

Proliferacions nocives d'*Ostreopsis* a Sant Andreu de Llvaneres

Estudiant: Sara Barrancos Martorell
Correu electrònic:

Grau en Biologia

Tutor acadèmic: Dr. Jose Luis Garcia Marin
Tutores de les pràctiques: investigadores Elisa Berdalet i Magda Vila

ÍNDEX

1. Introducció
2. Institució
3. Recull de les activitats realitzades
 - 3.1. “Seguiment de la proliferació de la dinoflagel·lada *Ostreopsis* a la platja de Llanereres”
 - 3.1.A. Mètodes de mostreig de camp
 - a) Plàncton
 - b) Epífits
 - c) Integrat plàncton i bentos: BEDI
 - 3.1.B. Protocols de les anàlisis al laboratori
 - 3.1.C. Mètodes de recompte de cèl·lules al microscopis
 - a) *Utermöhl*
 - b) *Sedgewick-Rafter*
 - 3.2. Experiments amb eriçons
 - 3.3. Experiment de sensibilitat a l’agitació per part d’*Ostreopsis*
4. Exemples d’alguns resultats preliminars
5. Bibliografia

1. Introducció

Les pràctiques d'empresa les he realitzat al Departament de Biologia Marina i Oceanografia de l'Institut de Ciències del Mar (ICM-CSIC) de Barcelona durant tot l'estiu de l'any 2016. M'he unit a un projecte que s'anomena *Proliferacions nocives de *Ostreopsis* en el Mediterráneo noroccidental: evaluació de los riesgos potenciales para la salud (CTM2014--53818-R)*. Es basa en l'estudi de les proliferacions d'*Ostreopsis* (imatge 2), una dinoflagel·lada microscòpica bentònica d'origen tropical, a Sant Andreu de Llaveneres. Aquesta forma un mucíl·lag sobre alguns substrats del fons marí i unes escumes a les platges, i a més, en algunes ocasions provoca dificultats respiratòries en persones que es troben a prop de la platja, sense necessitat d'estar en contacte amb l'aigua, i reaccions cutànies.

El seguiment de la comunitat d'*Ostreopsis* es realitza mitjançant mostrejos de camp; també s'estudia la seva fisiologia en experiments al laboratori. Al camp, s'obtenen mostres per a fer recomptes de cèl·lules al microscopi òptic, estimació de la biomassa fotosintètica mitjançant la mesura de la clorofil·la, analitzar la presència de toxines, i d'altres paràmetres físics, biològics i químics.. A més a més s'han fet experiments per veure si la turbulència de l'aigua afecta o no al creixement de la comunitat microbiana, i especialment de l'*Ostreopsis*. També s'han fet experiments d'alimentació amb eriçons de mar per avaluar si la ingestió de macroalga colonitzada per la dinoflagel·lada implica una incorporació de la toxina en el seu teixit o simplement l'acumulen temporalment en l'aparell digestiu.

Els mostrejos de camp es realitzen a Sant Andreu de Llaveneres (El Maresme), un municipi a 36 km al nord de Barcelona. S'han estipulat 5 punts de mostreig (imatge 1): tres davant del restaurant Pins Mar (PMA, PMB, PMC; separats entre ells per 10 metres), un davant dels apartaments Blau Mar (BM) i un en una Rampa (R) que hi ha al costat del restaurant. El punt més important i on s'agafen més mostres es el punt de Pins Mar A.



Imatge 1 Mapa de Sant Andreu de Llaveneres i dels punts de mostreig, extret de Google Maps i editat per Sara Barrancos

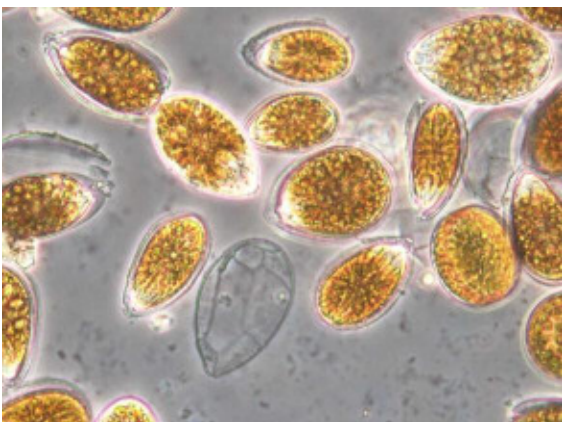
2. Institució

L'Institut de Ciències del Mar (ICM) pertany a l'àrea de Recursos Naturals del Consell Superior d'Investigacions Científiques (CSIC) del Govern d'Espanya. És el centre més gran de recerca marina d'Espanya i es dedica íntegrament a l'estudi de mars i oceans. El seu equip consta de més de 200 especialistes en els diferents aspectes de la recerca oceanogràfica: física, química, geologia i biologia. D'aquesta manera es pot construir una visió global de l'ecosistema marí i se'n poden valorar canvis i impactes mediambientals i així poder-ne cercar solucions. Es participa en projectes tan nacionals com internacionals i en campanyes oceanogràfiques arreu del món. També des de 1955, l'ICM publica una revista dedicada a l'oceanografia: *Scientia Marina*. És l'única revista científica marina i internacional que es publica a l'Estat espanyol.

A l'ICM hi ha quatre departaments i altres serveis com el de divulgació científica i comunicació o serveis tècnics com la Zona d'Aquaris Experimentals (ZAE), Anàlisi de Nutrients, Instrumentació i Microscopi Electrònic.

- El departament de Biologia Marina i Oceanografia realitza una investigació bàsica de molts aspectes de l'ecologia bentònica i planctònica. S'estudien els organismes, des dels virus fins al zooplàncton, meduses i corals, des del punt de vista descriptiu i de la seva dinàmica de processos.
- El departament de Geociències Marines orienta la seva investigació als processos sedimentaris en marges continentals i conques oceàniques amb aplicacions com ara contaminació dels sediments, dinàmica de la línia de costa, prospeccions petrolieres o activitat sísmica.
- El departament d'Oceanografia Física i Tecnològica centra els seus estudis en descriure i explicar el comportament físic de l'oceà i el seu paper en el clima de la Terra, utilitzant els principis de la mecànica de fluids i la termodinàmica, observacions de satèl·lit, noies a la deriva i campanyes oceanogràfiques.
- El departament de Recursos Marins Renovables basa les seves investigacions en l'estudi de la biologia i ecologia d'espècies marines explotades (peixos, crustacis i mol·luscs) i dels ecosistemes on hi habiten.

Cada departament es basa en projectes de recerca científica. El projecte en el qual m'he unit és el projecte **Ostreorisk**, del departament de Biologia Marina i Oceanografia, liderat per les investigadores Elisa Berdalet i Magda Vila, centrat en l'estudi de les proliferacions nocives d'*Ostreopsis cf. ovata* (Imatge 2) a Sant Andreu de Llavaneres.



Imatge 2 Fotografia d'*Ostreopsis cf. ovata* feta al microscopi òptic invertit

3. Recull de les activitats realitzades

3.1. “Seguiment de la proliferació de la dinoflagel·lada *Ostreopsis* a la platja de Llanereres”

3.1.A. Mètodes de mostreig de camp

En el mostreig de camp s'utilitzen mètodes específics per a l'obtenció de diversos paràmetres necessaris per a la caracterització ecològica de la dinàmica de les proliferacions d'*Ostreopsis*.

Es realitza en els punts explicats anteriorment de la platja de Sant Andreu de Llanereres (Imatge 1). S'agafen mostres diverses d'aigua directament en pots o bé es filtren, segons el paràmetre. Tot el material utilitzat ha d'estar prèviament retolat, amb cintes de colors (taronja per a la Rampa, verd per a Pins Mar i blau per a Blau Mar) per a identificar el lloc d'extracció. Cal tenir en compte que no a tots els punts s'agafa tot. A la següent taula (Taula 1) s'assenyala amb una creu quines mostres s'agafen a cada punt del mostreig:



Imatge 3 Fons marí colonitzat per *Ostreopsis cf. ovata*

Taula 1.

			Punt de mostreig				
			Rampa	Pins Mar			Blau Mar
				A	B	C	
Mostres	Aigua	Nutrients inorgànics i totals	X	X			X
		TOC	X	X			X
		Fitoplàncton	X	X	X	X	X
		Filtre per a clorofil·la	X	X	X	X	X
		Filtre per a toxina I	X	X	X	X	X
	Macroalga	Fitoplàncton		X	X	X	X
		Filtre per a clorofil·la		X	X	X	X
		Filtres per a toxina I i II		X	X	X	X
		Filtres per a bioquímica I i II		X	X	X	X
		BEDI		X	X	X	

a) Procediment de recollida de mostres per a la caracterització de la columna d'aigua i plàncton:

* ... Nutrients inorgànics i totals:

1. Dos pots Falcon de 50 ml s'esbandeixen tres vegades amb aigua de mar *in situ* i s'omplen d'aigua.
2. Es posa a una bossa isotèrmica amb gel.
3. Es transporta al laboratori.

* ... Nutrients orgànics: Mètode pel TOC (*Total Organic Carbon*):

1. S'agafa aigua en un pot de plàstic especial (HDPE, 30 ml) per a l'anàlisi de carboni orgànic.
2. Es fixa amb 30 microlitres d'àcid fosfòric, usant una micropipeta.
3. Es transporta al laboratori dins la bossa isotèrmica.

* ... Abundància de fitoplàncton:

1. En un pot estrella gran (250 ml) s'agafa aigua fins a dalt.
2. S'hi afageix lugol per a fixar-ne la mostra.
3. Es transporta al laboratori.

* ... Paràmetres bioquímics:

1. Per a la clorofil·la es filtren 60 ml d'aigua amb un filtre de fibra de vidre GF/F en un suport tipus Swinnex amb xeringa graduada.
2. Per a les toxines es repeteix el pas 1 filtrant 120 ml.
3. Quan ja s'ha filtrat, s'obre el Swinnex i, amb compte de no tocar el filtre, es plega amb unes pinces i s'emmagatzema en el criovial corresponent. Cal fer-ho per a cadascun dels filtres.
4. Els criovials es guarden dins la bossa isotèrmica i es transporten al laboratori, on seran congelats a -20C (clorofil·les) o -80C (els altres).

b) Procediment de recollida de mostres per a la caracterització de la comunitat epifítica sobre la macroalga, amb especial èmfasi en l'*Ostreopsis*:

1. S'agafa un matoll petit (aproximadament uns 10 grams) de macroalga i se n'identifica l'espècie. Les espècies que normalment s'agafen són aquelles que tenen una elevada relació de superfície/volum, com per exemple *Corallina elongata*, *Jania rubens* o *Halopteris scoparia*, i en base a l'experiència prèvia, en aquesta zona, se sap que hi colonitza l'*Ostreopsis*.
2. Es posa la macroalga en un pot buit tipus "tap d'estrella" (d'uns 250 ml de capacitat) i s'hi aboquen 180 ml d'aigua de mar acabada de filtrar per un filtre de fibra de vidre GF/F.
Nota: És important saber exactament el volum d'aigua filtrada per a poder després fer els càlculs de concentració d'*Ostreopsis* epífita sobre la macroalga.
3. Es tanca bé i s'agita fort durant 1 minut.
4. L'aigua que conté les cèl·lules epífites que s'han després de la macroalga amb l'agitació es passa per un tamís de 200 micres i es recull en un altre pot net (Imatge 4).
5. La macroalga escorreguda es recull en un pot de vidre prèviament tarat al laboratori i es guarda apart.
6. L'aigua que conté els organismes epífits de la macroalga (punt 4) es filtra per un filtre GF/F amb Swinnex per a estimar a la concentració de clorofil·les, toxines (I i II) i altres paràmetres bioquímics que per ara no s'han assignat. Els volums filtrats poden variar segons l'abundància de cèl·lules en cada moment de la proliferació, però generalment seran: 5 ml per a les clorofil·les i 10 -20 ml per a cada filtre de toxines i bioquímica.
Nota: El fluorímetre (aparell on s'analitzen les mostres de clorofil·la) és molt sensible. Si hi ha massa clorofil·la cal diluir la mostra. Per aquesta raó es filtren només 5 ml.
7. Una alíquota del punt 4 es posa en un potet tipus tap d'estrella d'uns 125 ml i es fixa amb lugol per a estimar el nombre de cèl·lules epífites al microscopi òptic.

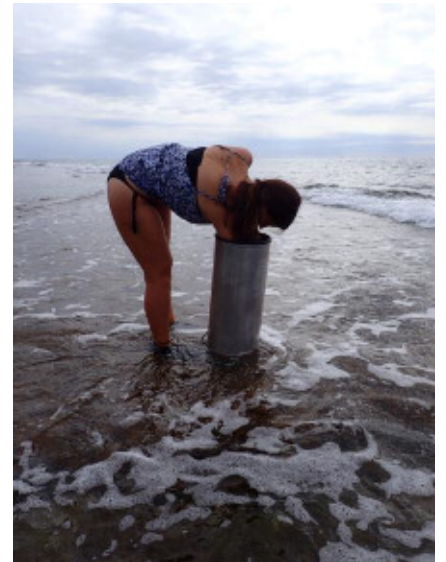
8. El volum restant s'aboca en un flascó transparent (del tipus utilitzat per als cultius de teixit) per a la observació de la mostra viva al microscopi òptic en arribar al laboratori. D'aquesta manera es poden veure els organismes nedant o altres aspectes biològics.



Imatge 4 Resuspès d'*Ostreopsis epífita* sobre la macroalga recollida

c) **Mètode BEDI (Benthic Device Integrator):** És un mètode que permet estimar la concentració de cèl·lules de manera integrada a la columna d'aigua i epífita sobre el bentos.

1. En un punt no trepitjat anteriorment i amb el sòl regular, es col·loca el cilindre dissenyat especialment (veure Imatge 5) pel mostreig integrat de microalgues planctòniques i bentòniques.
2. S'anota el nivell al qual arriba l'aigua dins el cilindre per a calcular el volum d'aigua en què s'han resuspès les cèl·lules.
Nota: S'ha d'anar en compte de que no entri aigua quan hi hagi onades.
3. Remoure el fons amb el pot estrella per a què es desprenguin els organismes epífits (com l'*Ostreopsis*) de la macroalga i si és el cas, la sorra o roca. És la manera de tenir mostra re-suspensa conjunta tant de la macroalga com de la columna d'aigua.
4. Fixar la mostra amb lugol i transportar al laboratori.



Imatge 5 Utilització del mètode BEDI al camp

3.1.B. Protocols de les anàlisis al laboratori

- Els pots Falcon amb els nutrients i les mostres del TOC es guarden al congelador del laboratori d'anàlisis de nutrients (-20°C), on seran analitzades per personal especialitzat utilitzant equips autoanalitzadors de nutrients inorgànics (nitrat, nitrit, amoni, fosfat i silicat, amb l'AA3 de Bran-Luebbe), de nitrogen i fòsfor total (amb Alliance) i carboni (amb el TOC-L de Shimadzu).
- Els criovials on hi ha mostres de clorofil·les cal posar-los en un congelador a -20°C. Les mostres de toxines i de bioquímica s'ultracongelen a -80°C. Seran analitzades per diferents especialistes de la Facultat de Química de la Universitat de Barcelona, els quals col·laboren amb el projecte.
- La macroalga:
 1. Cal deixar-la escórrer en un tros de paper.
 2. Un cop tret l'excés d'aigua, s'ha de pesar i apuntar-ne el pes fresc (PF = pes total-pes tara).
 3. Quan ja s'ha pesat es posa a l'estufa (a 60°C).
 4. Al cap d'una setmana es torna a pesar per a obtenir el pes sec (PS = pes total-pes tara).

D'aquesta manera les abundàncies cel·lulars es podran referir al per fresc o pes sec de la macroalga mostrejada.

- Neteja dels pots que s'utilitzen per a l'anàlisi de TOC per a la setmana següent:

1. Esbandir amb aigua destil·lada.
2. Omplir amb àcid clorhídric (HCl al 10%) i deixar-lo tota la nit.
3. A l'endemà esbandir altre cop amb aigua destil·lada.
4. Al camp, abans d'utilitzar-se, esbandir amb aigua de mar.

3.1.C. Mètodes de recompte de cèl·lules

Aquest també és un protocol de laboratori que s'explica en detall ja que és el que he practicat més durant la meva estada a l'Institut de Ciències del Mar. En els recomptes de cèl·lules realitzats setmanalment s'utilitzen dos mètodes diferents en funció de les densitats cel·lulars de les mostres:

a) Mètode *Utermöhl*: És el mètode usat normalment per a quantificar les concentracions de les microalgues al plàncton. Se sedimenten 50 ml de la mostra d'aigua corresponent en una columna de sedimentació durant aproximadament 24 hores. Si hi ha molta densitat, es poden usar columnes més petites (de 10 ml) i si n'hi ha menys, més grans (de 100 ml).

El mètode *Utermöhl* es basa en la sedimentació d'una alíquota de mostra d'aigua en una columna de sedimentació instal·lada sobre una cubeta. La gravetat fa que les cèl·lules de fitoplàncton (mortes, fixades) es sedimentin i es dipositin al fons de la cubeta. S'identifica i recompta utilitzant un microscopi invertit. Al moment d'observar la mostra, al costat d'una pica o recipient adequat, s'enretira la columna fent-la lliscar sobre la cubeta acompanyada d'un cobreobjectes molt gruixut de vidre. El líquid cau a la pica o recipient. A la cubeta hi queda un volum de 10 ml.

b) Mètode *Sedgewick Rafter*: És un mètode molt tradicional de recompte de cèl·lules. Consta d'una base transparent, sobre la qual hi ha muntada una cambra d'1 ml de capacitat. Es cobreix amb un cobreobjectes. Les cubetes poden ser tant de vidre com de plàstic.

S'utilitzen idòniament pel recompte de cèl·lules de mida compresa entre 20 i 500 micròmetres. Es poden utilitzar tant al microscopi òptic directe com a l'invertit. Porten marcada una quadrícula de 50 columnes per 20 files, que faciliten el recompte ja que es poden comptar petites fraccions de la càmera si la densitat de la mostra és molt alta. No és un mètode apropiat per al recompte de de mostres amb baixa densitat de fitoplàncton, ja que serveixen per estimar la densitat cel·lular en mostres de camp amb elevada biomassa ($>10^5$ cèl·lules/L) i en mostres de cultiu.

En ambdós casos (*Utermöhl* i *Sedgewick Rafter*) el nombre de cèl·lules comptades ha de ser elevat per tal de disminuir l'error de recompte. Hi ha una relació (Taula 2) entre el número de cèl·lules comptades i límit de confiança al 95% de significació (per Edler 1979, Andersen i Thronsdén 2004). A la taula s'observa com al passar de comptar 200 cèl·lules a 400, gairebé no canvia l'error. És per això que es compten un mínim de 200 cèl·lules per tenir un error petit.

No of counted cells	Confidence limit +/- (%)	Absolute limit if cell density is estimated at 500 cells L ⁻¹
1	200	500 ± 1000
2	141	500 ± 705
3	116	500 ± 580
4	100	500 ± 500
5	89	500 ± 445
6	82	500 ± 410
7	76	500 ± 380
8	71	500 ± 355
9	67	500 ± 335
10	63	500 ± 315
15	52	500 ± 260
20	45	500 ± 225
25	40	500 ± 200
50	28	500 ± 140
100	20	500 ± 100
200	14	500 ± 70
400	10	500 ± 50
500	9	500 ± 45
1000	6	500 ± 30

Taula 2. Relació entre el nombre de cèl·lules comptades i límit de confiança al nivell de significació del 95% (Edler 1979, Andersen i Thronsdén 2004).

Per a estimar la concentració de les microalgues epífites sobre la macroalga del projecte *Ostreorisk* es sedimenten, a l'inici i al final de la proliferació, 10 ml en una cubeta durant 4 hores. A mesura que va avançant el bloom s'utilitza el mètode *Sedgewick Rafter*, on se sedimenta només 1 ml. Es fa perquè amb 10 ml ja no es veu res degut a la quantitat de cèl·lules que hi ha.

Amb aquests mètodes es recompta el número de cèl·lules al microscopi òptic invertit de la columna d'aigua i de la població epífita de la macroalga. Es miren les diatomees i els dinoflagel·lats més abundants. Seran, bàsicament, les següents espècies:

Dinoflagel·lades:

- *Ostreopsis cf. ovata*
- *Coolia monotis*
- *Prorocentrum lima*
- *Prorocentrum rhathynum*
- *Amphidinium sp.*

Diatomees:

- *Coscinodiscus spp.*
- *Lichnophora spp.*
- *Striatella spp.*
- Diatomees (pennades i centrals)

Nota: S'utilitza un microscopi òptic invertit per a poder visualitzar bé les cèl·lules que, al sedimentar per gravetat es troben al fons de la cubeta.

S'apunta a l'excel corresponent amb la resta de dades.

En el cas del mètode BEDI: Al principi de la proliferació s'utilitza el mètode *Utermöhl* i se sedimenten 10 ml. Quan la quantitat de cèl·lules per mil·lilitre d'aigua augmenta molt, s'utilitza el mètode de *Sedgewick Rafter*. Es recompta el número de cèl·lules al microscopi òptic invertit de les següents espècies:

- *Ostreopsis cf. ovata*
- *Coolia monotis*
- *Prorocentrum lima*
- *Amphidinium sp.*

S'apunta a l'excel corresponent amb la resta de dades.

2.2. Experiment amb eriçons

Objectiu: Veure si els eriçons de mar que ingereixen macroalga recoberta d'*Ostreopsis* experimenten alguna afectació externa i/o interna. És a dir, si incorporen les toxines als teixits o si només la presenten en el sistema digestiu temporalment fins a excretar-la. Hi ha uns eriçons control, als quals se'ls dona de menjar macroalgues sense *Ostreopsis*.

Treball de camp:

Eriçons

1. Recollir 10 eriçons amb un ganivet d'immersió, fent palanca per a desenganxar-los del medi i posar-los en una galleda (Imatge 5).
2. Transportar-los al laboratori en una nevera amb aigua de mar i pastilles de gel.



Imatge 5 Extracció dels eriçons del medi marí

Aliment

1. Agafar algues de Llanereres, les quals estaran plenes d'*Ostreopsis*, com a aliment d'un dels grups d'erriçons.
2. Agafar algues d'una platja on es comprovi que no hi ha *Ostreopsis* per a alimentar a l'altre grup d'erriçons. Cal sacsejar i netejar molts cops la macroalga per a treure'n les espècies epífites que pugui tenir. Una alíquota de l'aigua amb la que hem netejat les macroalgues es mira al microscopi per assegurar l'absència de d'*Ostreopsis*.
3. Posar les macroalgues en bossetes petites de manera que es distribueixi en quantitats similars.
4. Transportar-les dins la nevera.

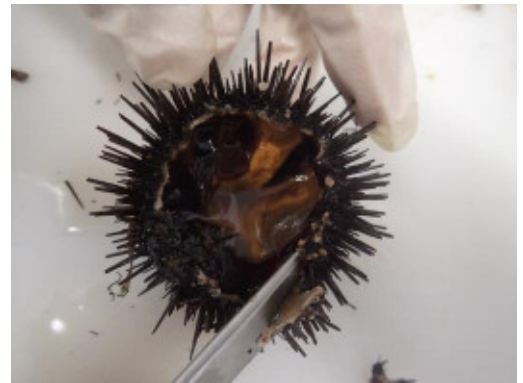
Laboratori:

1. Introduir els eriçons en dues peixeres plenes d'aigua (5 en cada peixera) i amb aireació.
Nota: Han d'estar en una cambra de la Zona d'Aquaris Experimentals (ZAE), les dues peixes juntes per a que les condicions del medi (temperatura i llum) siguin les mateixes.
2. Retolar una de les peixeres com a "Tòxic", que seran els eriçons als quals s'alimentarà amb algues de Llanereres (amb *Ostreopsis*).
L'altre peixera retolar-la com a "No tòxic".
3. Guardar les algues al congelador per evitar la putrefacció.
4. Diàriament:
 - Netejar la peixera.
 - Anotar les anomalies o canvis que s'observin.
5. Setmanalment:
 - Donar de menjar als eriçons: les algues de Llanereres als de "Tòxic" i les altres als de "No tòxic".
 - Pesar individualment cadascun dels eriçons i anotar-ne el pes.
 - Mesurar amb un peu de rei cadascun dels eriçons i anotar-ne la mesura.
6. Al cap de quinze dies aproximadament, quan es decideixi finalitzar l'experiment:
 - 6.1. Pesar i mesurar per últim cop tots els eriçons.
 - 6.2. Pesar 4 pots Falcon buits.
 - 6.3. Retolar-los per a cada grup d'estudi ("Tòxic" i "No tòxic"): un pot per a les gònades i un per a intestins i substàncies residuals.

- 6.4. Trencar la closca de tots els eriçons amb compte (imatge 6 i 7) i retirar-ne les gònades.
- 6.5. Introduir-les totes juntes en el pot corresponent segons el grup d'eriçons que s'estigui disseccionant.
- 6.6. Fer el mateix amb els intestins i els residus.
- 6.7. Pesar els quatre pots i apuntar-ne el pes. Caldrà restar el pes del pot buit (tara) per a saber-ne el del contingut.
- 6.8. En cadascun dels pots hi afegim metanol fred (emmagatzemat en un congelador a -20°C) fins a cobrir el material de l'estudi.
- 6.9. S'agita el pot amb un vòrtex fins que es vegi que el teixit queda ben desfet i es guarda al congelador de -80°C fins el dia abans de l'anàlisi per a l'extracció de toxines.
- Nota: es passa pel vòrtex perquè el material és molt fràgil i com més triturat més fàcil és extreure'n les toxines.
- 6.10. S'analitzaran amb espectròmetre de masses d'alta resolució HR-LC/MS a la Facultat de Química de la Universitat de Barcelona.



Imatge 6 (Esquerra) Extracció de gònades i intestins dels eriçons de l'estudi
Imatge 7 (Dreta) Anatomia interna dels eriçons marins



2.3. Experiment de sensibilitat a l'agitació per part de la comunitat de microalgues epífites

Objectiu: veure si les principals microalgues de la comunitat epífita creixen de forma diferent en funció de l'agitació de l'aigua. Es posa un especial èmfasi en la possible variació en el contingut de toxines en les dues condicions (agitat, no agitad).

S'utilitzen per als tractaments en agitació el terme "SHAKE" i pels que estan en repòs "CTRL" (o control).

Treball de camp: Cal obtenir una mostra de la comunitat natural epífita com s'ha descrit a l'apartat 3.1.A.b, és a dir:

1. S'agafa un matoll petit (aproximadament uns 10 grams) de macroalga i se n'identifica l'espècie. Les espècies que normalment s'agafen són molt ramificades i per tant tenen una elevada relació de superfície/volum, com per exemple *Corallina elongata*, *Jania rubens* o *Halopteris scoparia*, i en base a l'experiència prèvia en aquesta zona, se sap que hi colonitza l'*Ostreopsis*.
2. Re-suspendre la macroalga en un volum conegut d'aigua de mar.
3. Filtrar amb un tamís de 200 micròmetres per a separar les espècies de major mida (el zoobentos).
4. Repartir el volum d'aigua tamisada en 6 pots de cultiu grans.

Nota: tres dels pots de cultiu aniran per al control i els altres tres per als que estaran en moviment d'agitació.

5. Transportar a temperatura ambient cap al laboratori.

Laboratori

1. Posar els pots en les mateixes condicions de temperatura (23°C constants) i de llum (12 hores de llum i 12 hores de fosc) a una cambra de la ZAE (Imatge 8).

1.1. Els pots del CTRL es posen sobre una taula (sense que el pot es mogui).

1.2. Els pots pel SHAKE sobre un agitador orbital a 25 rpm.

Nota: el fons sobre el que estaran els cultius ha de ser del mateix color i material de manera que no influeixi en l'experiment.



Imatge 8 Pots de cultiu en agitació (dreta) i sense (esquerra)

2. Cada dia que es faci el mostreig de l'experiment pujar els pots de cultiu al laboratori (Imatge 9).

3. De cada pot de cultiu:

3.1. Filtrar 5 ml amb filtres de fibra de vidre GF/F en un suport tipus Swinnex per a l'anàlisi de clorofil·les.

3.2. Filtrar 10 ml pels filtres GF/Fs amb Swinnex per a l'anàlisi de toxines.

3.3. Repetir el pas 3.2. per a la segona mostra de toxines.

3.4. Guardar els filtres en paper d'alumini retolats (data de mostreig, CTRL o SHAKE, clorofil·la o toxina).

3.5. Emmagatzemar els filtres de clorofil·la al congelador de -20°C i els de toxines a -80°C.

3.6. Traspasar aproximadament 10 ml de cultiu a un tub de tap verd i retolar-lo (data de mostreig, CTRL o SHAKE, clorofil·la o toxina, i rèplica -1, 2, 3-) i fixar amb lugol. Mantenir a temperatura ambient fins que es facin els recomptes corresponents.



Imatge 9 Material necessari pel mostreig de l'experiment

4. En aquest cas, donada la densitat cel·lular, comptar amb el mètode *Sedgewick Rafter* al microscopi amb l'objectiu de 10 augments les espècies següents:

- *Ostreopsis cf. ovata*
- *Prorocentrum lima*
- *Coolia monotis*
- *Amphidinium sp.*

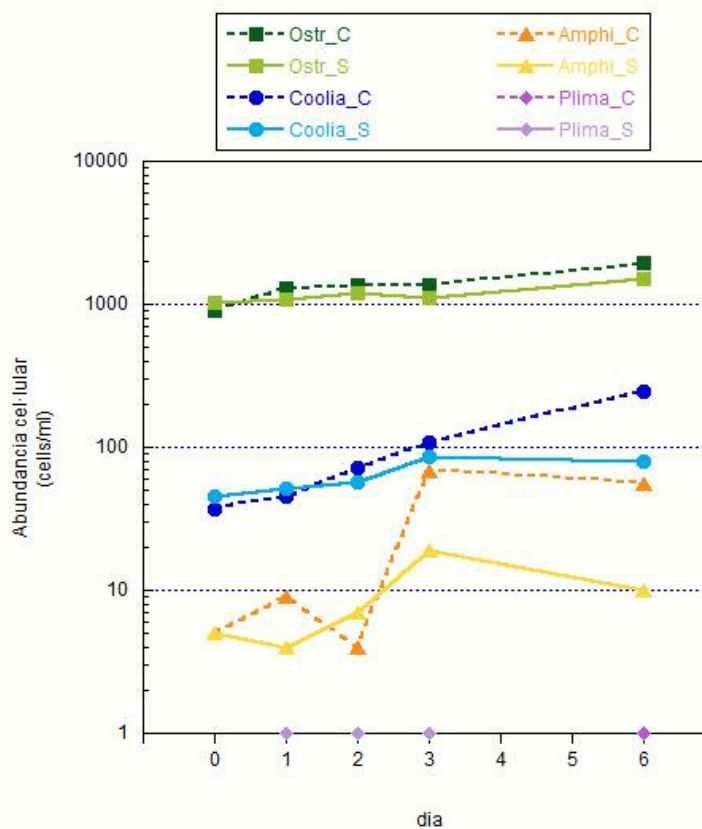
- Apuntar el número de cèl·lules i el de camps comptats a l'excel corresponent. Es faran corbes d'abundàncies en funció del temps per a veure si l'agitació ha afavorit l'*Ostreopsis* o les altres microalgues. En el moment d'acabar la memòria els resultats dels tres últims experiments i de les mostres de toxines i clorofil·les de tots tres estan encara en elaboració.

4. Exemples de preses de resultats

Els factors ambientals determinen el creixement de les diferents espècies de microalgues. En aquest cas es testa l'efecte de l'agitació sobre les diferents espècies de la comunitat epífita. L'experiment (veure apartat 3.3) que es detalla a continuació s'ha repetit 4 vegades al llarg de la proliferació que té lloc a Llanereres. Aquí es presenten els resultats preliminars de l'experiment 1.

El mostreig d'aquest primer experiment es va dur a terme entre els dies 28 de juny i el 4 de juliol. Durant aquesta setmana es van fer 5 mostrejos (al temps inicial, 1, 2, 3 i 6). En cadascun dels mostrejos es feia el recompte pertinent i s'anotava a l'excel, tal i com està descrit al protocol. Un cop acabat l'experiment, es van graficar els resultats (gràfic 1).

A la gràfica 1 es veu clarament com *Ostreopsis cf. ovata* té una abundància de cèl·lules molt superior a les altres espècies recomptades. A partir del dia 3 de l'experiment (1 de juliol) hi ha un creixement pronunciat de la dinoflagel·lada estudiada.

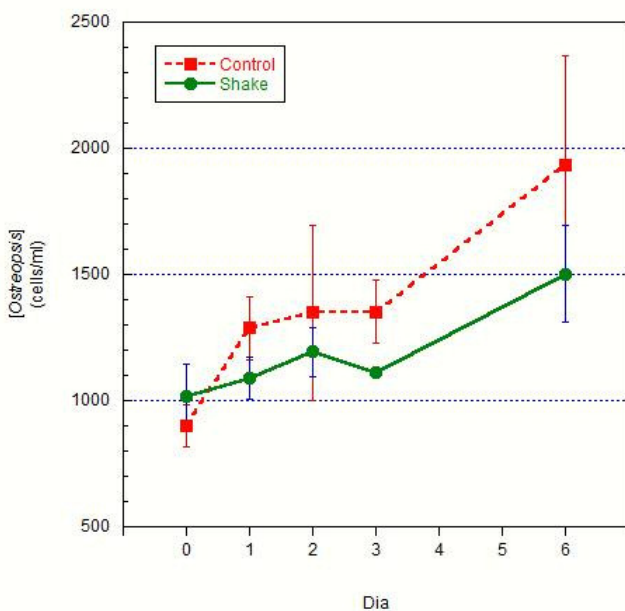


Gràfic 1 Mitjana (n=3) de l'evolució temporal de les espècies dominants de la comunitat epífita de Sant Andreu de Llanereres

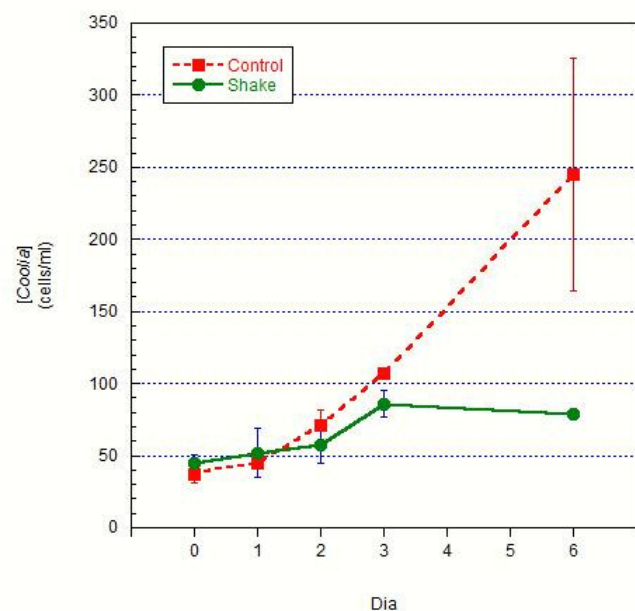
Durant l'experiment 1 la comunitat natural de Llavaneres ha estat dominada clarament per *Ostreopsis cf. ovata*, seguida per *Coolia monotis* i *Amphidinium sp.*. *Prorocentrum lima* és molt poc abundant. A la gràfica 1 es mostra l'evolució temporal d'aquesta comunitat sotmesa a diferents condicions d'agitació (agitat o shake (S), control (C)). Per poder veure l'evolució de les espècies menys abundants, es presenta el gràfic en escala logarítmica. En tots els casos les cèl·lules assoleixen concentracions més elevades en els controls. A la gràfica 2A i 2B es detalla l'evolució (en escala lineal) de les dues espècies més abundants per separat (*Ostreopsis cf. ovata* i *Coolia monotis*), mostrant les barres d'error (error estàndard). Noteu la diferència d'escala de concentració de les dues espècies. L'error màxim s'observa sempre al final de l'experiment, degut a que després de diversos dies d'aïllament els diferents flascons experimentals van agafant una dinàmica pròpia i se'n magnifiquen les diferències. És el moment d'aturar-lo i acabar l'experiment.

En la gràfica 2A es mostra l'evolució d'*Ostreopsis cf. ovata*. Observem que el grup control creix més que el grup agitad. Al dia inicial de l'experiment es parteix d'una abundància aproximada de 1000 cèl·lules/ml fins a arribar a gairebé les 2000 cèl·lules/ml, tot i que hi ha una elevada variabilitat entre els 3 flascons (error molt elevat). Tot i això es pot afirmar que el grup control té tendència a créixer més que l'agitad.

Al principi de l'experiment es va suposar que, durant els dies que durés, la tendència de la població d'*Ostreopsis* seria créixer. La hipòtesi ha quedat acceptada. Cal fer notar que el dia del mostreig de camp, quan vam recollir les mostres dels cultius inicials, ja s'observava una capa de mucíl·lag sobre les macroalgues. Es tracta d'uns filaments que secreta l'*Ostreopsis* i que li permeten viure en un ambient bentònic en platges amb onades. Sense el mucíl·lag, les cèl·lules serien dispersades per les onades i la proliferació duraria poc temps. Aquest fet donava la pista de que la proliferació estava començant a ser significativa.



Gràfic 2A Mitjana (n=3) de l'evolució temporal d'*Ostreopsis cf. ovata*



Gràfic 2B Mitjana (n=3) de l'evolució temporal de *Coolia monotis*

En la gràfica 2B s'observa l'evolució de la proliferació de *Coolia monotis*. Igual que *Ostreopsis* té tendència a créixer, però de manera més abundant, ja que la *Coolia monotis* augmenta cinc vegades la seva població inicial i *Ostreopsis* només la duplica. Es parteix d'una situació de 50 cèl·lules/ml i s'arriba a unes 250. Igual que en el gràfic 2A les barres d'error del Control del dia final son molt grans.

Amb això es pot concloure en que, experimentalment es veu que la comunitat d'*Ostreopsis* té un creixement més òptim per a la proliferació quan les aigües estan calmades sense haver massa agitació (en el medi natural podrien ser les onades o el xoc contra les roques de la costa). Aquestes situacions de calma son habituals durant els mesos d'estiu que és quan té lloc la proliferació al medi natural.

5. Bibliografia

1. Karlson, B., Cusack, C. and Bresnan, E. (editors). 2010. *Microscopic and molecular methods for quantitative phytoplankton analysis*. IOC Manuals and Guides, no. 55. (IOC/2010/MG/55), Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO, Paris.
2. Govern d'Espanya, Ministeri d'economia i competitivitat. (2016). *Portal del CSIC*. Recuperat de <http://www.csic.es/>
3. Institut de Ciències del Mar. (2016). Portal de l'Institut de Ciències del Mar. Recuperat de <http://www.icm.csic.es/>
4. Reguera, B., Alonso, R., Moreira, Á. y Méndez, S. (editors). 2011. *Guía para el diseño y puesta en marcha de un plan de seguimiento de microalgas productoras de toxinas*. IOC Manuals and Guides, no. 59. Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO, Paris i Viena.