



Facultat de Ciències

Memòria del Treball Final de Grau

## **Títol del treball:**

**Estandardització de tècniques de mostreig i estimació de les concentracions de microalgues bentòniques: Aplicació en l'estudi de la dinoflagel·lada *Ostreopsis*.**

---

Estudiant: **Soraya Hernández Llamas**

Grau en **Biologia**

## **ÍNDEX**

<b>RESUM.....</b>	<b>2</b>
<b>INTRODUCCIÓ.....</b>	<b>5</b>
<b>METODOLOGIA.....</b>	<b>8</b>
1. Zona d'estudi.....	8
2. Protocols de mostreig.....	9
3. Recòmptes.....	12
4. Anàlisi de dades.....	14
<b>RESULTATS.....</b>	<b>15</b>
1. Evolució temporal de la proliferació d' <i>Ostreopsis</i> segons protocol de l'ICM.....	15
2. Evolució temporal de la proliferació d' <i>Ostreopsis</i> segons protocol de l'M3- HAB.....	16
3. Evolució temporal de la proliferació d' <i>Ostreopsis</i> segons protocol del BEDI.....	19
4. Comparació entre mètodes.....	20
<b>DISCUSSIÓ.....</b>	<b>26</b>
<b>CONCLUSIONS.....</b>	<b>29</b>
<b>BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>30</b>

## RESUM

Les proliferacions de la dinoflagel·lada *Ostreopsis* són un problema emergent en el Mediterrani, on s'han relacionat amb irritacions respiratòries en banyistes i/o habitants de les zones on aquesta microalga creix abundantment. També se l'ha relacionat amb mortalitats massives de macrofauna d'escassa mobilitat (eriçons, estrelles de mar, etc.). En el tròpic, s'ha relacionat amb intoxicacions alimentàries greus, perquè produeix una potent toxina (palitoxina) que es transmet per la xarxa tròfica. Al Mediterrani, fins al moment no s'ha detectat cap cas d'intoxicació alimentària.

Aquesta problemàtica està sent investigada per diversos grups al Mediterrani. Per tal de poder unificar els esforços és important disposar d'eines comunes de mostreig i anàlisi de les dades de camp. La microalga *Ostreopsis* creix preferentment com a epífita sobre macroalgues però també se la troba a l'aigua, formant part del plàncton. Per tant, els estudis requereixen el mostreig dels components bentònic i planctònic de l'ecosistema. L'objectiu del present treball és comparar tres metodologies de mostreig: a) la utilitzada per l'ICM-CSIC des del 2007, que mostra tant la població planctònica d'*Ostreopsis* com l'epífita sobre la macroalga; b) la del projecte M3-HAB, similar a la de l'ICM; i c) un nou mètode, el BEDI que aporta una estimació integrada de la presència integrada d'*Ostreopsis* al bentos i al plàncton. També s'ha analitzat la variabilitat de mostreig espacial i l'error associat als recomptes del microscopi.

Les conclusions principals del treball són:

1. Com que l'error de recompte al microscopi és inversament proporcional al nombre de cèl·lules contades, aquest és més alt quan les abundàncies cel·lulars són baixes. En aquests casos, que corresponen als mostres del principi i final del bloom, i especialment en les mostres d'aigua, caldrà sedimentar 50 mL en les cubetes de sedimentació per a anàlisi microscòpic.
2. No hi ha massa variabilitat espacial quant a les concentracions d'*Ostreopsis* epífit, entre punts separats per uns 10 m, però sí n'hi ha a l'aigua, probablement relacionats amb la circulació de l'aigua.
3. Els mètodes del l'ICM-CSIC i l'M3-HAB donen resultats molt similars. Es pot establir una relació directa per a poder organitzar bases de dades comunes i establir nivells d'alerta similars per a prevenir l'exposició de les persones a les proliferacions d'*Ostreopsis*.
4. El mètode BEDI sembla prometedor per la seva facilitat d'aplicació quan les condicions de la costa ho permeten. Cal esperar els resultats dels altres equips d'investigació de França i Itàlia, per veure si es poden obtenir factors de conversió entre el BEDI i els altres mètodes clàssics. Mentrestant, cal seguir mostrant els components bentònic i planctònic en els hàbitats colonitzats per *Ostreopsis*.

Paraules claus: *Ostreopsis* · toxina · ICM-CSIC · M3-HAB · BEDI · bentos · plàncton

---

Las proliferaciones de la dinoflagelada *Ostreopsis* son un problema emergente en el Mediterráneo, donde se han relacionado con irritaciones respiratorias en los bañistas y/o habitantes de las zonas donde esta microalga crece abundantemente. También se la ha relacionado con mortalidades masivas de macrofauna de escasa movilidad (erizos, estrellas de mar, etc.). En el trópico, se ha relacionado con intoxicaciones alimentarias graves, porque

produce una potente toxina (palitoxina) que se transmite por la cadena trófica. En el Mediterráneo, hasta el momento, no se ha detectado ningún caso de intoxicación alimentaria.

Ésta problemática está siendo investigada por diversos grupos en el Mediterráneo. Para poder unificar los esfuerzos es importante disponer de herramientas comunes de muestreo y análisis de los datos del campo. La microalga *Ostreopsis* crece preferentemente como epífita sobre macroalgas pero también se encuentra en el agua, formando parte del plancton. Por lo tanto, los estudios requieren el muestreo de componentes bentónicos y planctónicos del ecosistema. El objetivo del presente trabajo es comparar tres metodologías de muestreo: a) la utilizada por el ICM-CSIC des del 2007, que muestrea tanto la población planctónica de *Ostreopsis* como epífita sobre macroalga; b) la del proyecto M3-HAB, similar a la del ICM; y c) un nuevo método, el BEDI que aporta una estima integrada de la presencia de *Ostreopsis* en el bentos y en el plancton. También se ha analizado la variabilidad de muestreo espacial y el error asociado en el recuento en el microscopio.

Las conclusiones principales del trabajo son:

1. Como el error de recuento en el microscopio es inversamente proporcional al número de células contadas, éste es más alto cuando las abundancias celulares son bajas. En estos casos, que corresponden a los muestreos de principio y final del bloom, i especialmente en el agua, será necesario sedimentar 50 mL en las cubetas de sedimentación para análisis microscópico.
2. No hay demasiada variabilidad espacial en cuanto a las concentraciones de *Ostreopsis* epífita, entre los puntos separados por unos 10 m, pero sí que la hay en el agua, probablemente relacionada con la circulación del agua.
3. Los métodos del ICM-CSIC y M3-HAB dan resultados muy similares. Se puede establecer una relación directa para poder organizar las bases de datos comunes y establecer niveles de alerta similares para prevenir la exposición de las personas a las proliferaciones de *Ostreopsis*.
4. El método BEDI parece prometedor por su facilidad de aplicación cuando las condiciones de la costa lo permiten. Es necesario esperar a los resultados de los otros equipos de investigación de Francia e Italia, para ver si se pueden obtener factores de conversión entre el BEDI y los otros métodos clásicos. Mientras tanto, hará falta seguir muestreando los componentes bentónicos y planctónicos en los hábitats colonizados por *Ostreopsis*.

Palabras claves: *Ostreopsis* · toxina · ICM-CSIC · M3-HAB · BEDI · bentos · plancton

---

*Ostreopsis*' blooms are an emergent problem in the Mediterranean Sea, where are related to breathing irritations in bathers and/or the habitants of the places where this algae grows. It has also produced macrofauna's with low mobility massive deaths (sea urchin, starfishes, etc.). In the tropic, it has been related to serious food poisoning, because it produces a powerful toxin (paliotoxine) that passes to the food chain. In the Mediterranean, until now, it has not been detected any food intoxication case.

This problematic is being investigated by different Mediterranean groups. To unify the efforts it is important to get common sampling tools and datum field analysis. *Ostreopsis* microalgae grows preferentially as epiphytic on macroalgae but it is also found on water, forming part of plankton. Therefore, the studies need the sampling of the ecosystem's benthonic and planktonic components. The objective of this project is comparing three sampling methodologies: a) the one used by ICM-CSIC since 2007, that samples both planktonic *Ostreopsis* population and the epiphytic on the macroalgae; b) M3-HAB's project, similar to ICM's; and c) a new method, the BEDI that contributes an integrated *Ostreopsis*' presence estimation in benthos and plankton. It has also been analysed the sampling spatial variability and the error associate to microscope counting.

The main conclusions of this project are:

1. The error associate to microscopy counting is higher when cellular abundances are slow. In this cases (bloom's beginning and ending, and especially in water), it will be necessary to settle 50 mL in settle buckets to the microscopy analysis.
2. There isn't a lot of spatial variability as for the *Ostreopsis*' epiphytic concentrations, between the separated points (10 m). However, water shows more spatial variability likely to be related to water circulation.
3. ICM-CSIC and M3-HAB methods give similar results. It can be established a direct relation to organize common data base and lay down similar alert levels to warn people expositions to *Ostreopsis*' blooms.
4. BEDI method it seems to be promising due to its application's facility when coasts' conditions allowed it. Is it required to wait for Italian and French investigation team's results, to see if it is possible to get conversion factors between BEDI and the classical methods. Meanwhile, it is necessary to sample both benthic and planktonic components in *Ostreopsis*' colonised habitats.

Key words: *Ostreopsis* · toxin · ICM-CSIC · M3-HAB · BEDI · benthos · plankton

---

## INTRODUCCIÓ

Les proliferacions o “blooms” (en anglès) de microalgues nocives són motiu d’estudi per part de molts equips d’investigació d’arreu del món. Entre les moltes espècies de microalgues, el grup de les dinoflagel·lades inclou diverses espècies que sintetitzen unes toxines que poden provocar problemes als homes com trastorns gastrointestinals, neurològics, respiratoris i en casos molt extrems, fins i tot la mort. Aquestes toxines es bioacumulen i transmeten al llarg de la cadena alimentària. Les dinoflagel·lades, com a components del fitoplàncton (nedant a la columna d’aigua) o del bentos (adherides a macroalgues o coralls), són ingerides pels animals filtradors (per exemple, els mol·luscs bivalves) o els peixos herbívors, els quals retenen la toxina en els seus teixits. Aquests organismes transmetran, doncs, la toxina cap a nivells tròfics superiors, com ara els humans. Entre les intoxicacions alimentàries més esteses, cal destacar la Ciguatera, causada per la ingesta de peixos que s’alimenten en esculls coral·lins i és endèmica de latituds tropicals i subtropicals. **Aquest treball es centra en el cas de la dinoflagel·lada tòxica *Ostreopsis* sp, que es troba al Mediterrani.**



Figura 1. Cèl·lules d’*Ostreopsis* vistes amb SEM (Scanning Electron Microscope), vista de l’epitoca (imatge de la esquerra) i vista de les dues teques (imatge dreta).

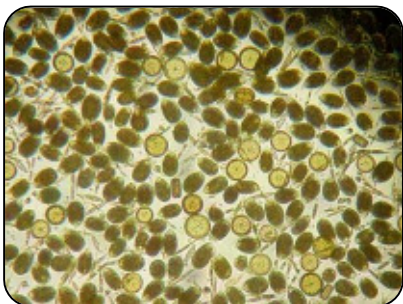


Figura 2. Imatge al microscopi òptic d’una mostra natural durant la proliferació d’*Ostreopsis* cf. *ovata*. S’hi poden veure algunes diatomees dels gèneres *Coscinodiscus* (formes circulars) i *Nitzschia* (allargades i fines).

*Ostreopsis* és una dinoflagel·lada tòxica d’origen tropical que també creix a aigües temperades costaneres del planeta, i en les dues darreres dècades prolifera de manera recurrent al litoral Mediterrani. Es troba tant al bentos – com a epífita de macroalgues o fanerògames, i sobre roques- formant part del plàncton. Per enganxar-se a les superfícies, produeix un mucíl·lag. Quan hi ha moltes cèl·lules, es veuen uns grumolls marronosos que cobreixen densament els substrats colonitzats. Els grumolls també es desprenen de les superfícies colonitzades i es veuen surant a la columna d’aigua i a la superfície. És la responsable, suposadament, d’irritacions respiratòries lleus ocasionades per la inhalació d’aerosols marins produïts durant les seves proliferacions que tenen lloc durant els mesos de juliol a setembre-octubre. La Figura 3 representa la dinàmica típica de la microalga amb màximes concentracions de l’ordre de  $10^6$  cèl·lules·gPF<sup>-1</sup> i  $10^5$  cèl·lules·L<sup>-1</sup> (veure secció 2 per als detalls dels mètodes) al mes de juliol. A partir d’aquest mes, les concentracions comencen a disminuir.

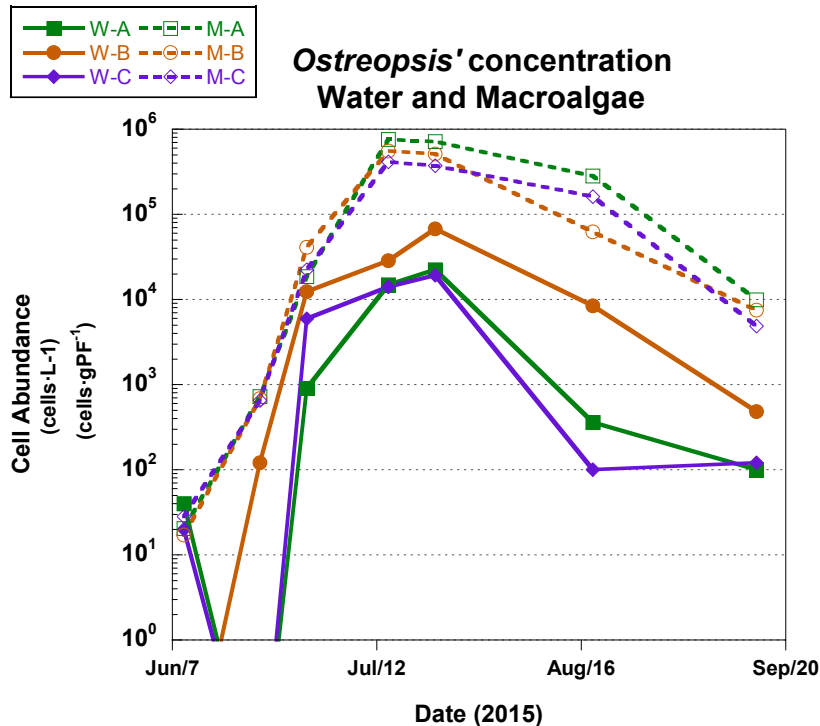


Figura 3. Evolució de la dinàmica temporal de les concentracions d'*O. cf. ovata* a Sant Andreu de Llanerers l'estiu de 2015. Mostres obtingudes a tres punts ( A, B i C) de l'estació de "Pins Mar". Les línies contínues representen les concentracions planctòniques, a l'aigua (cèl·lules·L<sup>-1</sup>), i les discontinües, les concentracions de cèl·lules epífites, recobrint la macroalga mostrejada i expressades en cèl·lules per gram de pes fresc de la macroalga (cèl·lules·g PF<sup>-1</sup>).

No és necessari un contacte directe amb l'aigua de mar per patir els símptomes (esternuts, picor al nas, als ulls i la gola, febre i mal de cap), simplement respirar els aerosols procedents de la zona on prolifera *Ostreopsis*. Encara no se sap del cert quin és l'agent que provoca la simptomatologia. S'ha hipotetitzat que les toxines que produeix la microalga, del grup de la palitoxina, en siguin les causants (Casabianca et al, 2013), però fins ara, no s'han pogut detectar toxines a l'aerosol marí. En canvi, s'hi han trobat microalgues o fragments de les cèl·lules en l'aire marí que es respira. Diversos aspectes sobre l'ecologia, fisiologia i impactes en la salut humana s'estan estudiant dins del projecte OstreoRisk, finançat pel Ministerio de Economía i Competitividad, concedit a investigadors de l'Institut de Ciències del Mar (ICM-CSIC).

La problemàtica de les proliferacions d'*Ostreopsis* afecta a diferents punts de la Mediterrània. Diferents equips d'investigació n'estudien la seva dinàmica per comprendre la relació entre l'*Ostreopsis* i les simptomatologies que produeix i així buscar solucions per a pal·liar-ne els seus impactes. Per tal de poder coordinar els esforços, és fonamental poder comparar les dades obtingudes en els diferents estudis. I és en aquest aspecte que es centra el present treball: **en la comparació de les dades de la concentració d'*Ostreopsis* obtingudes pels diferents mètodes de mostreig utilitzats actualment.** Concretament, en aquest treball, s'han comparat tres mètodes:

- 1) El mètode ICM: mètode utilitzat per l'equip ICM-CSIC des de l'any 2007.
- 2) El mètode M3-HAB: mètode proposat com a estàndard dins del projecte europeu "**Monitoring, Modelling and Mitigation of Harmful Algal Blooms along Benthic Mediterranean Coasts**" (2014-2015), liderat per científics italians.

3) El mètode BEDI “**Benthic Dinoflagellates Integrator**”: nou mètode ideat per l’equip francès l’estiu del 2014 i proposat als participants del projecte M3-HAB. L’estiu del 2015, els diferents equips internacionals interessats van tenir l’oportunitat de provar aquest nou mètode que intenta integrar tota la població d’*Ostreopsis* (planctònica i bentònica) dins d’una única mostra, amb la finalitat de disminuir l’esforç de mostreig i de recompte.

Per poder comparar els resultats entre els diferents equips que treballen sobre aquesta problemàtica al Mediterrani, és necessari aplicar els tres mètodes simultàniament a la mateixa àrea d’estudi. Com que els organismes no es distribueixen homogèniament en l’espai, en aquest treball també es va plantejar analitzar la variabilitat espacial a petita escala comparant 3 punts de mostreig.

El treball de camp s’ha realitzat a la platja de Sant Andreu de Llanerres. En aquesta localitat, les proliferacions d’*Ostreopsis* són recurrents, i s’hi han documentat episodis d’afectacions respiratòries en persones que habiten o visiten la zona. També, l’any 1998, es va detectar una mortalitat massiva de macrofauna (eriçons) que es va relacionar amb la proliferació d’*Ostreopsis*.

L’**objectiu** d’aquest estudi és, per tant, avaluar la idoneïtat de les tres metodologies per a seguir la proliferació d’*Ostreopsis* de l’estiu del 2015 a la platja de Sant Andreu de Llanerres, comparar els resultats obtinguts amb els tres mètodes de mostreig, i si és el cas, suggerir pautes per a escollir-ne un i poder-ne establir la seva estandardització. La idoneïtat s’ha avaluat en funció de com els protocols reflecteixen l’evolució temporal de la proliferació. També s’ha analitzat en detall la importància de la variabilitat espacial i els detalls de la metodologia de recompte mitjançant el microscopi invertit.

(The objective of this project is to evaluate the three methodologies ‘suitability to follow *Ostreopsis*’ bloom in Sant Andreu de Llanerres the summer of 2015, compare the obtained results with the three sampling methods, and if it is the case, suggest patterns to choose one method and establish its standardization. The suitability has been evaluated depending on how the protocols reflect bloom’s evolution. It has also been analysed the importance of space variability and counting methodology’s details with the inverted microscope.)

**Qüestions de sostenibilitat i ètica.** Cal destacar que aquest estudi no comporta una actuació agressiva per al medi ambient, ni pel que fa referència al mostreig de camp ni al tractament de mostres al laboratori. Al camp, donada la gran abundància de macroalgues, el mostreig no representa cap agressió a l’ecosistema. Ho podria ser al tròpic, on *Ostreopsis* creix sobre coralls (espècies de creixement molt lent). El treball s’ha desenvolupat amb macroalgues i microalgues, sobre les quals no hi ha cap normativa ètica aplicable. Al laboratori es recicla tot el material plàstic possible, i els residus de la fixació (Iugol) a les concentracions utilitzades no comporten una contaminació de les aigües residuals, que tot i així passen per un sistema de neutralització a l’edifici de l’ICM-CSIC.



## METODOLOGIA

### 1. Zona d'estudi



Figura 4. Situació de les estacions de mostreig Pins Mar (punt verd) i Blau Mar (punt blau) a Sant Andreu de Llanerres.

El mostreig s'ha dut a terme a Sant Andreu de Llanerres, una platja sedimentària i molt estreta (que no sempre hi és), amb una gran placa rocosa recoberta per moltes macroalgues, sobre les quals hi creixen poblacions denses d'*Ostreopsis*. La platja no té molta afluència de gent, però hi ha un restaurant molt proper i cases unifamiliars i apartaments a peu de platja. Des de fa anys, els veïns de la zona pateixen els símptomes esmentats a la Introducció coincidint amb la proliferació de la dinoflagel·lada. La simptomatologia d'aquesta cohort humana també s'estudia dins del marc del projecte OstreoRisk.

La proliferació d'*Ostreopsis* comença a l'estiu i es detecten cèl·lules fins a finals d'any (Vila et al. 2008, 2012). De Juny a Setembre, que és quan s'assoleixen les concentracions més elevades de l'organisme, es fan mostres setmanals. Després, són quinzenals i mensuals fins a finals d'any, en que l'espècie hi sol ser present però en baixes concentracions. En aquest treball, es determina **l'evolució temporal** de la proliferació utilitzant els tres mètodes esmentats (veure secció 2) mitjançant 7 mostres entre el 7 de Juny i el 15 de Setembre de 2015, tot i que el protocol BEDI es va aplicar en 4 mostres, a partir del 12 de juliol (data en la qual es va disposar d'aquest instrument).

Els organismes del plàncton i del bentos no es distribueixen de forma uniforme, sinó que hi ha una **variabilitat espacial**. Per tenir una imatge més real de la concentració d'*Ostreopsis* al llarg del temps a la platja de Llanerres s'han definit dues estacions de mostreig, Pins Mar i Blau Mar, separades 500 m de distància (Figura 4).

- "Pins Mar" és la zona de mostreig que es troba just davant d'un restaurant i s'hi obtenen les mostres en tres punts, Pins Mar A, Pins Mar B i Pins Mar C, separats uns 10 metres (Figura 5). En aquests punts l'aigua és més somera i el substrat més uniforme (principalment roca sedimentària, molt plana).
- "Blau Mar" és la zona de mostreig situada davant d'uns apartaments. Aquest punt és més profund i el substrat és més irregular (amb roca i sorra). Es troba al nord de Pins Mar (Figura 4).

En aquest treball es presenten els resultats corresponents als tres punts de mostreig, que s'han anomenat Pins Mar A, B i C (Figures 5 i 6).

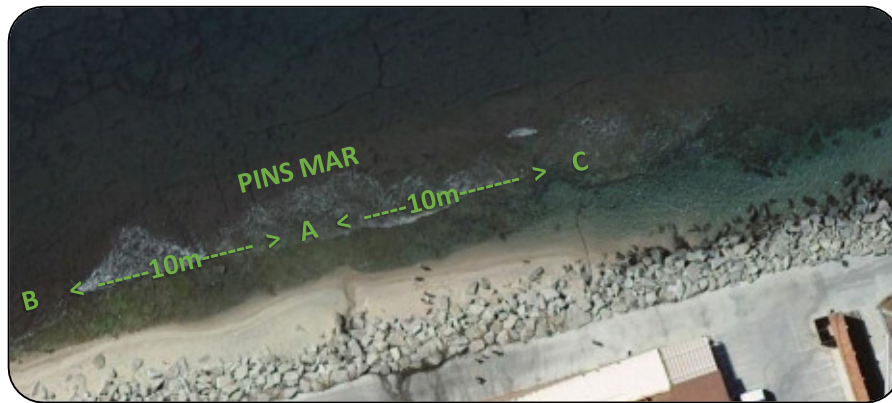


Figura 5. Fotografia dels tres punts de mostreig Pins Mar A, B i C en la temporada d'estiu del 2015 a Sant Andreu de Llavaneres.

Per avaluar l'error metodològic associat al recompte cel·lular amb el microscopi, s'ha escollit un conjunt de mostres, les corresponents al protocol M3-HAB, les quals s'han analitzat per triplicat. Això permet conèixer la **variabilitat deguda al recompte de les mostres.**

## 2. Protocols de mostreig

En cada punt de mostreig es mesuren paràmetres ambientals (temperatura, salinitat de l'aigua, concentracions de clorofil·la i nutrients, etc.) que no es consideren en aquest treball ja que es van presentar en la memòria de pràctiques presentada al setembre de 2015. En els protocols ICM i M3-HAB s'agafen, sempre en aquest ordre, una mostra de plàncton (aigua) i a continuació, una mostra de bentos (macroalga). D'aquesta manera, s'evita mostrejar zones trepitjades, on les cèl·lules bentòniques es podrien despendre de les macroalgues i passar a l'aigua de manera que podrien fer augmentar les concentracions de cèl·lules en les mostres planctòniques. En el protocol BEDI, s'agafa una única mostra que integra la concentració total de microalgues al plàncton i al bentos. La macroalga mostrejada s'escull de manera que representi l'espècie més abundant en cada mostreig. Al llarg de l'estiu hi ha una successió de macroalgues, de manera que, a principis de la proliferació d'*Ostreopsis* es va mostrejar primer *Halopteris*, després *Jania* i al final *Corallina*. No obstant, en estudis anteriors es va veure que no hi havia diferències significatives en la concentració d'*Ostreopsis* entre les diferents espècies mostrejades (e.g. Vila et al, 2001). En la Taula 1 es resumeixen les particularitats de cada mètode utilitzat.

→ Protocol regular de mostreig realitzat per l'equip de l'ICM

- **Plàncton:** per a determinar l'abundància d'espècies de fitoplàncton a la columna d'aigua es segueixen els següents passos.

1. Agafar una mostra de 250 mL d'aigua a prop de la zona on s'agafarà la macroalga.
2. Fixar amb lugol.
3. Al laboratori: sedimentar una submostra en cambres de sedimentació -50 mL seguint el mètode Utermöhl o amb cambres de Sedgewick Rafter -1 mL quan el bloom ja estigui avançat i hi hagin moltes cèl·lules (Veure apartat 3).
4. Comptar mostres al microscopi invertit tal i com s'indica a l'apartat 3 (Recomptes).

- **Bentos:** per determinar l'abundància d'espècies epífites recobrint les macroalgues es segueixen els següents passos.



Figura 6. Mostreig estiu 2015 a Sant Andreu de Llavaneres (Pins Mar).



Figura 7. Barreja obtinguda després de sacsejar la macroalga. *Ostreopsis* en mucílag marronós.

1. Buscar una zona que no estigui trepitjada.
2. Agafar uns 10 grams de macroalga que es posen en un flascó.
3. Abocar 180 mL d'aigua de mar filtrada prèviament (mitjançant filtres GF/F instal·lats en portafiltes tipus Swinnex).
4. Tapar el flascó i agitar durant 1 minut per tal de despendre els *Ostreopsis* que estiguin adherits a la macroalga i recollir-los en l'aigua de mar filtrada (Figura 7).
5. Filtrar la mostra per un sedàs de 200 micròmetres, per separar les cèl·lules dels trossets de macroalga i altres organismes o sediment més grans i recollir l'aigua amb la fracció resultant en un altre pot.
6. Fixar la fracció <math><200 \mu\text{m}</math> de la mostra amb lugol. Amb aquesta mostra s'identificaran les microalgues presents i quantificar l'abundància cel·lular pel mètode Utermöhl o Sedgewick-Rafter amb microscopi invertit al laboratori (Veure secció 3).
7. Guardar la macroalga en un flascó de vidre per a mesurar el seu pes fresc (PF) al laboratori.
8. Al laboratori, pesar la macroalga per determinar el PF. Tarar el pot de vidre.
9. Posar la mostra a l'estufa (60°C) fins que l'alga està seca (7 dies) per obtenir el pes sec (PS).

### → Protocol mostreig M3-HAB

Com en el cas anterior, primer, s'agafa la mostra d'aigua i després la de bentos. La mostra d'aigua (250 mL), s'agafa just al costat de la macroalga que es mostrejarà i es fixa amb lugol acètic. La macroalga s'agafa junt amb l'aigua que l'envolta i també es fixa amb lugol acètic. Al laboratori, per saber el pes fresc de l'alga es segueix el següent protocol:

1. Filtrar pel sedàs (200 micròmetres) tota la mostra d'aigua amb la pròpia macroalga.
2. Afegir 100 mL d'aigua de mar filtrada i sacsejar fort durant 10 s. Tornar a filtrar pel sedàs, i guardar l'aigua que queda en una proveta.
3. Repetir el pas 2.
4. Mesurar volum total de l'aigua amb una proveta. Guardar aquesta aigua per al recompte de cèl·lules.
5. Al laboratori es mesura el PF i el PS com en els punts 7 a 9 del protocol de l'ICM.

Les mostres de plàncton es compten sedimentant 50 mL mitjançant el mètode Utermöhl. Se n'analitzen 3 rèpliques. Les de bentos es recompten amb Sedgewick-Rafter (1 mL) i també se n'analitzaran 3 rèpliques. Per tant, **amb les mostres del mètode M3-HAB, a més a més, es va analitzar la variabilitat associada a la metodologia de recompte.**

### → Protocol BEDI

El BEDI (Benthic Dinoflagellates Integrator) (Figura 8) consisteix en un cilindre d'acer inoxidable de 70 cm d'alçada i 25 cm de diàmetre, que presenta unes marques d'alçada (cada 10 cm) en el seu interior. La manera de mostrejar és la següent:

1. Col·locar el BEDI sobre una superfície més o menys regular i plana amb una cobertura de macroalgues del 100%.
2. Apuntar el nivell al que arriba l'aigua dins del cilindre (per a poder calcular el volum de la columna d'aigua mostrejada).
3. Introdur el braç dins el cilindre, sostenint un pot (250 mL) on recollir la mostra; remoure l'aigua (amb l'ajut del mateix pot) tocant el substrat, amb l'objectiu de despendre els microorganismes adherits a la macroalga.
4. Després d'uns segons, agafar mostra d'aigua omplint tot el pot i fixar-la amb lugol.

D'aquesta manera, s'obté una mostra que integra tant el fitoplàncton com el fitobentos i els esforços de mostreig i recompte són menors. El nombre de cèl·lules d'*Ostreopsis* es refereixen a superfície i no al pes de la macroalga com en els altres protocols.



Figura 8. Protocol del BEDI.

El protocol del BEDI proposa fer els recomptes de les mostres amb el mètode de Sedgewick-Rafter (mL), 1 rèplica. La idea és tenir una mesura ràpida i que integri tota la comunitat.

Taula 1. Síntesi dels elements claus de cada mostreig. (U= Utermöhl. S-R= Sedgewick-Rafter).

MÈTODE	MOSTREIG			RECOMPTES			
	Zona de mostreig	Mostres	Fixació de les mostres	Volum sedimentat		Rèpliques	
				Aigua	Macroalga	Aigua	Macroalga
ICM	No trepitjada	Aigua i macroalga (mostres properes)	Lugol	50 mL (U.)	- 10 mL ↓[cell] (U.) - 1mL ↑[cell] (S-R.)	1	1
M3-HAB	No trepitjada	Aigua i macroalga (mostres molt properes)	Lugol acètic	1 mL (S-R.)	1 mL (S-R.)	3	3
BEDI	- No trepitjada - Cobertura algal del 100% - Superfície regular	Integrada (mostra única)	Lugol	1 mL S-R. (10 mL si ↓[cell] (U.))		1	

### 3. Recomptes

- **Mètode Utermöhl:** aquest mètode consisteix en sedimentar un volum conegut d'una mostra d'aigua damunt d'una cambra de sedimentació (de secció circular) (Figura 9). La cambra bàsica acostuma a ser de 2 o 10 mL de capacitat. Si es necessita sedimentar volums més grans, s'afegeix una columna de sedimentació que consisteix en un cilindre de metacrilat que es fa reposar sobre la cambra de sedimentació (Figura 9). És important cobrir la cambra amb un cobreobjectes per fer el buit i evitar que la mostra s'escoli per la zona que uneix la cubeta amb el cilindre. Per gravetat, les cèl·lules de fitoplàncton fixades sedimenten al fons de la cambra. Una vegada realitzada la sedimentació (el temps depèn de l'alçada de la cambra, Taula 2), es retira el cilindre (el líquid es tira a la pica del laboratori) i es tapa la cambra de

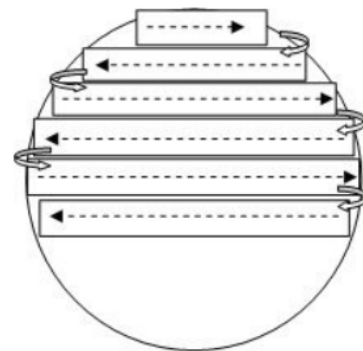


Figura 10. Mètode de recompte de la cambra en Utermöhl.

sedimentació i les cèl·lules es poden identificar i comptar amb un microscopi invertit.

Per calcular la concentració cel·lular, es necessiten uns factors que són específics per a cada microscopi (per tant, és important anotar sempre el microscopi usat, la superfície analitzada (Figura 10) amb el microscopi per contar les cèl·lules, el volum sedimentat (mL) i els augments de l'objectiu utilitzat. Aquest mètode, permet a diferència d'altres, realitzar recomptes en mostres on la concentració de les cèl·lules no és molt elevada.

Cèl/L = \_\_\_\_\_ . \_\_\_\_\_ . \_\_\_\_\_

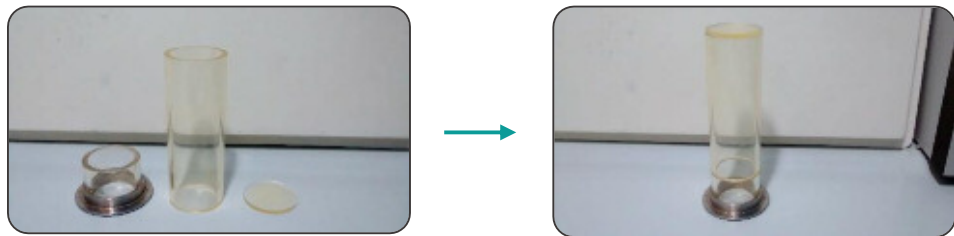


Figura 9. Cambra de sedimentació, columna de sedimentació i cobreobjectes (imatge esquerra). Muntatge de les tres parts (imatge dreta).

Taula 2. Temps de sedimentació recomanats segons el volum o l'alçada de la cambra, proposats per cèl·lules de mida més petita.

Volum Cambra (mL)	Alçada cambra (cm)	Temps sedimentació (hr)
2	1	3
10	2	8
25	5	16
50	10	24

- Mètode Sedgewick-Rafter (Figura 11): És un mètode de recompte per a quantificar mostres amb un nombre molt elevat de cèl·lules, com ara en episodis de 'bloom' o en cultius de laboratori, utilitzant un microscopi invertit. La cambra Sedgewick-Rafter té 1 mL de capacitat (Figura 11), on tota la base té una quadrícula marcada amb 1000 quadradets als quals els correspon per tant, 1 µL de capacitat (50 mm x 20 mm x 1mm de profunditat). El nombre de cèl·lules per mL es calcula segons la fórmula:

Cèl/mL = \_\_\_\_\_ . \_\_\_\_\_ . \_\_\_\_\_



La cambra es cobreix amb un cobreobjectes apropiat.



Figura 11. Muntatge de la cambra Sedgewick-Rafter i col·locació de la mostra.

Taula 3. Relació entre el nombre de cèl·lules comptades i el límit de confiança al 95% de nivell de significació (Edler 1979, Andersen and Thronsdon 2004).

Número de cèl·lules comptades	Límit de confiança +/- (%)	Límit absolut si la densitat de cèl·lules estimat a 500 cèl·L <sup>-1</sup>
1	200	500 ± 1000
5	89	500 ± 445
10	63	500 ± 315
50	28	500 ± 140
100	20	500 ± 100
200	14	500 ± 70
400	10	500 ± 50
500	9	500 ± 45
1000	6	500 ± 30

En l'anàlisi quantitativa, cal comptar un mínim nombre de cèl·lules per tal d'obtenir uns resultats estadísticament robusts. La precisió desitjada decideix quantes unitats s'han de comptar i normalment s'expressa com el 95% del límit de confiança. Ve donada per la següent fórmula:

$$\text{Precisió \%} = \frac{\text{Límit de confiança}}{\text{Número de cèl·lules comptades}} \times 100$$

#### 4. Anàlisi de dades

Les dades s'han organitzat en fitxers mitjançant el programa Excel, les gràfiques s'han fet amb Kaleidagraph. Per a representar la variabilitat del mostreig espacial, es representen els valors mitjans i la desviació estàndard. En canvi, per presentar la precisió dels recomptes al microscopi, es representen els valors mitjans i l'error estàndard de la mitjana (SEM).

## RESULTATS

Al principi i al final del bloom d'*Ostreopsis* hi ha presència d'altres espècies de dinoflagel·lades potencialment tòxiques, com ara, *Coolia monotis*, *Amphidinium* sp. i *Prorocentrum lima*, a més de diatomees (no nocives) com ara, *Coscinodiscus* sp. i *Licmophora* sp. En canvi, quan la concentració de cèl·lules d'*Ostreopsis* és màxima, el bloom és pràcticament monoespècífic. Totes aquestes espècies es van comptabilitzar amb els tres mètodes de mostreig i recompte descrits. Tanmateix, en aquest treball només es presenten els resultats d'*Ostreopsis*, per una qüestió de dimensió de la memòria, i perquè és aquest l'organisme que causa els problemes de salut i a l'ecosistema.

En primer lloc, es presenta l'evolució temporal de la població d'*Ostreopsis* obtinguda amb cada mètode de manera individual i posteriorment s'analitzen comparativament els mètodes.

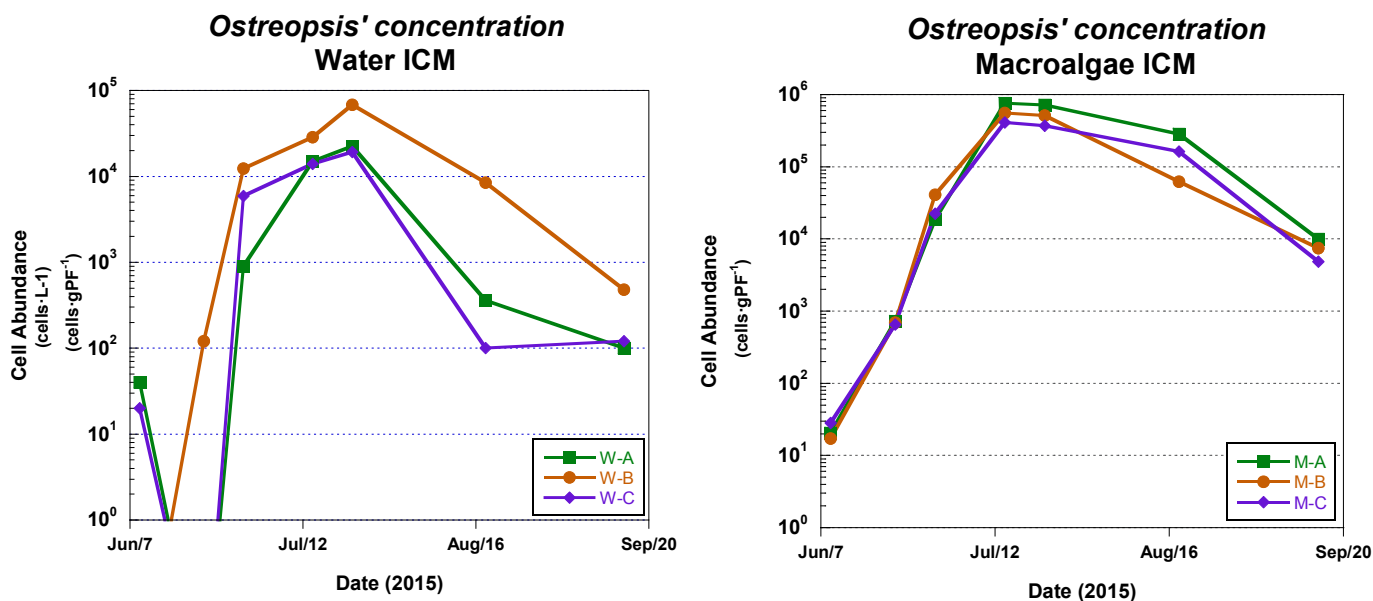
### 1. Evolució temporal de la proliferació d'*Ostreopsis* segons protocol de l'ICM.

L'evolució temporal de la proliferació d'*Ostreopsis* en els punts Pins Mar A, B i C, a l'aigua i recobrint la macroalga es presenten en les figures 12 i 13 respectivament. En els tres punts la proliferació segueix la mateixa dinàmica. Globalment, s'observa més variabilitat entre les tres mostres d'aigua que entre les tres mostres d'epífits sobre la macroalga.

Pel que fa a l'aigua, les concentracions als punts A i C s'assemblen molt més entre elles que les del punt Pins Mar B, on es detecten les concentracions màximes. Aquestes diferències arriben a ser de fins gairebé 2 ordres de magnitud en el mostreig del 16 d'agost. A més, al punt A i C es detecten cèl·lules abans que a Pins Mar B. Cal afegir, que les tendències són més disperses al principi i al final del bloom, quan les concentracions cel·lulars són més baixes i per tant hi ha més error en la quantificació de cèl·lules al microscopi (Taula 3). En canvi, quan les concentracions són més altes (final de la fase exponencial i fase estacionària), les tendències entre els tres punts de mostreig són més semblants.

A la figura 14 es presenten les mitjanes de les concentracions dels tres punts A, B i C amb la desviació estàndard (SD). S'observa que l'SD és més gran quan les concentracions són més baixes, és a dir, al principi i al final de la proliferació. En termes relatiu, la mitjana de les abundàncies cel·lulars recobrint la macroalga és superior a les abundàncies cel·lulars a l'aigua, tot i que cal anar amb compte perquè les unitats no són equivalents.





Figures 12 i 13. Abundància de cèl·lules d'*Ostreopsis* a l'aigua (esquerra) i a la macroalga (dreta) al llarg del mostreig de l'estiu de 2015 a Pins Mar A, B i C amb el protocol de mostreig de l'ICM.

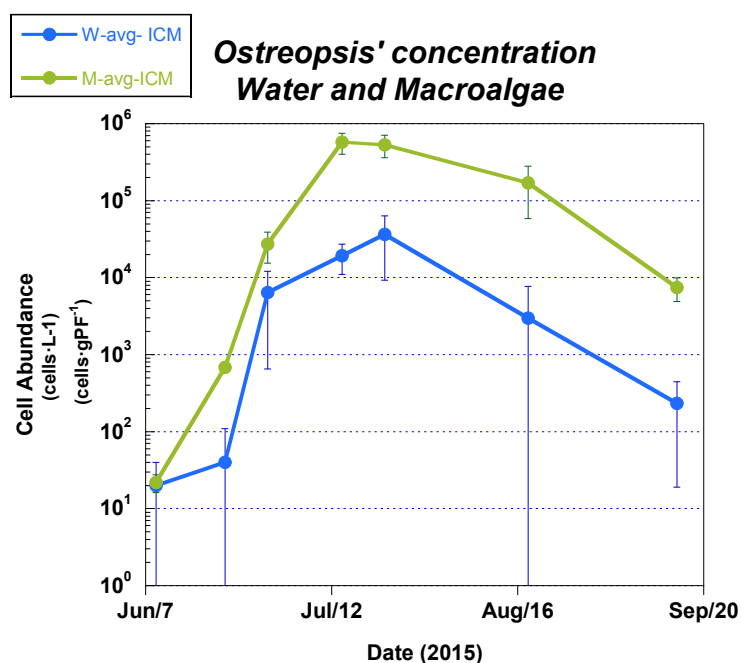
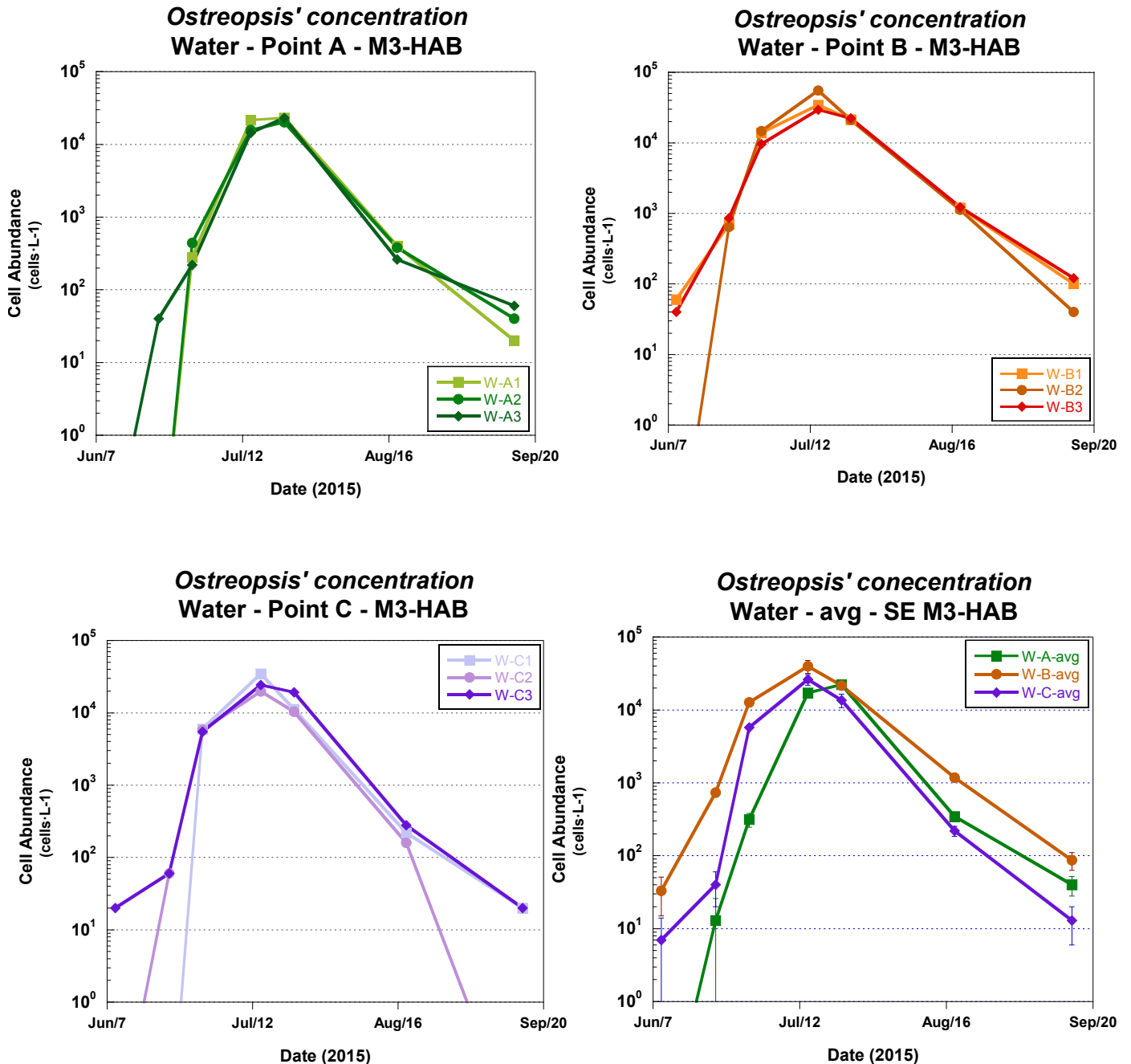


Figura 14. Concentració mitjana ( $\pm$  SD) de l'abundància de cèl·lules d'*Ostreopsis* a l'aigua (blau) i a la macroalga (verd) dels tres punts: Pins Mar A, B i C amb el protocol de mostreig de l'ICM.

## 2. Evolució temporal de la proliferació d'*Ostreopsis* segons protocol de l'M3-HAB.

Com ja s'ha comentat, amb les mostres obtingudes i analitzades seguint el protocol M3-HAB, a part de determinar la variabilitat espacial de petita escala (3 punts de mostreig, Pins Mar A, B i C, separats 10 metres entre ells), es va voler explorar també la variabilitat associada al mètode recompte. A les figures 15, 16 i 17 es mostra l'evolució temporal de les concentracions d'*Ostreopsis* a l'aigua, en els punts Pins Mar A, B i C, mostrant els resultats dels recomptes per

triplicat (per exemple, A1, A2 i A3) de cada mostra. A la figura 18 es presenta la mitjana dels tres recomptes amb el seu respectiu error estàndard de la mitjana (SEM). Com es pot veure, la variabilitat més gran es detecta al principi i al final de la proliferació, sobretot durant el primer i l'últim mostreig (i en algun cas en el segon). Però en la resta de casos, l'error associat al recompte de mostres és molt petit.

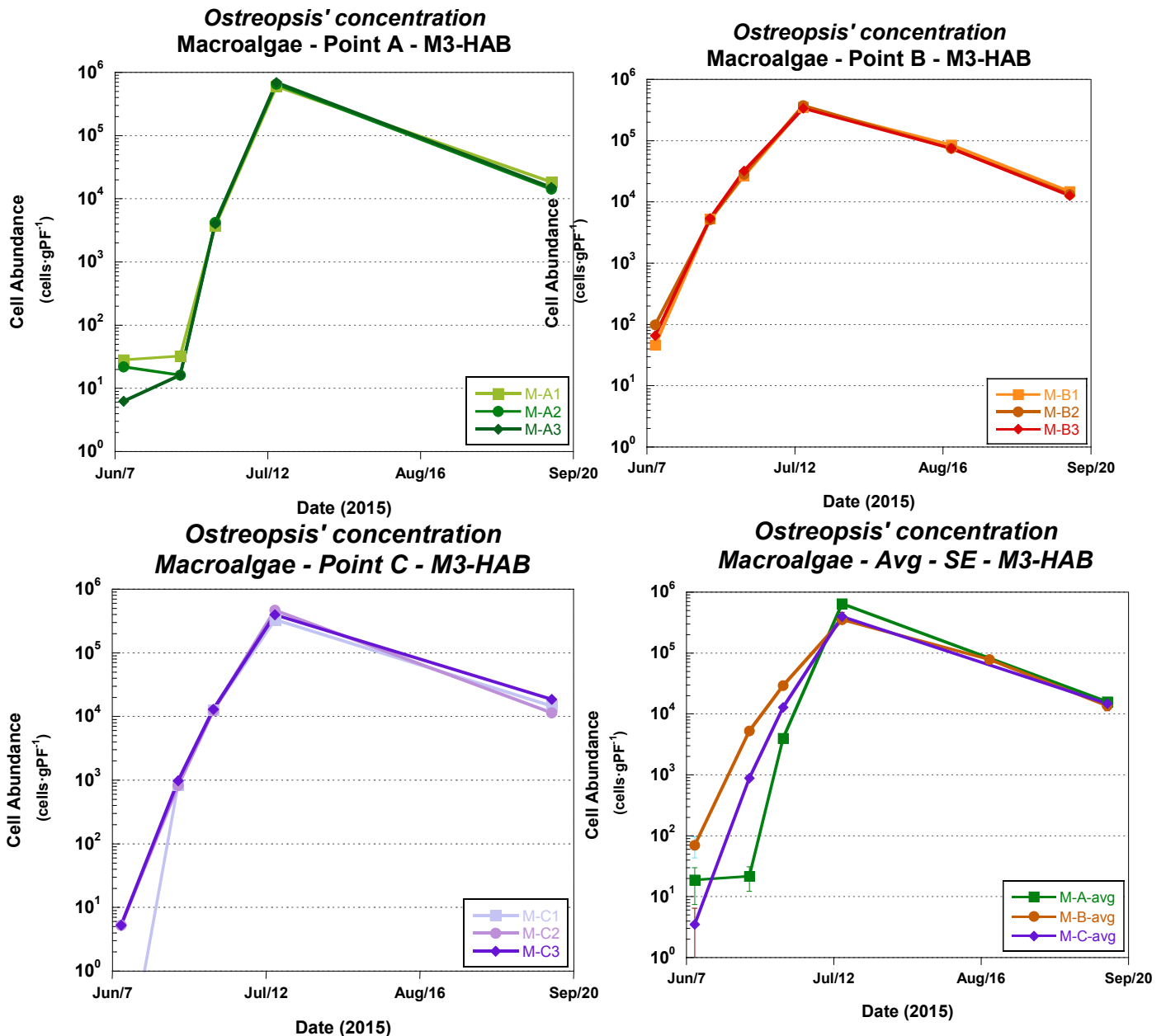


Figures 15,16,17 i 18. Abundància de cèl·lules d'*Ostreopsis* a l'aigua al punt A1,A2,A3 (a dalt esquerra); B1,B2,B3 (a dalt dreta) i C1,C2,C3 (a baix esquerra) i mitjana del punt A, B i C (a baix dreta) al llarg del mostreig de l'estiu de 2015 a Pins Mar amb el protocol de mostreig de l'M3-HAB.

Anàlogament, l'evolució temporal de les concentracions d'*Ostreopsis* epífita sobre la macroalga es mostra a les figures 19,20,21 i 22. En aquest cas, hi ha més variabilitat al principi de la proliferació. En canvi, durant la resta del període estudiat, la variabilitat del mostreig i l'error en els recomptes és molt petit.

A la figura 23 es mostra la mitjana de la concentració d'*Ostreopsis* en els tres punts (Pins Mar A, B i C) de les mostres planctòniques i bentòniques al llarg del cicle temporal mitjançant el mètode M3-HAB. Es presenta la SD de la mitjana obtinguda a partir dels valors mitjans dels 3 recomptes a cada punt A, B i C (per tant, n=3). En aquest cas, es representa la SD per mostrar la variabilitat espacial.

En aquest cas es pot veure que la variabilitat és més gran en les mostres d'aigua que en els de macroalga, i que és més gran a l'inici i al final de la proliferació que no pas quan s'assoleixen les màximes concentracions.



Figures 19,20 i 21. Abundància de cèl·lules d'*Ostreopsis* a la macroalga al punt A (a dalt a l'esquerra); B (a dalt a la dreta) i C (a baix a l'esquerra). A cada punt mostrejat, es presenten els resultats dels tres recomptes al microscopi. Així per exemple, A1, A2 i A3 corresponen a les 3 rèpliques del punt A, i així per als punts B i C. A la Figura 22 (a baix a la dreta) es representen els valors mitjans de cada punt amb les barres verticals corresponents al SEM (n=3).

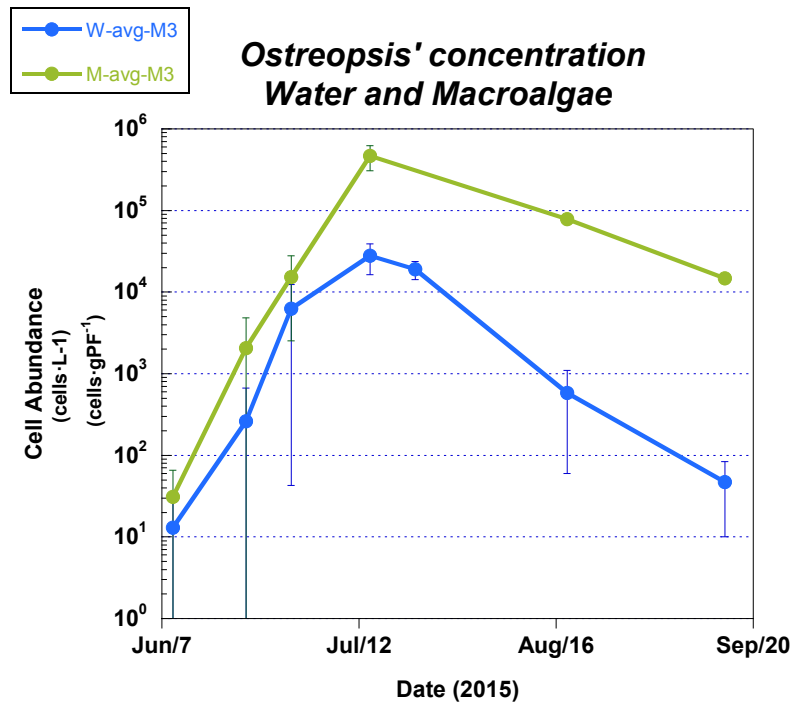


Figura 23. Concentració mitjana ( $\pm$  SD) de l'abundància de cèl·lules d'*Ostreopsis* a l'aigua (blau) i a la macroalga (verd) dels tres punts: Pins Mar A, B i C amb el protocol de mostreig de l'M3-HAB.

### 3. Evolució temporal de la proliferació d'*Ostreopsis* segons mètode del BEDI.

El "Benthic Dinoflagellate Integrator" integra les cèl·lules del plàncton i del bentos i dona un únic resultat. Com que es refereix a una superfície, les unitats són cèl·lules/cm<sup>2</sup> enlloc de cells·L<sup>-1</sup> o cells g per pes fresc<sup>-1</sup> de macroalga (com en els protocols ICM i M3-HAB). A la figura 24 es presenta la concentració d'*Ostreopsis* en els tres punts, Pins Mar A, B i C, seguint el protocol BEDI. Recordar que no es va poder disposar de l'aparell de mostreig fins a mitjans de juliol, per tant es presenten dades a partir d'aquest dia, moment en que la proliferació estava en el seu màxim. Per tant, en aquest cas només es tenen dades sobre la segona part de la proliferació (fases estacionària i de declivi).

A la figura 25 es presenta la mitjana dels tres punts de mostreig (Pins Mar A, B i C) amb la desviació estàndard (SD). S'observa una disminució d'abundància cel·lular en el temps, partint de concentracions de 10<sup>5</sup> cèl·lules·cm<sup>2</sup> fins arribar a concentracions de 10<sup>2</sup> cèl·lules·cm<sup>2</sup>.

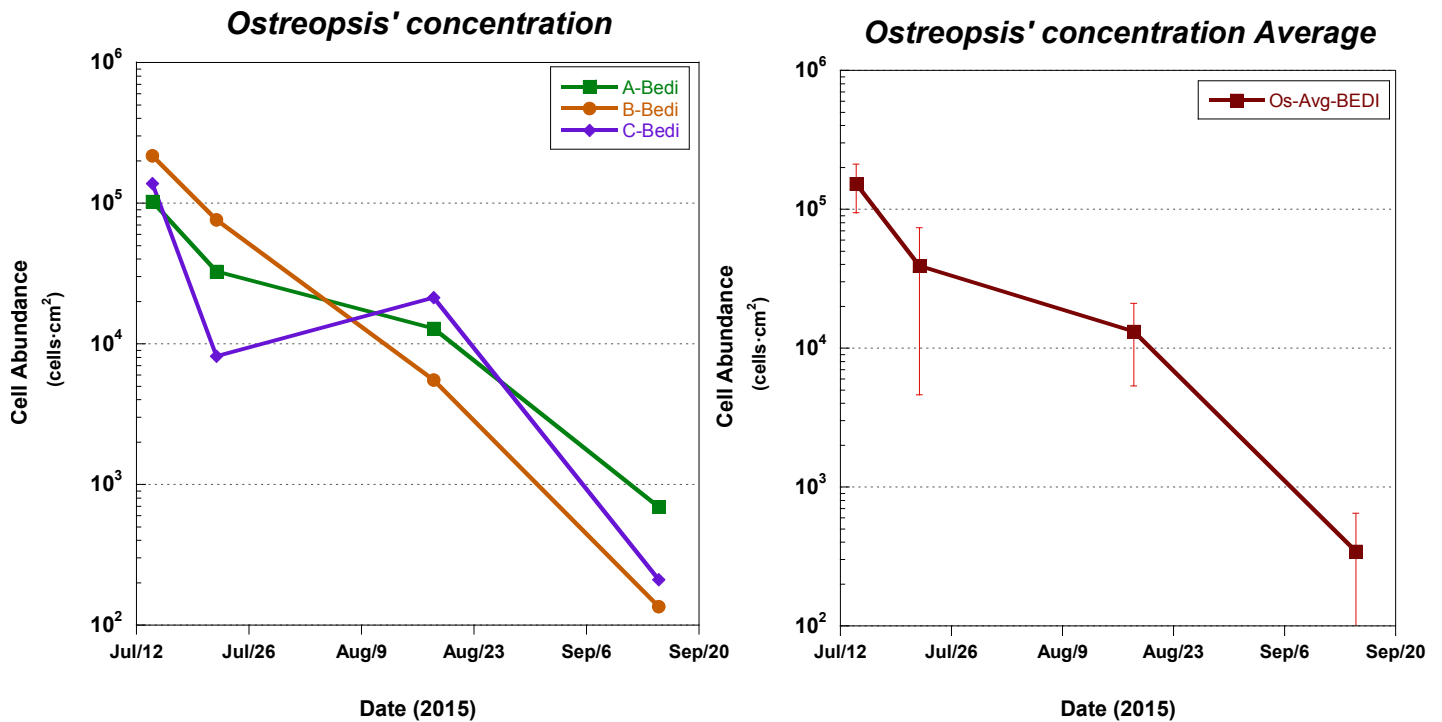


Figura 24 i 25. Abundància d'*Ostreopsis* als punts A, B i C (esquerra) i concentració mitjana ( $\pm$  SD) de l'abundància de cèl·lules d'*Ostreopsis* dels tres punts: Pins Mar A, B i C (dreta) amb el protocol de mostreig del BEDI.

#### 4. Comparació entre els mètodes

A continuació es comparen els resultats obtinguts amb els diferents protocols de mostreig.

##### a) Concentracions d'*Ostreopsis* a l'aigua: ICM versus M3-HAB

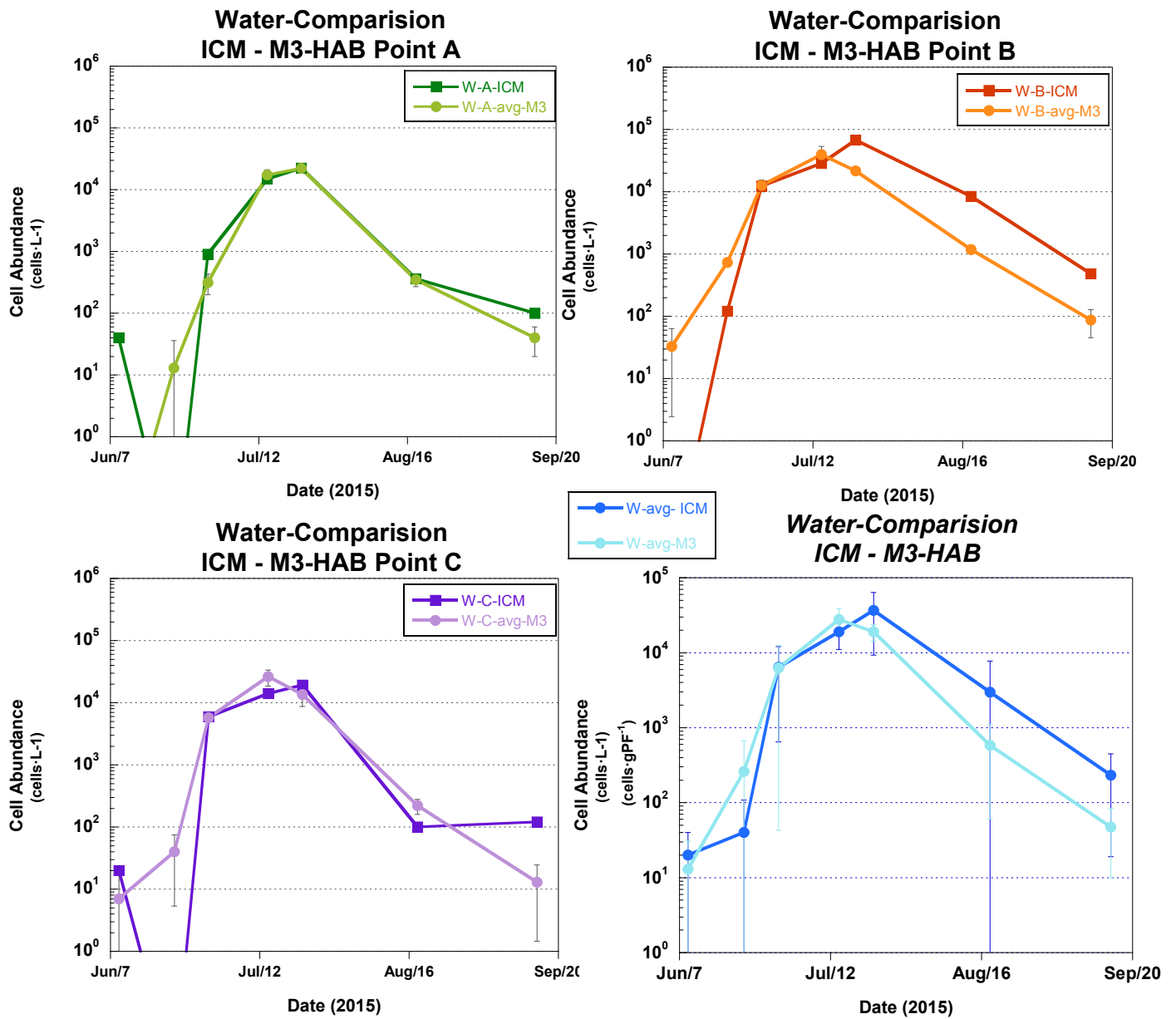
A les figures 26, 27 i 28 es representa l'evolució temporal de la concentració planctònica d'*Ostreopsis* obtinguda pel mètode ICM i mètode M3-HAB dels tres recomptes en cadascun dels punts Pins Mar A, B i C per separat.

A nivell general, s'observa que els mètodes mostren un patró temporal de la proliferació molt similar. De tota manera, les concentracions estimades per ambdós mètodes són més semblants quan el bloom presenta les seves màximes concentracions, i són més diferents quan són baixes. Cal fer notar, però, que l'escala logarítmica amplifica les diferències de manera visual en els valors baixos, de manera que les diferències no ho són tant en nivell absolut.

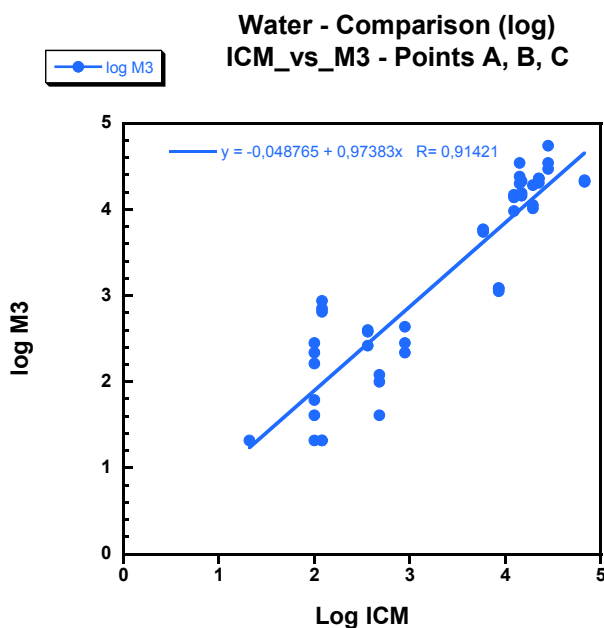
El mètode de l'ICM, quan les concentracions cel·lulars són baixes, estima valors més alts que els obtinguts amb el mètode M3-HAB (excepte al primer mostreig del punt B, Figura 27). És a dir, que en el mateix mostreig detecta més cèl·lules que no pas l'M3-HAB.

En representar els valors mitjans dels tres punts (Pins Mar A, B i C) obtinguts amb els dos mètodes (figura 29) es pot veure que l'evolució temporal presenta tendències i rangs molt similars i es detecten les concentracions màximes al mateix moment. Al final del bloom, el

mètode ICM en detecta unes poques cèl·lules més, però tot i així, els dos mètodes detecten concentracions del mateix ordre de magnitud.



Figures 26,27,28 i 29. Concentració mitjana ( $\pm$  SD) de l'abundància de cèl·lules d'Ostreopsis a l'aigua de cada punt: Pins Mar A, B i C amb els protocol de mostreig de l'ICM (línies fosques) i l'M3-HAB (línies clares). La darrera figura mostra la mitjana ( $\pm$  SD) dels tres punts per als dos mètodes de mostreig.



A la figura 30 es poden observar que els dos mètodes, l'ICM i l'M3-HAB, tenen molt bona correlació amb una  $R = 0.91$  i una  $r^2 = 0.83$ .

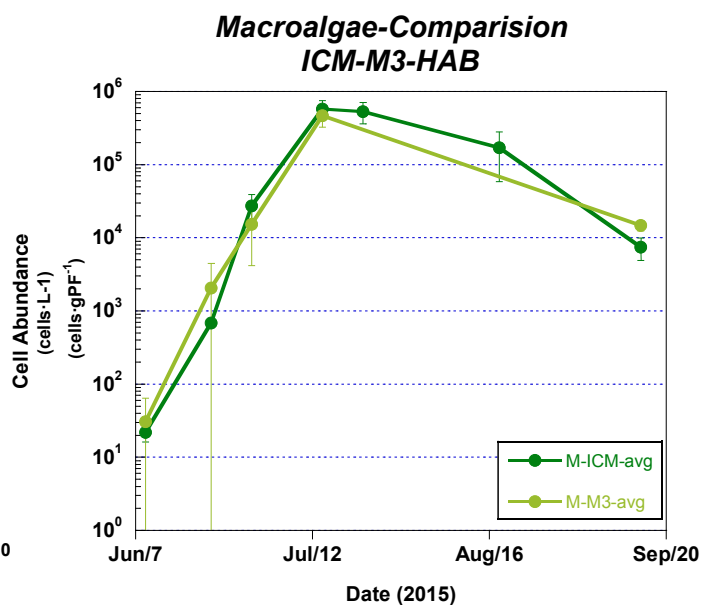
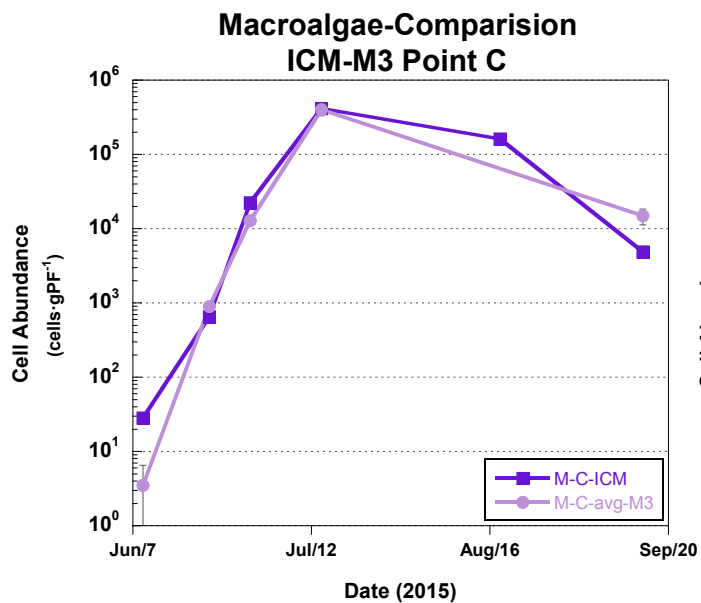
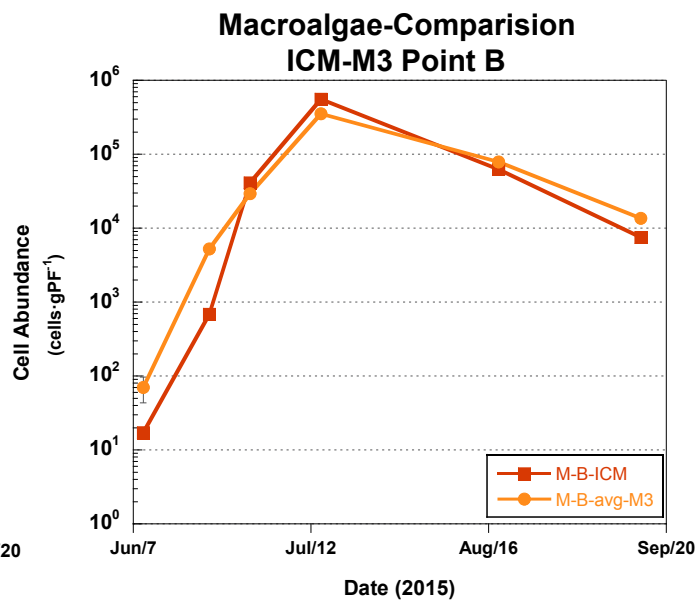
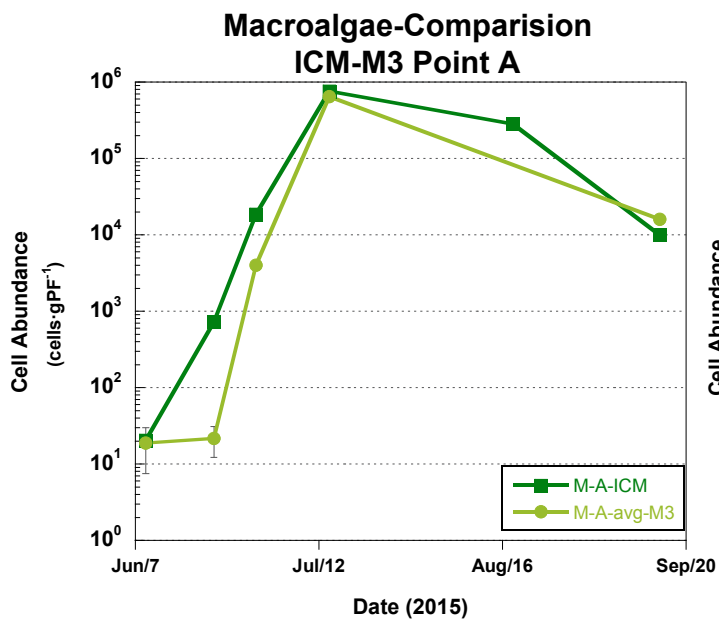
*Figura 30. Correlació del logaritme de la mitjana de cèl·lules d'Ostreopsis a l'aigua del mètode M3-HAB versus el logaritme de la mitjana de les cèl·lules d'Ostreopsis a l'aigua del mètode de l'ICM.*

**b) Concentracions d'Ostreopsis epífit sobre la macroalga ICM versus M3-HAB**

A la figura 31, 32 i 33 es representa l'evolució temporal de la concentració bentònica d'Ostreopsis obtinguda pel mètode ICM i mètode M3-HAB dels 3 recomptes en els punts Pins Mar A, B i C.

Les mostres de macroalga entre els dos mètodes són més semblants que les mostres d'aigua entre els dos mètodes. Per als tres punts, les concentracions de cèl·lules són molt semblants entre mètodes per a tot el bloom d'Ostreopsis. La variabilitat (SD) és molt petita en els tres casos (punt A, B i C). Es detecten cèl·lules al primer mostreig amb els dos mètodes. En el cas de Pins Mar A i Pins Mar C, hi ha una mostra menys representada al gràfic ja que les mostres del 18-8-15 es van fer malbé.

A la figura 34, es presenta la mitjana dels tres punts estimada amb cada mètode i s'observa que hi ha una semblança rellevant entre les dues metodologies.



Figures 31,32,33 i 34. Concentració mitjana ( $\pm$  SD) de l'abundància de cèl·lules d'Ostreopsis a la macroalga de cada punt: Pins Mar A, B i C amb els protocol de mostreig de l'ICM (línies fosques) i l'M3-HAB (línies clares). La darrera figura mostra la mitjana ( $\pm$  SD) dels tres punts per als dos mètodes de mostreig.



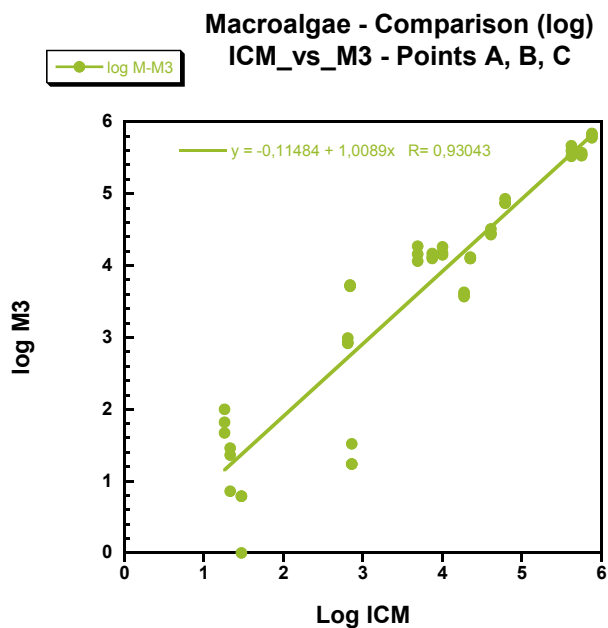


Figura 35. Correlació del logaritme de la mitjana de cèl·lules d'*Ostreopsis* a la macroalga del mètode M3-HAB versus el logaritme de la mitjana de les cèl·lules d'*Ostreopsis* a la macroalga del mètode de l'ICM.

### c) ICM versus BEDI

Per saber si el mètode utilitzat per l'equip d'investigació de l'ICM des del 2007 és comparable amb el nou mètode proposat per l'equip francès, es presenten els resultats de la comparació de l'aigua i la macroalga. El mètode del BEDI solament es compara amb la metodologia de l'ICM. No es pot comparar amb l'M3-HAB perquè coincideix en dos mostres únicament.

Es pot observar que els dos mètodes són més semblants pel que fa a les mostres epífites sobre la macroalga ( $R = 0.97$ ) que no pas per les mostres d'aigua ( $R = 0.70$ ).

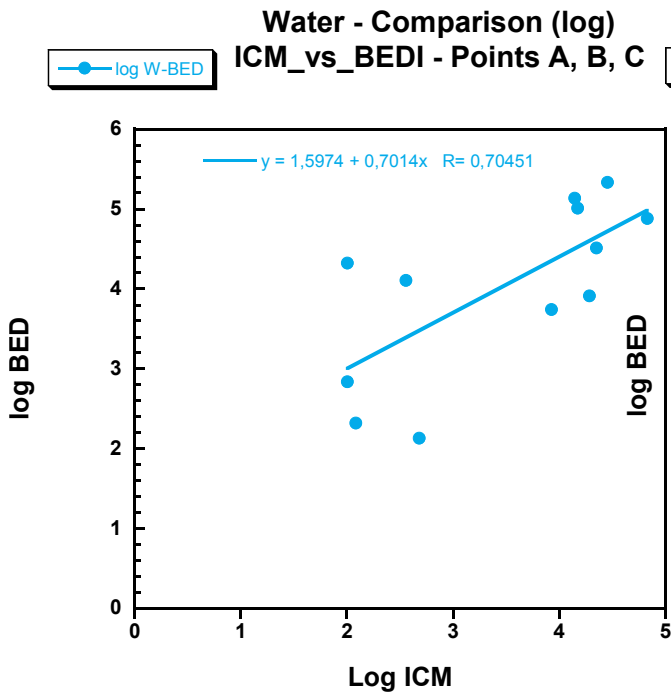


Figura 36. Correlació del logaritme de la mitjana de cèl·lules d'Ostreopsis a l'aigua del mètode BEDI versus el logaritme de la mitjana de les cèl·lules d'Ostreopsis a l'aigua del mètode de l'ICM.

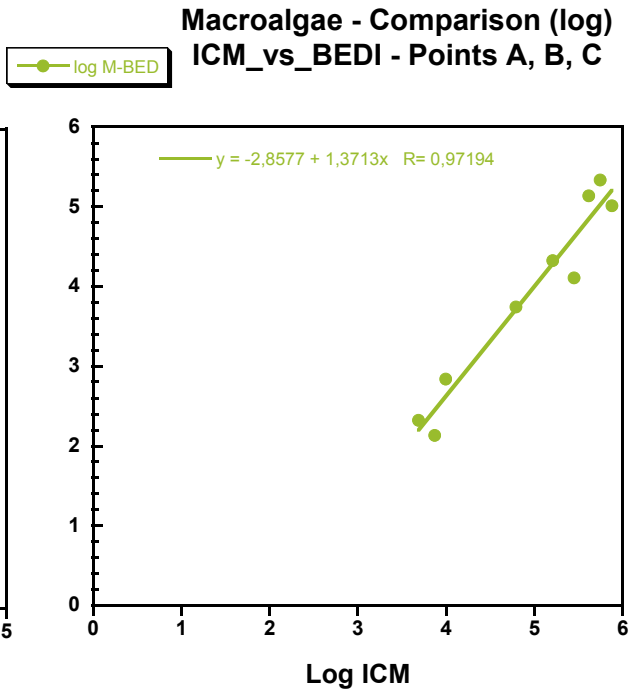


Figura 37. Correlació del logaritme de la mitjana de cèl·lules d'Ostreopsis a la macroalga del mètode BEDI versus el logaritme de la mitjana de les cèl·lules d'Ostreopsis a la macroalga del mètode de l'ICM.

#### d) Comparació dels 3 mètodes

Finalment, es presenten totes les mostres de tots els mètodes a la Figura 35; per una banda, mostres d'aigua de l'ICM (línia blau fosc) i de l'M3-HAB (línia blau clar); per altra banda, mostres de macroalga de l'ICM (línia verd fosc) i de l'M3-HAB (línia verd clar); i finalment, de color burdeus, la metodologia del BEDI que integra l'aigua i la macroalga. En totes elles es representa també la corresponent la desviació estàndard.

Es pot observar que les mostres d'aigua presenten la mateixa tendència amb tots els mètodes, els quals poden detectar presència de cèl·lules al mateix temps. El mètode de l'ICM tendeix a estimar en general concentracions més altres, però dins del mateix ordre de magnitud. Les mostres de macroalga també presenten la mateixa tendència al llarg de tota la proliferació d'Ostreopsis.

El BEDI, estima unes concentracions relatives (expressades en cèl·lules·cm<sup>2</sup>) per sobre de les mostres d'aigua, però per sota de les de macroalga. Com ja s'ha comentat, però, les unitats no són comparables.

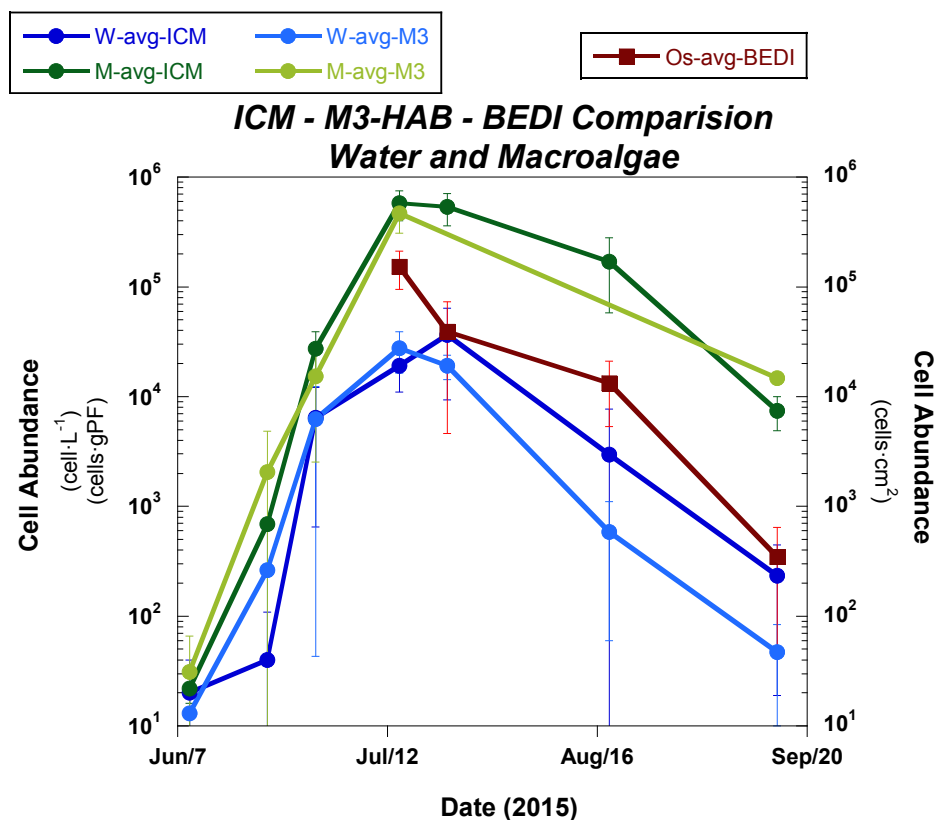


Figura 38. Correlació del logaritme de la mitjana de cèl·lules d'*Ostreopsis* a la macroalga del mètode BEDI versus el logaritme de la mitjana de les cèl·lules d'*Ostreopsis* a la macroalga del mètode de l'ICM.

## DISCUSSIÓ

Per estructurar la discussió dels resultats, s'anirà de la petita escala de variabilitat (la dels recomptes) al microscopi, passant per l'espacial (mostreigs dels punts A, B i C) a la temporal de més amplitud, per acabar plantejant les conclusions sobre la comparació dels mètodes.

**1) Precisió (o error) en els recomptes.** Gràcies a la metodologia de l'M3-HAB, es va poder analitzar la precisió en el recompte al microscopi. Cal afegir que totes les mostres han estat comptades per la mateixa persona i amb el mateix microscopi per disminuir l'error. De manera general, les concentracions d'*Ostreopsis* epífit sobre la macroalga presenten menys error (SEM) que les d'aigua. Això és degut al fet que les quantitats de cèl·lules són més elevades en la cubeta de recompte en les mostres d'epífits que no pas en les mostres planctòniques. Així, quan hi ha poques cèl·lules a les mostres, als gràfics queda reflectit com una gran diferència entre els punts (a part de l'efecte visual d'emprar escala logarítmica). Donat que l'error dels recomptes està perfectament establert (Taula 3), i disminueix al augmentar el nombre de cèl·lules contades, al principi i al final de la proliferació i en mostres de l'aigua sobretot, es recomana d'utilitzar el mètode Utermöhl amb columnes de sedimentació de 50 mL (per tal de contar un nombre de cèl·lules més elevat. Les cambres Sedgewick-Rafter només són útils per a les mostres d'epífits sobre la macroalga. En els altres casos intermedis, cal sedimentar 10 mL.

**2) Variabilitat en el mostreig espacial.** Aquest estudi també ha permès estudiar la variabilitat espacial a petita escala, ja que s'han mostregjat tres punts (Pins Mar A, B i C) separats uns 10

metres. En general, les concentracions d'*Ostreopsis* a l'aigua són més diferents entre els punts mostrejats, tant pel mètode de l'ICM com pel de l'M3-HAB, que les concentracions d'epífits sobre la macroalga. Tot i així, el Punt B, en els dos mètodes, presenta concentracions més altes a l'aigua. Aquest fet podria reflectir una ubicació peculiar d'aquest punt B, que representés una zona on l'*Ostreopsis* creixi amb més quantitat i també es desprengui de les macroalgues cap a l'aigua amb més facilitat, o bé que la circulació afavoreixi que hi quedin durant més temps les microalgues nedant a la columna d'aigua. Normalment, l'ICM ha mostregat intensament el punt A. En aquests moments, aquest és un aspecte que no es pot concloure i requereix més recerca.

En canvi, les concentracions sobre la macroalga en els tres punts són pràcticament iguals, donant a entendre que no hi ha diferència entre els punts ni entre els mètodes pel que fa al bentos. Aquest és un punt força interessant, perquè de fet, la població d'*Ostreopsis* epífita és el reservori principal de la proliferació al llarg de tota la temporada. Mentre hi hagi *Ostreopsis* epífita hi ha risc de problemes respiratoris o de proliferacions massives que poden afectar altres organismes de l'ecosistema. En canvi, la població de cèl·lules a l'aigua seran "rentades" pels corrents marins. De tota manera, potser és aquesta població planctònica la que pot contribuir a fer aerosols que continguin compostos irritatius. Per tant, a efectes del monitoratge, l'equip d'investigadores de l'ICM considera necessari mantenir el doble mostreig, sobre l'aigua i sobre la macroalga, a efectes de determinar el risc d'exposició als efectes nocius de les proliferacions d'*Ostreopsis*.

**c) Evolució temporal: comparació dels tres mètodes.** L'evolució temporal de la proliferació d'*Ostreopsis* tant a l'aigua com epífita sobre la macroalga va mostrar patrons molt similars, tant si les mostres es van obtenir i analitzar amb el mètode de l'ICM com del projecte M3-HAB. Quan les concentracions de cèl·lules són molt elevades, els dos mètodes presenten concentracions pràcticament iguals i quan no són tan elevades no difereixen més d'un ordre de magnitud. Amb un coeficient de determinació ( $r^2$ ) de 0.84 per a l'aigua i de 0.87 per a la macroalga (Figura 35), unes SD baixes en general i concentracions molt semblants durant tota la proliferació, es pot dir que són comparables. La bona correlació entre els dos mètodes suggereix que si fos necessari, es podrien obtenir funcions de conversió matemàtica entre ells, de manera que les dades obtingudes pels dos equips de recerca es poguessin ajuntar dins una base de dades única. Això és un molt bon resultat d'aquest treball, ja que amb una base de dades comuna es podrà estudiar, per exemple, la tendència de la població d'*Ostreopsis* en diferents punts del Mediterrani.

A més els dos mètodes permeten poder donar uns valors d'alerta de les concentracions d'*Ostreopsis* per tal que les autoritats sanitàries decideixin tancar una platja als banyistes. Per exemple, a partir de  $10^4$  cèl·L<sup>-1</sup> per l'aigua o  $10^5$  cèl·gPF per macroalga s'ha proposat en alguns casos aquestes mesures (Tichadou et al. 2010). Si es tenen en compte aquest valors i s'apliquen als resultats obtinguts en aquest estudi, la platja de Llanerres hagués hagut d'estar tancada entre mitjans de juliol i mitjans d'agost. No obstant, darrerament les diferents administracions responsables de la salut en les platges, prefereixen avisar a la població però no prendre mesures tan dràstiques com el seu tancament.

Pel que fa al BEDI, recordar un cop més que no és possible comparar les unitats perquè no tenen res a veure. Tot i que no es va poder usar durant tota la temporada de mostreig, els 4 mostreigs realitzats permeten treure algunes conclusions. L'evolució temporal segueix força paral·lela a l'observada tant a la població d'*Ostreopsis* a l'aigua com a l'epífita. Ja s'ha comentat que aquest mètode integra la mostra d'aigua i la de macroalga. Com que la densitat relativa de cèl·lules epífites és més gran que a l'aigua, les mostres obtingudes amb el BEDI tenen una

abundància cel·lular que les fa fàcilment quantificables al microscopi mitjançant la cambra Sedgewick-Rafter, amb un error de recompte relativament petit. Per això es creu que és un mètode prometedor per a mostreigs ràpids, sempre que les condicions ambientals ho permetin. Així, a la zona d'estudi, només es pot posar on les aigües són molt poc profundes (Punts Pins Mar A, B i C) i l'aigua està tranquil·la. A Blau Mar, on la zona està sempre molt afectada per l'onatge, no va ser possible utilitzar-lo en la major part dels dies (dades no presentades en aquesta memòria).

Un avantatge que pot tenir el mètode BEDI és que no comporta arrencar macroalga. En el nostre lloc d'estudi, la macroalga és molt abundant i no hi ha cap problema d'alteració del medi ambient en els mostreigs realitzats. En canvi, en altres hàbitats on la macroalga sigui poc abundant o l'*Ostreopsis* creixi sobre un altre substrat viu com els coralls (en els tròpics és una situació comuna), o directament sobre la roca, el mètode BEDI pot justament permetre un mostreig molt sostenible i apropiat. En aquest sentit, el BEDI és també molt prometedor i adaptable a la problemàtica de la intoxicació per ciguatera, que afecta a molts habitants del tròpic.

En aquests moments, encara és d'hora per a establir rangs de concentracions d'alerta amb el mètode BEDI, per tal determinar el tancament de la platja. S'espera conèixer els resultats dels altres grups de recerca a Itàlia i França. Veient que en aquest estudi, la tendència general ha estat similar als altres dos mètodes, pot ser fàcil fer una comparació entre ells i trobar les rectes d'intercal·libració.

La taula 4 resumeix les avantatges i inconvenients dels mètodes estudiats.

Taula 4. Avantatges i inconvenients dels tres mètodes de mostreig.

MÈTODE	Avantatges	Inconvenients
<b>ICM</b>	Comparable amb dades existents	- Laboriós al laboratori - No integra variabilitat bentos i plàncton
<b>M3-HAB</b>	Comparable amb dades existents	- Laboriós al laboratori - No integra variabilitat bentos i plàncton
<b>BEDI</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Única mostra</li> <li>- Molt ràpid tant al camp com al laboratori</li> <li>- Integra més variabilitat bentos i plàncton al mostrejar una superfície més gran</li> <li>- Reducció del material de mostreig</li> <li>- Possible aplicació a zones protegides (quan el substrat són coralls)</li> <li>- Possible aplicació quan el substrat és roca nua</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- No sempre es pot utilitzar (substrat pla, poc onatge..)</li> <li>- Encara no hi ha dades històriques per comparar.</li> <li>- Cal determinar els rangs de concentració per a establir els nivells d'alerta.</li> <li>- Cal tenir l'aparell</li> </ul>

## CONCLUSIONS

The *Ostreopsis*' bloom in Sant Andreu de Llavaneres the summer of 2015 shows the typical temporal dynamics observed in this genus' blooms described in the north-western Mediterranean.

With the taken samples it is possible to clearly distinguish exponential phase, maintenance phase and decline's, regardless of the methodology (ICM and M3-HAB methods).

This study corroborates that, with any of the two methods used (ICM and M3-HAB), *Ostreopsis* is preferentially a benthonic organism, because the maximums macroalgae's concentrations are always higher than in water.

*Ostreopsis* dynamics and concentrations in water and macroalgae obtained with ICM and M3-HAB are very similar, and they are correlated  $r^2= 0.83$  and  $r^2= 0.86$  respectively.

ICM's method detects slightly higher concentrations than M3-HAB's method, both plankton samples and benthos, but this differences are relatively small, they are never over than an order of magnitude. This suggests that to detect the maximum number of cells is better to take a surface sample (as ICM does) and not subsuperficial (as M3-HAB does). In reference to benthic samples, it seems that is more effective an only minute shake with a lower water dilution (ICM method) than the consecutive shake dilutions that M3-HAB method does. However, despite the variability associated with the low number of counts in the first sample, both methods (ICM - HAB and M3-HAB) detect the first cells simultaneously.

Regarding to the organism's distribution on a small scale, the obtained results of the three points (Pins Mar A, B and C) show that *Ostreopsis*' average concentration in macroalgae samples have a lower variability than planktonic ones. As explained before, the number of cells counted determines the accuracy of the count. Thus, the standard deviation (SD) associated with higher counts (ex.: macroalgae samples) is always lower. In water samples, although the points follow the same trend, there are some differences in different sampling times (always lower than one order of magnitude). This result was expected and may be due to several factors that cause resuspension and redistribution of cells (waves, wind, swimmers, etc.). Nevertheless, the bloom dynamics can be followed perfectly sampling in any of the three points analysed in this study.

As mentioned above, BEDI's method could only detect bloom's final phase because it was not possible to have the sampling device until mid-July, when bloom's peak occurs. BEDI's method has several advantages, such as sampling speed and sample processing, but it can only be used in certain situations (shallow, calm sea, flat land). Currently, there are only the first counts available with this method, but it seems to be a useful tool in certain circumstances, mostly during the bloom.

## BIBLIOGRAFIA

Barroso, P., et al. (2008). Brote con síntomas respiratorios en la provincia de Almería por una posible exposición a microalgas tóxicas. *Original Breve Gac Sanit.* 2008; 22(6):578-84

Bolli L, Llavera G, Garcés E, Guadayol O, Van Lenning K, Peters F, and Berdalet E. (2007). Modulation of ecdysal cyst and toxin Dynamics of two *Alexandrium* species under small-scale turbulence. *Biogeosciences* 4, 559–567.

Casabianca, S. et al. (2013). Quantification of the toxic Dinoflagellate *Ostreopsis* spp. By qPCR Assay in Marine Aerosol. *Environ. Sci. Technol.* 2013, 47, 3788–3795

Giussani, V. et al. (2015). Active role of the mucilage in the toxicity mechanism of the harmful benthic dinoflagellate *Ostreopsis* cf. *ovata*. *Harmful Algae*, 44, 46-53.

IOC (Intergovernmental Oceanographic Commission) Manuals and Guides. (2010). *Microscopic and molecular methods for quantitative phytoplankton analysis*. 55.

Mangialajo L, Ganzin N, Accoroni S, Asnaghi V, Blanfuné A, Cabrini M, Cattaneo-Vietti R, Chavanon F, Chiantore M, Cohu S, Costa E, Fornasaro D, Grossel H, Marco-Miralles F, Masó M, Reñé A, Rossi AM, Sala MM, Thibaut T, Totti C, Vila M, Lemée R. (2011). Trends in *Ostreopsis* proliferation along the Northern Mediterranean coasts. *Toxicon* (57): 408-420

Rhodes, L., World-wide occurrence of the toxic dinoflagellate genus *Ostreopsis* Schmidt, *Toxicon* (2010) 57: 400-407

Tichadou L., Glaizal M., Armengaud A., Grossel H., Lemée R. And Kantin R. 2010. Health impact of unicellular algae of the *Ostreopsis* genus blooms in the Mediterranean Sea: Experience of the French Mediterranean coast surveillance network from 2006 to 2009. *Clin. Toxicol.* 48: 839-844.

Vila, M., i Garcés, E., Masó. M. (2001). Potentially tòxic epiphytic dinoflagellate assemblages on macroalgae in NW Mediterranean. *Aquatic Microbial Ecology*, 26, 51-60.

Vila M., Masó M., Sampedro N., Illoul H., Arin L., garcés E., Giacobbe M.G., Àvarez J., Camp J. 2008. The genus *Ostreopsis* in recreational waters of the Catalan Coast and Balearic Islands (NW Mediterranean Sea): is this the origin of human respiratory difficulties? In Moestrup. Et al. (eds.)

Proceedings of the 12<sup>th</sup> International Conference on Harmful Algae, Copenhagen, Denmark, 4-8 September 2006. ISSHA and IOC of UNESCO, Copenhagen, 334-336.

Vila et al. (2012) A Three-Year Time Series Of Toxic *Ostreopsis* Blooming in A NW Mediterranean Coastal Site: Preliminary Results. Proceedings of the 14th International Conference on Harmful Algae in Crete, Greece.