marić, D., Godrijan, J., Ujević, I., Peharec, P., & Dakovac, T. (2011). Ecology and taxonomy of potentially toxic

*Pseudo-nitzschia* species in Lim Bay (north-eastern Adriatic Sea). *Harmful Algae*, 10(6), 713–722. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2011.06.002>

Lundholm, N., Daugbjerg, N., & Moestrup, Ø. (2002). Phylogeny of the Bacillariaceae with emphasis on the genus *Pseudo-nitzschia* (Bacillariophyceae) based on partial LSU rDNA. *European Journal of Phycology*, 37(1), 115–134. <https://doi.org/10.1017/S096702620100347X>

Lundholm, N., Krock, B., John, U., Skov, J., Cheng, J., Pančić, M., Wohlrab, S., Rigby, K., Nielsen, T. G., Selander, E., & Harðardóttir, S. (2018). Induction of domoic acid production in diatoms—Types of grazers and diatoms are important. *Harmful Algae*, 79, 64–73. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2018.06.005>

Md Amin, R., Koski, M., Båmstedt, U. & Vidoudez, C. (2011). Strain-related physiological and behavioral effects of *Skeletonema marinoi* on three common planktonic copepods. *Marine Biology*, 158(9), 1965–1980. <https://doi.org/10.1007/s00227-011-1706-7>

Menden-Deuer, S. & Lessard, E.J. (2000). Carbon to volume relationships for dinoflagellates, diatoms, and other protist plankton. *Limnology and Oceanography*, 45(3), 569-579.

Mos, L. (2001). Domoic acid: A fascinating marine toxin. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 9(3), 79–85. [https://doi.org/10.1016/S1382-6689\(00\)00065-X](https://doi.org/10.1016/S1382-6689(00)00065-X)

Pančić, M., Torres, R.R., Almeda, R., & Kiørboe, T. (2019). Silicified cell walls as a defensive trait in diatoms. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 286, 20190184. <https://doi.org/10.1098/rspb.2019.0184>

Penna, A., Casabianca, S., Perini, F., Bastianini, M., Riccardi, E., Pigozzi, S. & Scardi, M. (2013). Toxic *Pseudo-nitzschia* spp. in the northwestern Adriatic Sea: Characterization of species composition by genetic and molecular quantitative analyses. *Journal of Plankton Research*, 35(2), 352–366. <https://doi.org/10.1093/plankt/fbs093>

Petrucciani, A., Chaerle, P. & Norici, A. (2022). Diatoms versus copepods: could frustule traits have a role in avoiding predation? *Frontiers in Marine Science*, 8. <https://doi.org/10.3389/fmars.2021.804960>

- Pichierri, S., Pezzolesi, L., Vanucci, S., Totti, C. & Pistocchi, R. (2016). Inhibitory effect of polyunsaturated aldehydes (PUAs) on the growth of the toxic benthic dinoflagellate *Ostreopsis cf. ovata*. *Aquatic Toxicology*, *179*, 125–133. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2016.08.018>
- Pistocchi, R., Guerrini, F., Pezzolesi, L., Riccardi, M., Vanucci, S., Ciminiello, P., Dell'Aversano, C., Forino, M., Fattorusso, E., Tartaglione, L., Milandri, A., Pompei, M., Cangini, M., Pigozzi, S. & Riccardi, E. (2012). Toxin levels and profiles in microalgae from the North-Western Adriatic Sea - 15 Years of studies on cultured species. *Marine Drugs*, *10*(1), 140–162. <https://doi.org/10.3390/md10010140>
- Pohnert, G. (2000). Wound-activated chemical defense in unicellular planktonic algae. *Angewandte Chemie International Edition*, *39*, 23. [https://doi.org/10.1002/1521-3773\(20001201\)39:23<4352:AID-ANIE4352>3.0.CO;2-U](https://doi.org/10.1002/1521-3773(20001201)39:23<4352:AID-ANIE4352>3.0.CO;2-U)
- Pondaven, P., Gallinari, M., Chollet, S., Bucciarelli, E., Sarthou, G., Schultes, S. & Jean, F. (2007). Grazing-induced changes in cell wall silicification in a marine diatom. *Protist*, *158*(1), 21–28. <https://doi.org/10.1016/j.protis.2006.09.002>
- Schnetzer, A. & Steinberg, D. K. (2002). Natural diets of vertically migrating zooplankton in the Sargasso Sea. *Marine Biology*, *141*(1), 89–99. <https://doi.org/10.1007/s00227-002-0815-8>
- Scholin, C.A., Gulland, F., Doucette, G. J., Benson, S., Busman, M., Chavez, F. P., Cordaro, J., DeLong, R., De Vogelaere, A., Harvey, J., Haulena, M., Lefebvre, K., Lipscomb, T., Loscutoff, S., Lowenstine, L. J., Marin III, R., Miller, P. E., McLellan, W. A., Moeller, P. D. R., Powell, C. L., Rowles, T., Silvagni, P., Silver, M., Sparker, T., Trainer, V., Van Dolah, F. M. (2000). Mortality of sea lions along the central California coast linked to a toxic diatom bloom. *Nature*, *403*, 80–84.
- Selander, E., Fagerberg, T., Wohlra, S., & Paviae, H. (2012). Fight and flight in dinoflagellates? Kinetics of simultaneous grazer-induced responses in *Alexandrium tamarense*. *Limnology and Oceanography*, *57*(1), 58–64. <https://doi.org/10.4319/lo.2012.57.1.0058>
- Selander, E., Kubanek, J., Hamberg, M., Andersson, M.X., Cervin, G. & Pavia, H. (2015). Predator lipids induce paralytic shellfish toxins in bloom-forming algae. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *112*(20), 6395–6400. <https://doi.org/10.1073/pnas.1420154112>



- Tammilehto, A., Nielsen, T. G., Krock, B., Møller, E. F., & Lundholm, N. (2015). Induction of domoic acid production in the toxic diatom *Pseudo-nitzschia seriata* by calanoid copepods. *Aquatic Toxicology*, *159*, 52–61. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2014.11.026>
- Tenorio, C., Álvarez, G., Quijano-Scheggia, S., Perez-Alania, M., Arakaki, N., Araya, M., Álvarez, F., Blanco, J. & Uribe, E. (2021). First report of domoic acid production from *Pseudo-nitzschia multistriata* in Paracas Bay (Peru). *Toxins*, *13*(6), 408. <https://doi.org/10.3390/toxins13060408>
- Thessen, A. E., Dortch, Q., Parsons, M. L. & Morrison, W. (2005). Effect of salinity on *Pseudo-nitzschia* species (Bacillariophyceae) growth and distribution. *Journal of Phycology*, *41*(1), 21–29. <https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.2005.04077.x>
- Todd, E.C.D. (1993). Domoic Acid and Amnesic Shellfish Poisoning - A Review. *Journal of Food Protection*, *56*(I), 69–83. [http://meridian.allenpress.com/jfp/article-pdf/56/1/69/1664397/0362-028x-56\\_1\\_69.pdf](http://meridian.allenpress.com/jfp/article-pdf/56/1/69/1664397/0362-028x-56_1_69.pdf)
- Turk Dermastia, T., Cerino, F., Stanković, D., Francé, J., Ramšak, A., Žnidarič Tušek, M., Beran, A., Natali, V., Cabrini, M. & Mozetič, P. (2020). Ecological time series and integrative taxonomy unveil seasonality and diversity of the toxic diatom *Pseudo-nitzschia* H. Peragallo in the northern Adriatic Sea. *Harmful Algae*, *93*, 101773. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2020.101773>
- van Donk, E., Ianora, A., & Vos, M. (2011). Induced defences in marine and freshwater phytoplankton: A review. *Hydrobiologia*, *668*(1), 3–19. <https://doi.org/10.1007/s10750-010-0395-4>
- Villac, M.C., Roelke, D.L., Villareal, T.A., & Fryxell, G.A. (1993). Comparison of two domoic acid-producing diatoms: a review. *Hydrobiologia*, *269*, 213-224