

Nota breve – Short note

Il Sottoprogetto 6 (Ecofisiologia del *Gs in situ* mediante mesocosmi) del Progetto SALTO/BEST: sintesi e conclusioni

Daniel SPITALE^{1*}, Fernando DINI², Graziano GUELLA³, Francesco GHETTI⁴, Massimiliano TARDIO¹ & Marco CANTONATI¹

¹Sezione di Limnologia e Algologia, Museo Tridentino di Scienze Naturali (MTSN), Via Calepina 14, I-38100 Trento

²Dipartimento di Etologia, Ecologia ed Evoluzione, Università di Pisa, Via A. Volta 8, I-56126 Pisa

³Laboratorio di Bioorganica, Dipartimento di Fisica, Università di Trento, Via Sommarive 14, I-38150 Trento

⁴CNR Istituto di Biofisica, Via G. Moruzzi 1, I-56100 Pisa

*E-mail dell'Autore per la corrispondenza: spitale@mtsn.tn.it

SUMMARY - Work package 6 (Ecophysiology of *Gs* in situ by means of enclosures) of the SALTO/BEST: Summary and conclusions - This contribution reports the summary and conclusions of WP6 SALTO project. The Project framework of this work package consists in the study of dinoflagellate ecophysiology by means of enclosures. Phosphorus was confirmed to be the main nutrient limiting phytoplankton, as well as the the *Gs*-green-*Gs*-red production in Lake Tovel. Competition among the main phytoplankton taxa shows that different environmental factors (temperature, silica concentration) are important in promoting dinoflagellate dominance. Moreover, due to the competitive interactions, the period in which P-enrichments are carried out proved to be fundamental too. Diel vertical migration of *Gs*-green-*Gs*-red and grazing by the rotifer *Gastropus stylifer* were investigated as well. Molecular biology analyses led to the identification of dinoflagellates proliferating in the enclosures. The dominant *Gs*-green contained very low amounts of astaxanthin, but the axenic culture of *Gs*-red revealed the presence of a peculiar carotenoid pattern, very different from that of the green form. Besides this main research topics, other issues were investigated, e.g. DOC profiles, photosynthetic efficiency (PAM), experiments under varying UV conditions and secondary metabolites (other than carotenoids) like glactolipids and MAAs.

Parole chiave: *Glenodinium sanguineum*, *Baldinia anauniensis*, Lago di Tovel, enclosures, ecofisiologia, caratterizzazione genetica, metaboliti secondari, fotobiologia, DOC, SALTO (WP6)

Key words: *Glenodinium sanguineum*, *Baldinia anauniensis*, Lago di Tovel, enclosures, ecophysiology, genetic characterization, secondary metabolites, photobiology, DOC, SALTO (WP6)

Per avere una prima descrizione esauriente del Lago di Tovel e del meccanismo con il quale i dinoflagellati inducevano l'arrossamento occorre tornare indietro nel tempo fino agli anni 1937-41, quando l'illustre idrobiologo Edgardo Baldi dell'Università di Milano, in collaborazione con il Museo di Storia Naturale di Trento svolse alcune campagne di studi limnologici. Secondo Baldi (1941) il fenomeno si produceva solo in corrispondenza di giornate estive tranquille e serene nel golfo sud-occidentale del lago in vicinanza delle rive. Accurate indagini rivelarono però che il glenodinio era distribuito nell'intera massa d'acqua lacustre sia negli strati d'acqua superficiali che in quelli profondi. L'arrossamento del golfo si sarebbe manifestato grazie al trasporto pas-

sivo di grandi quantità di glenodini convogliati dalla brezza che spira lungo l'asse NE-SO dal mattino alle prime ore pomeridiane. Dopo una prima insolazione del golfo comparivano delle chiazze rossastre che si innalzavano verso la superficie con frange intensamente colorate. La densità algale di queste frange poteva raggiungere i 3-4 milioni di individui per litro. Il convogliamento passivo orizzontale sarebbe stato reso possibile dalla migrazione verticale diurna dei glenodini grazie al loro fototattismo positivo. Inoltre, la maggior estensione e accentuazione del fenomeno era in corrispondenza del maggior surriscaldamento delle acque superficiali. La relativa regolarità dell'arrossamento descritta da Baldi (1941) e Marchesoni (1959) si interruppe con l'estate del

1965 e da quel momento numerose spiegazioni più o meno scientifiche si susseguirono fino ai giorni nostri.

Nel 2000 la Provincia Autonoma di Trento ha istituito un fondo per sostenere progetti di ricerca in settori rilevanti per il Trentino. Per quanto riguarda il comparto ambientale, le istituzioni di ricerca trentine hanno individuato come prioritario lo studio del Lago di Tovel, sia per fornire una risposta definitiva alle svariate ipotesi avanzate circa le cause della scomparsa del fenomeno dell'arrossamento, che per rafforzare significativamente la loro capacità operativa in campo ambientale. A partire dal 2001 il progetto SALTO, suddiviso in sei sottoprogetti, ha avuto il compito di chiarire le cause del mancato arrossamento delle acque del lago.

Per quanto riguarda il WP 6, l'obiettivo preposto all'inizio del programma triennale, era lo studio *in situ*, per mezzo di esperimenti condotti in *enclosures* (mesocosmi), di alcuni aspetti fondamentali del ciclo vitale e dei movimenti fototattici di '*Glenodinium sanguineum*' (*Gs*) e dell'ecofisiologia dell'arrossamento. Tramite l'aggiunta di fosfato si intendeva indurre la proliferazione del *Gs* in ambiente controllato, in modo da poter rendere disponibile per il progetto "materiale biologico" altamente concentrato e praticamente unialgale. Partendo da questi aggregati si rendeva potenzialmente possibile avviare delle colture unialgali distinguendo le varie fasi del ciclo biologico. Nel corso del triennio la conoscenza riguardo il '*G. sanguineum*' è andata accrescendosi (vedi contributo del WP 5) fino a permettere la distinzione specifica (con analisi genetiche e ultrastrutturali) della forma verde, descritta ora col nome di *Baldinia anauniensis* sp. inedit. e della forma rossa *Tovellia sanguinea* gen. inedit. sp. inedit.

Le ricerche svolte al Lago di Tovel in questi tre anni utilizzando la tecnica sperimentale dei mesocosmi ha consentito di individuare i fattori abiotici e biotici che regolano la dinamica di successione e la dominanza delle dinoflagellate, la loro identità, i loro metaboliti secondari e alcune caratteristiche dell'ecofisiologia. Di seguito si elencano le conclusioni principali alle quali si è giunti.

Si sono verificate dal punto di vista sperimentale, confermandole, le indicazioni che davano per oligotrofo il Lago di Tovel. Con la tecnica degli *enclosures* è stato possibile approfondire l'effetto degli arricchimenti con fosforo e il ruolo delle condizioni meteorologiche nel determinare la fioritura della dinoflagellata *Gs* (Cantonati *et al.* 2003). L'aggiunta di fosfato genera una proliferazione della comunità algale in cui la specie dominante dipende da interazioni competitive interspecifiche regolate da caratteristiche intrinseche delle specie e da fattori ambientali. Il nutriente azoto non è limitante nel Lago di Tovel, ma in condizioni sperimentali di arricchimen-

to con fosforo e la successiva proliferazione algale i nitrati possono diventare limitanti in particolar modo per il '*G. sanguineum*'. È risultata positiva, infatti, l'aggiunta di entrambi i nutrienti in conseguenza della prima fioritura indotta dal solo fosforo. Altro parametro chiave nel determinare la dominanza del *Gs* è la luce unita alla temperatura dell'acqua: infatti, soltanto in caso di giornate serene e in conseguenza dell'arricchimento con fosforo è più probabile che la dinoflagellata diventi dominante. Per approfondire il ruolo della luce nei meccanismi di competizione sono stati progettati ed eseguiti esperimenti specifici che hanno previsto la copertura degli *enclosures* per ridurre l'intensità di luce di circa il 60% (Tardio *et al.* 2003). In condizioni di irraggiamento ridotto e in conseguenza dell'arricchimento con fosforo non è il glenodinio a proliferare e diventare dominante, ma piuttosto un'altra dinoflagellata, il *Gymnodinium uberrimum*. Anche *Campylomonas* sp. è in grado di proliferare nelle stesse condizioni probabilmente grazie alle sue caratteristiche mixotrofiche comuni tra le criptofitee.

Coerentemente con la letteratura scientifica riguardante le fioriture di altre specie di dinoflagellate (per esempio in *Gymnodinium sanguineum*, Doucette & Harrison, 1990), si è verificata sperimentalmente la risposta del fitoplancton estivo del Lago di Tovel all'arricchimento con i micronutrienti selenio (selenato) e ferro. Il disegno sperimentale ha previsto l'utilizzo di piccoli mesocosmi in cui valutare l'effetto delle diverse combinazioni di questi due micronutrienti anche in abbinamento con il fosforo (Spitale *et al.* 2003). I biovolumi algali sono generalmente aumentati nei mesocosmi in cui vi è stata l'immissione di fosforo solo o nelle diverse combinazioni con Se e Fe. L'aggiunta del solo Se non ha indotto variazioni significative né dei biovolumi algali totali né per quanto riguarda singole specie. Una risposta simile è stata ottenuta utilizzando il Fe: i biovolumi sono simili al controllo tranne che per il '*G. sanguineum*' e la diatomea *Fragilaria tenera*. In conclusione, sembra che il selenio non sia un elemento limitante nelle acque del Lago di Tovel, ma che anzi agisca come antagonista dell'assimilazione del fosforo. Anche il ferro non è limitante, ma vi sono delle indicazioni che suggeriscono che in abbinamento al fosforo produca una proliferazione algale maggiore rispetto al solo fosforo.

Nel corso del triennio di studi in *enclosures* è stato possibile anche approfondire il tema della competizione tra la dinoflagellata *Gs* e la diatomea *F. tenera* (Spitale *et al.* 2005). Negli ultimi decenni, infatti, i ricercatori hanno sempre rinvenuto questa fragilariacea nel fitoplancton del Lago di Tovel a partire dalla primavera fino all'autunno. Spesso in acqua libera essa costituisce la specie algale dominante e solo nel periodo estivo è codominante con *Gs*. Partendo da

queste osservazioni si sono progettati alcuni esperimenti per valutare il ruolo del meccanismo di interazione competitiva nel determinare la dominanza dell'una o dell'altra specie. Una rivalutazione dei risultati ottenuti a partire dal 2000 ha consentito di comprendere la dinamica di proliferazione di questi due taxa algali in conseguenza dell'arricchimento con fosforo. Il nutriente aggiunto alla comunità fitoplanctonica dominata dalla diatomea ne induce una ulteriore proliferazione, con la conseguente bio-riduzione di silice (utilizzata per la costruzione dei frustoli). Quando la silice diventa limitante per la diatomea (circa 0,12-0,15 mg l⁻¹), la dinoflagellata si trova in condizioni favorevoli per la proliferazione se le condizioni ambientali sono idonee (con temperature medie della colonna d'acqua superiori ai 12 °C). Anche nel caso di una codominanza tra '*G. sanguineum*' e *F. tenera* l'arricchimento con fosforo favorisce la diatomea che ha una miglior efficienza di assimilazione del nutriente grazie all'alto rapporto superficie/volume. Infine, per valutare se il '*G. sanguineum*' era in grado di competere e dominare si è progettato un esperimento *ad hoc* che ha previsto l'aggiunta di fosforo nel momento in cui nell'acqua libera era già dominante la dinoflagellata. In queste condizioni di partenza favorevoli, *Gs* ha raggiunto densità di circa 3-4 milioni di individui per litro, che sono valori del tutto simili a quelli riportati da Baldi negli anni dell'arrossamento. L'acqua, però, non appariva ancora rossa, ma soltanto blandamente ramata. La spiegazione è arrivata l'anno successivo grazie al lavoro del WP 5, che ha stabilito che la specie "verde" non era uno stadio fisiologico di *Gs* che da verde poteva anche diventare rosso (e viceversa), ma una specie distinta ora denominata *Baldinia anauniensis*. L'attenzione dovrà quindi ora necessariamente spostarsi sui meccanismi di competizione tra le due specie neo-descritte *B. anauniensis* e *Tovellia sanguinea* e la diatomea *F. tenera*.

Una parte della campagna sperimentale del 2003 è stata pianificata per approfondire il ruolo del *grazing* da parte dello zooplancton sul fitoplancton. È noto, infatti, come l'azione di predazione selettiva da parte dello zooplancton sia in grado di modificare la successione stagionale dei popolamenti algali. L'applicazione di un retino a maglie fini (50 µm) alla base di un *enclosure* ha consentito di abbattere la densità della comunità zooplanctonica e di seguire l'evoluzione del fitoplancton. I biovolumi algali sono conseguentemente aumentati e il *Gs* ha raggiunto densità significativamente maggiori rispetto all'*enclosure* senza retino. Approfondendo lo studio della dinamica dei vari popolamenti, si è notato inoltre come il rotifero *Gastropus stylifer* sia in grado di predare selettivamente *Gs*; nello stomaco del rotifero, infatti, si sono osservate distintamente e di frequente le cellule del dinoflagellato. Le indicazioni tratte da

questa linea di ricerca, sebbene interessanti, non sono da considerarsi conclusive e meriterebbero ulteriori approfondimenti.

Per confermare la validità dell'ipotesi che il '*G. sanguineum*' fosse in grado di compiere la migrazione verticale, nel 2003 è stata pianificata una serie di esperimenti con l'obiettivo di approfondire questa caratteristica della dinoflagellata. Dalla letteratura è noto infatti che il fototattismo positivo posseduto da queste alghe consente loro di migrare con dei ritmi circadiani. La *diel vertical migration* (DVM) permette alle cellule di dinoflagellata di poter sfruttare la luce degli strati superficiali durante il giorno e di migrare più in profondità di notte per avere accesso alle riserve di nutrienti che ivi si trovano a concentrazioni maggiori. Un particolare *enclosure* a forma di tubo, da cui longitudinalmente e a distanze regolari si effettuavano i prelievi (Tardio *et al.* 2005), ha consentito di seguire con precisione la dinamica di migrazione del *Gs*: con una velocità di circa 1 cm min⁻¹ le cellule all'alba raggiungono massicciamente lo strato superficiale (-35 cm); permangono a questo livello fino alle ore 16.00 quando iniziano la discesa; dalle 18.00 alle 24.00 si distribuiscono pressoché uniformemente nella colonna d'acqua; nella notte la densità maggiore è in profondità fino all'alba dove si assiste alla risalita.

Nell'ottica di valutare la correttezza di alcune delle teorie proposte in passato in merito alla spiegazione del fenomeno dell'arrossamento, nel 2003 si sono progettati alcuni esperimenti per accertare la migrazione orizzontale passiva della dinoflagellata indotta dal trasporto della brezza che spira regolarmente dalla tarda mattinata al pomeriggio lungo l'asse NO-SE. Dopo aver marcato con un colorante vitale un grosso quantitativo di glenodini, questi sono stati distribuiti in maniera uniforme lungo un transetto trasversale al lato nord della Baia Rossa. A distanze e a intervalli di tempo regolari, per mezzo di un retino da fitoplancton, si sono effettuati dei campionamenti per verificare il trasporto orizzontale. Sebbene questo esperimento necessiti di ulteriori conferme, i risultati ottenuti confermano l'esistenza del trasporto passivo di glenodini operato dalla brezza.

Accanto all'approccio prettamente ecologico degli esperimenti in campo effettuati dai ricercatori del MTSN e coerentemente con gli obiettivi iniziali del progetto, si è effettuata una caratterizzazione genetica della comunità a dinoflagellati. I marcatori genetici scelti per l'identificazione delle specie (gene per l'rRNA 18S, regione ITS e gene per l'rRNA 24S) sono stati sottoposti ad amplificazione tramite la tecnica della PCR e successivamente clonati e sequenziati. Le sequenze sono poi state comparate con quelle per gli stessi tipi di geni già disponibili per altri dinoflagellati, allineate e utilizzate per la costruzione di alberi filogenetici. Oltre ai risultati ottenuti per altri

dinoflagellati (per es. il *Gymnodinium* sp.), interessante è notare che la sequenza del gene per l'rRNA 18S (ottenuta da cellule singolarmente isolate e che corrispondono alla descrizione morfologica fatta per la specie *G. sanguineum*) si posiziona, nell'albero filogenetico, in un gruppo nuovo. Dal momento che fino ad oggi in "bancadati" non è stata depositata la sequenza del gene per l'rRNA 18S di *Gs*, la sequenza ottenuta corrisponde molto probabilmente a quella dell'organismo responsabile dell'arrossamento del lago. In tale gruppo si posizionano anche le sequenze di quattro dei nove cloni relativi alla comunità organica del lago (Cloni B, D, G e H), suggerendo che esse appartengano a taxa filogeneticamente affini a '*G. sanguineum*'. La stretta associazione esistente tra le sequenze di questo gruppo è anche confermata dall'analisi comparativa delle loro strutture secondarie, che, nonostante l'elevato numero di differenze nucleotidiche, tuttavia non ha evidenziato modifiche strutturali rilevanti.

Con l'obiettivo di valutare la fondatezza di alcune ipotesi riguardo la possibilità di interscambio tra la forma verde e la forma rossa del '*G. sanguineum*' in conseguenza di vari tipi di stress, si sono pianificati una serie di esperimenti. La letteratura a riguardo fa riferimento ad altre specie algali in grado di produrre pigmenti in seguito a elevati irraggiamenti luminosi (in particolare la componente UVB) eventualmente in combinazione con scarsa disponibilità di azoto. Nessuno di questi esperimenti ha però indotto variazioni significative nei contenuti di carotenoidi (in modo particolare dell'astaxantina).

La misura *in vivo* della fluorescenza della clorofilla è una tecnica utile per lo studio del funzionamento dell'apparato fotosintetico. Il parametro $F_v/F_m = (F_m - F_0)/F_m$ rappresenta il rendimento quantico ottimale della fotosintesi (*Photosynthetic Optimal Quantum Yield*) utilizzato come indicatore di stress dell'apparato fotosintetico. I valori misurati all'interno dei vari *enclosures* e all'esterno sono relativi a tutti gli organismi vegetali presenti. Non si sono evidenziate significative differenze di (F_v/F_m) tra gli *enclosures* e il lago. In tutte le condizioni sperimentali si è notato un progressivo aumento del valore di (F_v/F_m) con il passare dei giorni di campionamento, il che è dovuto probabilmente al progressivo utilizzo del fosforo da parte degli organismi fotosintetici per l'arricchimento degli *enclosures* B, C e D.

Per la prima volta nelle acque del Lago di Tovel è stata effettuata la misura del carbonio organico disciolto (DOC). L'andamento dei valori di DOC, nei vari *enclosures* e nel lago, mostra una situazione piuttosto stabile nel periodo di tempo del campionamento e è coerente con quanto si poteva prevedere in un lago oligotrofo d'alta montagna. Si sono registrate quantità variabili tra 66,5 e 92,9 mM.

Un'altra importante linea di ricerca è stata lo

studio dei pigmenti e di altri metaboliti secondari prodotti dai dinoflagellati di Tovel, ponendo particolare attenzione alla rilevazione quali- e quantitativa dei carotenoidi nonché di altre classi biogenetiche come i lipidi. Sui carotenoidi della specie responsabile dell'arrossamento le sole conoscenze derivanti dalla letteratura si riferiscono a una serie di lavori di Gerosa (1961, 1966), il quale stabilì che il pigmento più abbondante nelle acque del lago era l'astaxantina. I campioni analizzati nell'estate 2001 (provenienti da aggregati ottenuti in *enclosures*) erano costituiti principalmente dai cosiddetti *Gs-green*, i quali, dopo analisi mediante cromatografia su strato sottile, dimostravano di possedere quantità di astaxantina quasi trascurabili; i pigmenti principali, oltre il β -carotene e la clorofilla *a*, erano la clorofilla *c2* e la peridinina, considerati *marker* dei dinoflagellati. Particolare degno di nota è invece che i pigmenti principali dell'estratto dalle cisti contengono una quantità di astaxantina ben più abbondante rispetto a *Gs-green* (Frassanito *et al.* 2005). Per quanto riguarda i composti galattolipidici (costituenti fondamentali della membrana dei tilacoidi) l'estrazione delle cellule di *Gs-green* ha portato all'isolamento di due frazioni (attraverso misure NMR), i Monogalattosil-Diacil-Gliceroli (MGDG) e i DiGalattosil-Diacil-Gliceroli (DGDG) con un rapporto di massa pari a ≈ 2 . Di queste classi di composti è stata studiata la struttura mediante misure di spettrometria di massa (*full scan*) e di frammentazione controllata (Guella *et al.* 2003). Tra gli altri metaboliti secondari è stato possibile riconoscere gli amminoacidi *micosporine-like* (MAAs), che sono sostanze fotoprotettive solubili in acqua. Un notevole passo in avanti è derivato poi dalle colture axeniche di *Gs-red* dalle quali, tramite metodo *on-line*, è stato studiato l'estratto: tra i pigmenti principali di questo dinoflagellato non c'è quello usato come marker tassonomico del gruppo, la peridinina, ma piuttosto l'astaxantina e alcuni suoi esteri alchilici a lunga catena le cui strutture sono ancora in corso di definizione.

In conclusione, si può affermare che il nutriente fosforo è il fattore chiave nel promuovere la fioritura delle dinoflagellate, ma certamente non l'unico. Infatti, perché si verifichi la loro proliferazione sono necessarie buone condizioni di illuminazione (temperatura) e rapporti competitivi favorevoli (specialmente nei confronti delle diatomee). Inoltre, la recente scoperta che la forma rossa e verde rappresentano specie diverse suggerisce la potenziale importanza delle interazioni competitive tra le specie trattate finora formalmente come *Glenodinium sanguineum sensu lato*. La metodologia di studio in strutture confinate (*enclosures*), che si è confermata idonea per questo tipo di studio ecologico, potrebbe in prospettiva rivelarsi utile nello studio sul campo delle interazioni competitive tra *T. sanguinea* e *B. anauniensis*.

BIBLIOGRAFIA

- Baldi E., 1941 - Ricerche idrobiologiche sul Lago di Tovel. *Mem. Museo St. Nat. Ven. Trid.*, 6:1-297.
- Cantonati M., Tardio M., Tolotti M. & Corradini F., 2003 - Blooms of the dinoflagellate *Glenodinium sanguineum* obtained during enclosure experiments in Lake Tovel (N. Italy). *J. Limnol.*, 62 (1): 79-87.
- Doucette G.J. & Harrison P.J., 1990 - Some effects of iron and nitrogen stress on the red tide dinoflagellate *Gymnodinium sanguineum*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 62: 293-306.
- Frassanito R., Cantonati M., Tardio M., Mancini I. & Guella G., 2005 - On-line identification of secondary metabolites in freshwater microalgae and cyanobacteria by combined liquid chromatography-photodiode array detection-mass spectrometric techniques. *J. Chrom. A*, 1082: 33-42.
- Gerosa V., 1961 - La natura chimica delle sostanze che provocano l'arrossamento del lago di Tovel. *Studi Trent. Sci. Nat.*, 38: 173-181.
- Gerosa V., 1966 - La natura chimica delle sostanze che provocano l'arrossamento del lago di Tovel. *Studi Trent. Sci. Nat.*, 13: 145-158.
- Guella G., Frassanito R. & Mancini I., 2003 - A new solution for an old problem: the regiochemical distribution of the acyl chains in galactolipids can be established by electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Rap. Comm. Mass. Spec.*, 17: 1982-1994.
- Marchesoni V., 1959 - L'arrossamento del Lago di Tovel. *Natura Alpina*, 3: 1-9.
- Spitale D., Cantonati M. & Tardio M., 2004 - Effetti sui popolamenti fitoplanctonici del Lago di Tovel (Trentino) di arricchimenti con macro- e micronutrienti in strutture confinate. *Studi Trent. Sci. Nat., Acta Biol.*, 80: 201-207.
- Spitale D., Tardio M. & Cantonati M., 2005 - Competition between a planktonic diatom and a dinoflagellate during enclosure experiments in a mountain lake. *Phycologia*, 44 (3): 320-327.
- Tardio M., Tolotti M., Novarino G. & Cantonati M., 2003 - Ecological and taxonomic observations on the flagellate algae characterising four years of enclosure experiments in Lake Tovel (Southern Alps). *Hydrobiologia*, 502: 285-296.
- Tardio M., Spitale D. & Cantonati M., 2005 - Vertical migration of a dinoflagellate in a column-shaped enclosure in Lake Tovel (Adamello-Brenta Natural Park, Italian Alps). *Verh. Internat. Verein. Limnol.*, 29: 143-146.

