

MONITORAGGIO DI *OSTREOPSIS OVATA* LUNGO LE AREE MARINO-COSTIERE PUGLIESI: RISULTATI 2010

di Nicola Ungaro, ARPA Puglia

Riassunto

Nella presentazione sono riportati i risultati ottenuti da ARPA Puglia nell'ambito delle attività di monitoraggio per la valutazione della distribuzione e dell'abbondanza relativa della microalga potenzialmente tossica *Ostreopsis ovata* lungo le coste regionali pugliesi nella stagione estiva 2010.

L'Agenzia ha controllato costantemente da giugno a settembre (con frequenza quindicinale) n. 20 siti, distribuiti sull'intero territorio regionale e rappresentativi della tipologia costiera potenzialmente interessata dalla presenza della specie tenendo anche conto delle segnalazioni relative agli anni precedenti.

Sono stati prelevati campioni di acqua con il metodo speditivo della "siringa" sul fondo e nella colonna d'acqua.

I risultati hanno evidenziato l'abbondante presenza di *Ostreopsis ovata* nelle stesse aree già accertate negli anni precedenti in particolare durante il mese di settembre.

Non sono stati segnalati impatti negativi sulla sanità pubblica e/o sulla fruizione delle aree marino-costiere ai fini turistico-balneari.

Da un'analisi dei dati del triennio 2008-2010 i siti considerati tradizionalmente come *hot spot* mostrano una tendenza ad una diminuzione dell'entità delle fioriture nel triennio (seppure statisticamente non significativa) ed uno sfasamento delle fioriture massive, essendo queste state rilevate nei mesi di luglio ed agosto durante il 2008, ad agosto e settembre nel 2009 e a settembre nel 2010.

Giornata di studio e confronto: Fioriture algali di *Ostreopsis ovata* lungo le coste italiane

Roma, 23 marzo 2011 - ISPRA – Sala Fazzini – Via Curtatone 3



ISPRA
Istituto Superiore per la Protezione
e la Ricerca Ambientale



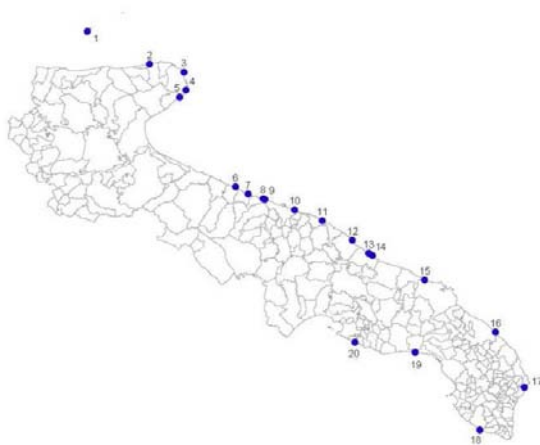
**MONITORAGGIO DI
OSTREOPSIS OVATA LUNGO LE
AREE MARINO-COSTIERE
PUGLIESI: RISULTATI 2010**

Anche per la stagione estiva 2010 l'ARPA Puglia ha attivato un monitoraggio specifico mirato alla valutazione della distribuzione e dell'abbondanza relativa della microalga potenzialmente tossica *Ostreopsis ovata* lungo le coste regionali pugliesi.

Allo scopo l'Agenzia ha controllato costantemente da giugno a settembre (con frequenza quindicinale) n. 20 siti, distribuiti sull'intero territorio regionale e rappresentativi della tipologia costiera potenzialmente interessata dalla presenza della specie.

Oltre alle caratteristiche geo-morfologiche (litorali prevalentemente rocciosi), il posizionamento dei punti di prelievo in alcuni casi si è basato su segnalazioni relative agli anni precedenti.

N°	Denominazione / Località
1	S.Domino-sotto il ristorante Il Pirata
2	loc.Pietra nera 30 mt dx canale
3	porto di Vieste 100 mt dx
4	spiaggia Pugnochiuso
5	spiaggia baia delle zagare
6	500 mt sud fogna citt.na Bisceglie
7	Molfetta Prima Cala
8	Hotel Riva del sole
9	200 mt sud lido Lucciola
10	Lido Trullo
11	ditta IOM-ex Sansolive
12	Castello S.Stefano
13	La Forcatella prima casa bianca
14	Torre Canne di fronte al faro
15	Apani lido S.Vincenzo
16	San Cataldo-vicino al Faro
17	porto Badisco-scalo di Enea
18	scarico Ittica Ugento a Punta Macolone
19	spiaggia libera Torre Columena
20	stabilimento Baia d'argento



Per questo monitoraggio, il campionamento mirato alla ricerca di *Ostreopsis ovata* è stato effettuato in accordo alla metodica proposta dalla Dr.ssa Marinella Abbate (ENEA, La Spezia). In pratica, nei punti selezionati, si sono prelevati dei campioni in acque basse (0.5-1 m di profondità) utilizzando una siringa in plastica da 50 cc con puntale tagliato. La siringa aspirava un quantitativo definito di acqua ad immediato contatto con il fondale (campione "fondo"), mentre un'altra aliquota veniva prelevata in colonna d'acqua (campione "colonna").



1) S.Domino-ristorante Il Pirata



2) loc.Pietra nera 30 mt dx canale



3) porto di Vieste 100 mt dx



4) Spiaggia Pugnochiuso



5) Spiaggia Baia delle Zagare



6) 500 mt sud fogna Bisceglie



7) Molfetta Prima Cala



8) Hotel riva del Sole



9) lido Lucciola



10) Lido Trullo



11) ditta IOM-ex Sansolive



12) Castello S.Stefano



13) La Forcatella prima casa bianca



14) Torre Canne di fronte al faro



15) Apani lido S.Vincenzo



16) San Cataldo-vicino al Faro



17) porto Badisco-scalo di Enea



18) scarico Ittica Ugento a P. Macolone



19) spiaggia Torre Columena



20) stabilimento Baia d'argento

Una volta campionata la matrice acqua, la presenza di *Ostreopsis ovata* è stata verificata in laboratorio secondo la metodologia standard (Zingone et al., 1990), e quando presente la specie, si sono stimate le densità cellulari relative (n° cell/l, sia nei campioni "fondo" che nei campioni "colonna d'acqua").

RISULTATI MONITORAGGIO ARPA Puglia 2010, n° 20 siti

LEGENDA:	Acque fondo	scarsa presenza	modesta	discreta	abbondante	molto abbondante*
	Acque colonna	scarsa presenza	modesta	discreta	abbondante	molto abbondante*

* probabile fioritura

		Giugno		Luglio		Agosto		Settembre	
		1ª Quindicina	2ª Quindicina	1ª Quindicina	2ª Quindicina	1ª Quindicina	2ª Quindicina	1ª Quindicina	2ª Quindicina
S.Domino-sotto il ristorante Il Pirata (FG)	Acque fondo	0	-	0	0	0	900	943.600	78.900
	Acque colonna	0	-	0	0	120	40	2.360	1.040
loc. Pietra nera 30 mt dx canale (FG)	Acque fondo	0	-	0	0	0	0	0	0
	Acque colonna	0	-	0	0	0	0	0	0
porto di Vieste 100 mt dx (FG)	Acque fondo	0	0	0	0	0	0	0	0
	Acque colonna	0	0	0	0	0	0	0	0
spiaggia Pugnochiuso (FG)	Acque fondo	0	0	0	0	0	0	0	0
	Acque colonna	0	0	0	0	0	0	0	0
spiaggia baia delle zagare (FG)	Acque fondo	0	0	0	0	0	0	0	0
	Acque colonna	0	0	0	0	0	0	0	0
500 mt sud fogna citt.na Bisceglie (BA)	Acque fondo	0	0	0	0	5.800	1.000	108.600	200.400
	Acque colonna	0	0	0	0	200	80	13.600	3.400
Molfetta 1ª Cala (BA)	Acque fondo	0	0	0	0	300	90.800	5.000	34.500
	Acque colonna	0	0	0	0	19.680	1.080	21.320	21.320
Hotel Riva del sole (BA)	Acque fondo	0	0	0	0	9.400	121.200	4.548.800	381.600
	Acque colonna	0	0	0	0	240	230.720	2.841.600	520
200 mt sud lido Lucciola (BA)	Acque fondo	0	0	80	0	4.600	4.603.200	26.100	26.100
	Acque colonna	0	0	0	0	1.600	370.400	33.600	33.600
Lido Trullo (BA)	Acque fondo	0	0	0	0	0	1.100.400	94.200	400
	Acque colonna	0	0	0	0	500.640	10.760	960	960
ditta IOM-ex Sansolive (BA)	Acque fondo	0	0	0	0	400	100	500	612.000
	Acque colonna	0	0	0	0	0	0	40	23.160
Castello S.Stefano (BA)	Acque fondo	0	0	0	0	100	4.100	62.300	45.200
	Acque colonna	0	0	0	0	0	400	74.880	480
La Forcatella prima casa bianca (BR)	Acque fondo	160	560	160	240	480	3.700	80.000	180.000
	Acque colonna	0	200	480	1.200	120	300	9.600	12.800
Torre Canne di fronte al faro (BR)	Acque fondo	240	960	200	120	240	1.000	208.000	92.000
	Acque colonna	0	320	320	600	160	400	32.000	10.400
Apani lido S.Vincenzo (BR)	Acque fondo	0	400	0	0	0	900	160	240
	Acque colonna	0	160	0	260	0	200	0	0
San Cataldo-vicino al Faro (LE)	Acque fondo	0	0	0	0	80	500	240	200
	Acque colonna	0	0	0	0	0	0	0	40
porto Badisco-scalo di Enea (LE)	Acque fondo	0	0	2.400	108.680	202.800	144.080	136.120	136.120
	Acque colonna	0	0	40	1.640	800	1.480	720	720
scarico Ittica Ugento a Punta Macolone (LE)	Acque fondo	0	120	40	40	320	640	200	40
	Acque colonna	0	40	0	0	0	200	0	0
spiaggia libera Torre Columena (TA)	Acque fondo	0	0	0	0	0	0	0	0
	Acque colonna	0	0	0	0	0	0	0	0
stabilimento Baia d'argento (TA)	Acque fondo	3.200	4.000	25.600	16.800	56.000	9.600	8.000	12.000
	Acque colonna	80	120	1.280	1.600	2.240	480	280	960

Nella stagione di monitoraggio 2010 si è riscontrata ancora una volta l'abbondante presenza di *Ostreopsis ovata* nelle stesse aree già accertate negli anni precedenti.

	Giugno		Luglio		Agosto		Settembre	
	1° Quindicina	2° Quindicina	1° Quindicina	2° Quindicina	1° Quindicina	2° Quindicina	1° Quindicina	2° Quindicina
S.Dominio-sotto il ristorante Il Pirata (FG)	Acque fondo 0	0	2	0	490	64.600	1.216.000	204.800
	Acque colonna 0	0	0	0	0	6.320	1.620	31.980
loc. Pietra nera 30 mt dx canale (FG)	Acque fondo 0	0	0	0	200	0	0	0
	Acque colonna 0	0	0	0	0	0	0	0
porto di Vieste 100 mt dx (FG)	Acque fondo 0	0	0	0	200	0	0	0
	Acque colonna 0	0	0	0	0	0	0	0
spiaggia Pugnochiuso (FG)	Acque fondo 0	0	0	0	200	0	0	0
	Acque colonna 0	0	0	0	0	0	0	0
spiaggia baia delle zagare (FG)	Acque fondo 0	0	0	0	0	0	0	0
	Acque colonna 0	0	0	0	0	0	0	0
500 mt sud fognia citr.na Bisceglie (BA)	Acque fondo 0	0	0	0	1.144.000	24.100	12.000	16.300
	Acque colonna 0	0	0	0	31.300	45.400	4.400	840
Molfetta 1° Cala (BA)	Acque fondo 0	2.700	17.800	200	14.500	107.700	10.000	10.000
	Acque colonna 0	80	3.840	0	3.360	12.000	7.400	26.720
Hotel Riva del sole (BA)	Acque fondo 0	2.700	1.400	600	173.700	1.123.200	952.500	137.500
	Acque colonna 0	300	0	0	7.300	11.900	110.400	7.440
200 mt sud lido Luciccola (BA)	Acque fondo 80	0	0	0	300	2.400	2.112.000	444.000 + 5.000.000
	Acque colonna 0	0	0	0	200	60.000	3.600	18.240
Lido Trullo (BA)	Acque fondo 0	0	0	0	12.000	7.100.000	24.500	3.500
	Acque colonna 0	0	0	0	80	159.200	920	120
ditta IOM-ex Sansolive (BA)	Acque fondo 0	0	0	0	100	500	5.200	275.000
	Acque colonna 0	0	0	0	0	0	0	3.360
Castello S. Stefano (BA)	Acque fondo 80	0	0	0	35.100	18.100	69.200	385.600
	Acque colonna 0	0	0	0	300	190	7.840	6.560
La Forcatella prima casa bianca (BR)	Acque fondo 1.600	1.920	3.200	1.600	2.950	12.000	152.000	192.000
	Acque colonna 0	0	0	0	0	0	0	0
Torre Canne di fronte al faro (BR)	Acque fondo 2.240	3.200	2.960	2.240	3.520	9.000	64.200	36.000
	Acque colonna 0	0	0	0	4.000	10.800	22.900	0
Apani lido S.Vincenzo (BR)	Acque fondo 0	0	0	0	400	240	240	0
	Acque colonna 0	0	0	0	0	0	0	0
San Cataldo-vicino al Faro (LE)	Acque fondo 0	0	0	0	0	0	0	0
	Acque colonna 0	0	0	0	0	0	0	0
porto Badisco-scalo di Enea (LE)	Acque fondo 0	0	280	200	42.000	10.200	5.830	3.380
	Acque colonna 0	0	0	0	2.600	240	40	0
scarico Itica Ugento a Punta Macolone (LE)	Acque fondo 0	240	0	0	1.000	120	200	0
	Acque colonna 0	0	0	0	280	40	0	0
spiaggia libera Torre Columena (TA)	Acque fondo 0	0	0	0	0	0	0	0
	Acque colonna 0	0	0	0	0	0	0	0
stabilimento Baia d'argento (TA)	Acque fondo 8.000	18.000	33.000	78.200	18.000	23.200	22.800	9.800
	Acque colonna 960	600	2.160	3.440	960	1.600	1.600	1.280

← 2009

	Giugno		Luglio		Agosto		Settembre	
	1° Quindicina	2° Quindicina	1° Quindicina	2° Quindicina	1° Quindicina	2° Quindicina	1° Quindicina	2° Quindicina
S.Dominio-sotto il ristorante Il Pirata (FG)	Acque fondo 0	-	0	0	0	800	843.000	78.900
	Acque colonna 0	-	0	0	0	100	40	2.960
loc. Pietra nera 30 mt dx canale (FG)	Acque fondo 0	-	0	0	0	0	0	0
	Acque colonna 0	-	0	0	0	0	0	0
porto di Vieste 100 mt dx (FG)	Acque fondo 0	0	0	0	0	0	0	0
	Acque colonna 0	0	0	0	0	0	0	0
spiaggia Pugnochiuso (FG)	Acque fondo 0	0	0	0	0	0	0	0
	Acque colonna 0	0	0	0	0	0	0	0
spiaggia baia delle zagare (FG)	Acque fondo 0	0	0	0	0	0	0	0
	Acque colonna 0	0	0	0	0	0	0	0
500 mt sud fognia citr.na Bisceglie (BA)	Acque fondo 0	0	0	0	0	5.800	1.800	108.600
	Acque colonna 0	0	0	0	0	0	0	200.400
Molfetta 1° Cala (BA)	Acque fondo 0	0	0	0	0	0	0	0
	Acque colonna 0	0	0	0	0	300	19.800	1.080
Hotel Riva del sole (BA)	Acque fondo 0	0	0	0	0	8.000	121.200	1.548.000
	Acque colonna 0	0	0	0	0	240	230.720	820
200 mt sud lido Luciccola (BA)	Acque fondo 0	0	0	80	0	4.600	4.603.200	26.100
	Acque colonna 0	0	0	0	0	1.600	3.900	34.500
Lido Trullo (BA)	Acque fondo 0	0	0	0	0	0	1.100.400	84.200
	Acque colonna 0	0	0	0	0	0	500.840	10.100
ditta IOM-ex Sansolive (BA)	Acque fondo 0	0	0	0	0	400	100	21.000
	Acque colonna 0	0	0	0	0	0	0	0
Castello S. Stefano (BA)	Acque fondo 0	0	0	0	0	100	6.100	63.100
	Acque colonna 0	0	0	0	0	400	74.800	480
La Forcatella prima casa bianca (BR)	Acque fondo 160	260	160	240	480	3.700	80.200	180.000
	Acque colonna 0	0	0	0	0	0	0	19.800
Torre Canne di fronte al faro (BR)	Acque fondo 240	960	200	120	240	1.800	208.000	92.000
	Acque colonna 0	0	0	0	0	0	0	15.400
Apani lido S.Vincenzo (BR)	Acque fondo 0	0	0	0	0	0	0	0
	Acque colonna 0	0	0	0	0	0	0	0
San Cataldo-vicino al Faro (LE)	Acque fondo 0	0	0	0	0	0	0	0
	Acque colonna 0	0	0	0	0	0	0	0
porto Badisco-scalo di Enea (LE)	Acque fondo 0	0	0	0	2.400	108.600	202.800	144.080
	Acque colonna 0	0	0	0	40	800	1.480	1.480
scarico Itica Ugento a Punta Macolone (LE)	Acque fondo 0	120	40	40	320	640	200	40
	Acque colonna 0	0	0	0	0	0	0	0
spiaggia libera Torre Columena (TA)	Acque fondo 0	0	0	0	0	0	0	0
	Acque colonna 0	0	0	0	0	0	0	0
stabilimento Baia d'argento (TA)	Acque fondo 3.200	4.000	25.000	16.000	50.000	100.000	4.000	100.000
	Acque colonna 80	120	1.280	1.600	2.400	480	280	960

2010 →

Pur tuttavia durante la stagione estiva 2010 non sono stati prima riportati importanti episodi riconducibili agli effetti della microalga sulla sanità pubblica e/o sulla fruizione delle aree marino-costiere ai fini turistico-balneari.

Così come era già successo per il 2009, anche per il 2010 il limitato impatto sulla salute pubblica potrebbe in qualche modo essere ricondotto alla situazione meteo-marina al contorno, in quanto nel periodo estivo monitorato non si sono verificate mareggiate di particolare entità, e quindi si è minimizzato il potenziale effetto dovuto alla ri-sospensione in colonna d'acqua di *Ostreopsis ovata* e alla successiva aero-dispersione degli eventuali agenti tossici.

Inoltre, nel 2010 le fioriture massive si sono concentrate durante il mese di settembre, in cui le spiagge sono meno frequentate rispetto ai mesi di luglio ed agosto.

Un'altra spiegazione potrebbe essere la presa di coscienza della problematica da parte dell'opinione pubblica, ed il successivo adattamento anche mediante l'adozione delle misure di prevenzione proposte dalle campagne di informazione.



OSTREOPSIS OVATA, UN NUOVO OSPITE DELLE COSTE PUGLIESI

CARTA DI IDENTITA' DI OSTREOPSIS OVATA:

- Alga unicellulare del gruppo delle "Dinoflagellate";
- Dimensioni comprese tra 30 e 60 micron (1 micron = millesimo di millimetro);
- Vive solitamente su alghe pluricellulari (macroalghe) e su fondali rocciosi;
- Predilige acque calme, calde e bene illuminate;
- Specie tipica dei mari tropicali;
- Produce tossine.



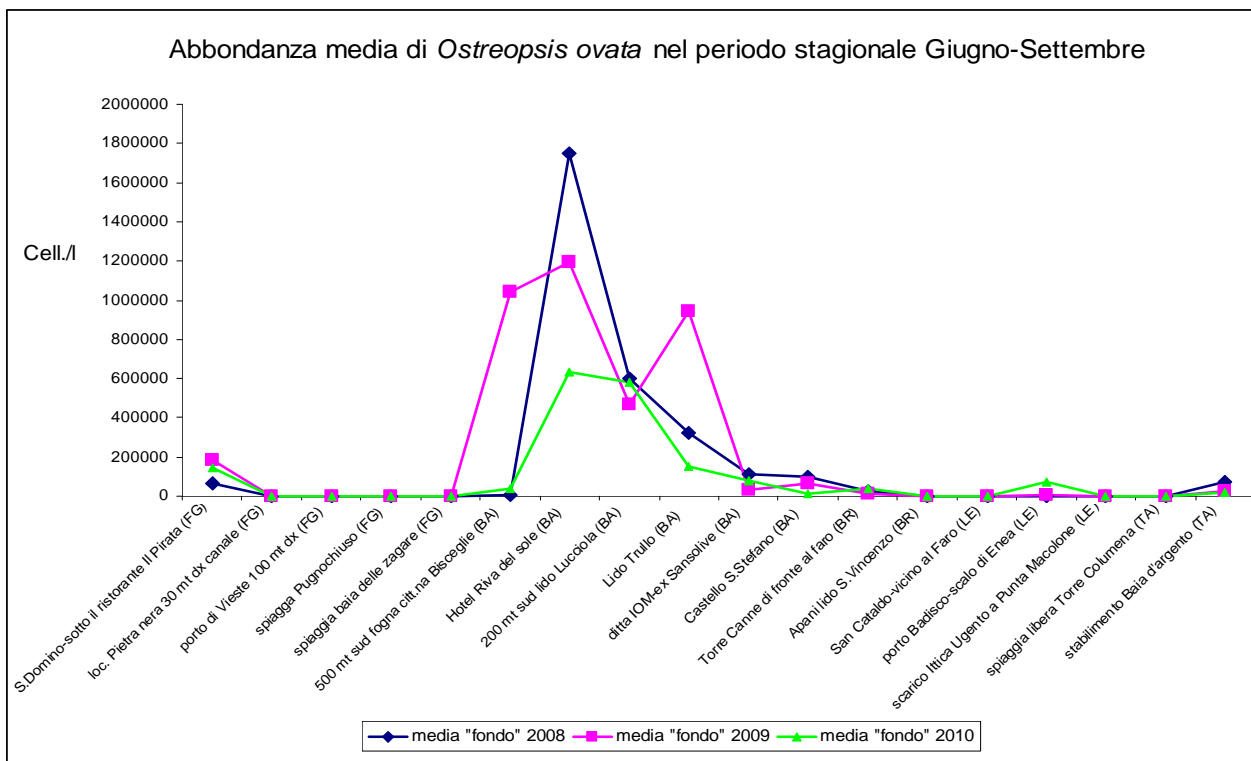
Foto: G.P. Felcini, Dipartimento di Biologia e Patologia Vegetale – Università di Bari

COME E' ARRIVATA LUNGO LE COSTE PUGLIESI E COME SI E' ADATTATA:

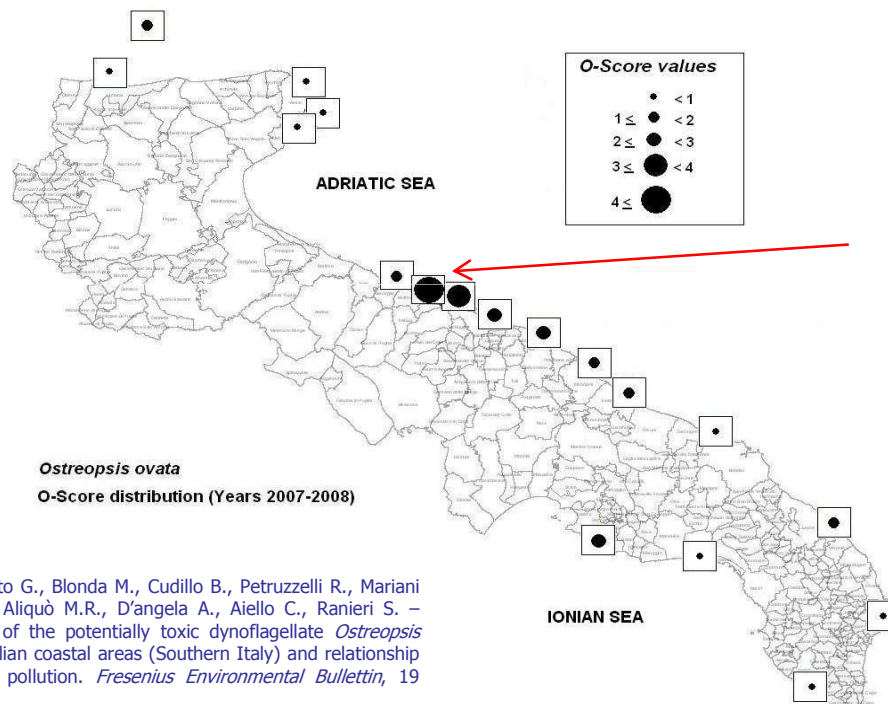
- Probabilmente introdotta accidentalmente in Mediterraneo per mezzo delle acque di zavorra delle navi;
- Prime segnalazioni lungo le coste pugliesi a partire dall'anno 2000/2001;
- La popolazione si sviluppa abbondantemente durante i mesi estivi;
- Fattori ambientali che facilitano la proliferazione: alte temperature, alta pressione atmosferica, condizioni di irraggiamento favorevoli, mare calmo per un periodo di tempo superiore a 10-15 giorni;

Comunque, di particolare interesse per lo studio del fenomeno potrebbe essere la serie dei dati del monitoraggio, partito per le acque pugliesi nel 2007 a stagione estiva però inoltrata; il data set più omogeneo è quello relativo agli ultimi tre anni (2008-2009-2010), in cui è stata applicata la stessa metodologia, nello stesso periodo stagionale (giugno-settembre) e con la stessa frequenza.

Considerando il dato medio di abbondanza (sul periodo stagionale giugno-settembre), si ottiene il grafico sottoriportato.



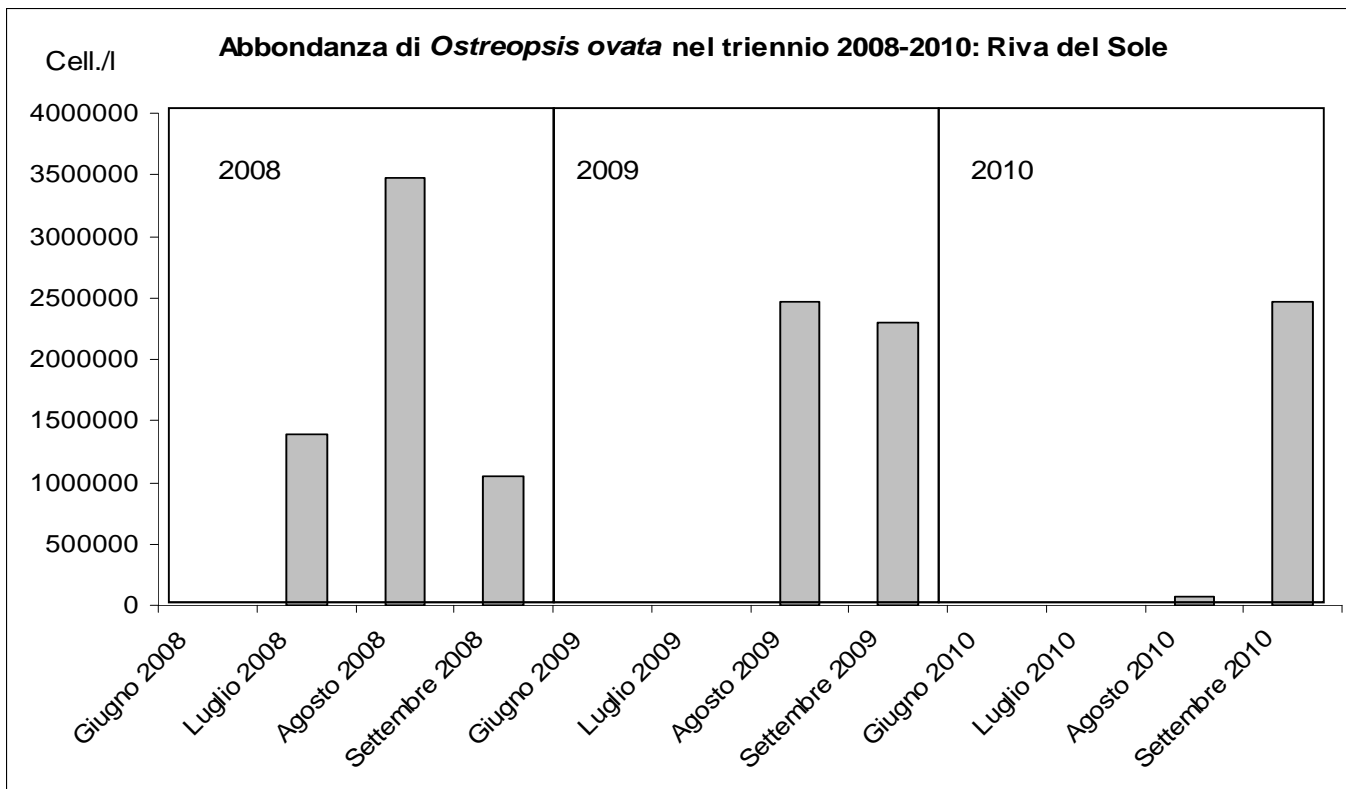
Dai risultati appena esposti, soprattutto quelli relativi ai siti considerati tradizionalmente come *hot spot* (vedi figura sotto), si potrebbe ipotizzare una tendenza ad una diminuzione dell'entità delle fioriture nel triennio (seppure statisticamente non significativa).



Ungaro N., Assennato G., Blonda M., Cudillo B., Petruzzelli R., Mariani M., Pastorelli A.M., Aliquò M.R., D'angela A., Aiello C., Ranieri S. – 2010 - Occurrence of the potentially toxic dinoflagellate *Ostreopsis ovata* along the apulian coastal areas (Southern Italy) and relationship with anthropogenic pollution. *Fresenius Environmental Bulletin*, 19 (9): 1813-1821.

Una altra interessante informazione deriva dall'evoluzione temporale delle fioriture nell'hot spot probabilmente più rappresentativo (punto di monitoraggio n. 8, Hotel Riva del Sole, vedi sopra).

Per quanto riguarda lo specifico sito monitorato, il grafico successivo evidenzia uno sfasamento delle fioriture massive, essendo queste state rilevate nei mesi di luglio ed agosto durante il 2008, ad agosto e settembre nel 2009 e a settembre nel 2010.





**GRAZIE PER
L'ATTENZIONE!!!**

OSTREOPSIS OVATA E OSTREOPSIS SPP NUOVI RISCHI DI TOSSICITÀ MICROALGALE NEI MARI ITALIANI

di Marina Cabrini – INOGS, Istituto Nazionale di Oceanografia e di Geofisica Sperimentale

Riassunto

Il programma di Ricerca "*Ostreopsis ovata* e *Ostreopsis* spp: nuovi rischi di tossicità microalgale nei mari italiani" nasce dall'esigenza di colmare alcune delle numerose lacune conoscitive legate alla problematica *Ostreopsis*, con particolare riferimento alla genetica, all'ecologia ed all'ecofisiologia di *Ostreopsis ovata* ed *Ostreopsis* cfr. *siamensis* ed agli impatti delle fioriture sull'ambiente marino. L'obiettivo finale è quello di acquisire informazioni utili ad una migliore comprensione del fenomeno, così da favorire una mirata pianificazione delle attività di controllo e la definizione di efficaci interventi di emergenza. Il programma di Ricerca (durato 17 mesi) è stato finanziato dal Ministero dell'Ambiente e della Tutela del Territorio e del Mare- DPN nell'ambito dell'Accordo di Programma triennale con ISPRA, avviato a fine 2008 e terminato con la presentazione dei risultati al workshop finale di aprile 2010 in ISPRA. Ha coinvolto numerose Università e Istituti di ricerca ed ha visto il contributo di alcune ARPA che hanno collaborato strettamente alle attività del Programma mediante la costituzione di un Comitato di coordinamento delle Agenzie Regionali, oppure inviando campioni da analizzare a Università o Centri di ricerca. Inoltre, su proposta del Comitato sono state svolte da ARPA Calabria e ARPA Toscana attività integrative che hanno riguardato il campionamento dell'aerosol marino per l'identificazione di cellule di *Ostreopsis* e biotossine.

Di seguito sono sintetizzati i principali risultati del Programma di ricerca.

Gli studi di genetica di popolazione (distribuzione, origine), gli approfondimenti tassonomici (variabilità morfometrica) e gli strumenti di identificazione più sensibili per la definizione genetica della specie hanno portato a stabilire l'uniformità del genotipo *O. ovata* italiana e mediterranea, con bassa variabilità genetica, l'uniformità del genotipo mediterraneo con quello atlantico e che il genotipo mediterraneo è differenziato da quello asiatico.

Per comprendere come e quando avviene la fioritura è stata studiata: la dinamica delle fioriture (condizioni che favoriscono l'instaurarsi, il mantenimento ed il declino di una fioritura), la caratterizzazione della componente polisaccaridica, i meccanismi di allelopatia e le forme di resistenza.

Sono state scelte 5 aree di studio (Liguria, Campania, Sicilia, Marche, Friuli Venezia Giulia) per determinare la relazione della fioritura con le condizioni ambientali e si è visto che l'andamento temporale della fioritura è diverso e di differente intensità nelle aree osservate (picco a luglio in Liguria, Tirreno e Sicilia ionica; picco a settembre/ottobre in Adriatico). Si è poi osservato che *Ostreopsis ovata* si sviluppa su diversi substrati, ha una distribuzione spaziale molto variabile ma sui substrati rocciosi le abbondanze sono significativamente più elevate che sulle macroalghe. Le densità cellulari in colonna d'acqua sono molto variabili e influenzate dal regime idrodinamico e durante la fase stazionaria si forma un biofilm debolmente associato con il substrato i cui frammenti sono presenti anche in colonna d'acqua.

Per ciò che concerne la relazione con la temperatura, nel Tirreno il picco si registra nel mese di luglio (25°-28°C), mentre in Adriatico il picco si nota tra fine settembre e ottobre, in corrispondenza di valori di temperatura inferiori (20-23 °C). La relazione con i nutrienti e con la profondità non risultano evidenti.

Dal punto di vista eco fisiologico, la relazione tra temperatura e fotoperiodo ha evidenziato che la crescita è possibile fra 18°C e 30°C ed è massima tra 18°C e 26°C. Si è riscontrata una certa evidenza che *D. ovata* produce stadi non mobili, in grado di persistere in fase quiescente nei sedimenti quando non è rilevata nelle acque (in inverno/inizio primavera).

Riguardo alla produzione di tossine, esiste una variabilità nelle varie condizioni di crescita culturale. In fase di crescita esponenziale la produzione di palitossina risulta non rilevabile mentre l'ovatossina è stata rilevata nel disciolto; nelle fasi senescente e tarda senescente c'è produzione sia di palitossina che di ovatossina. Quest'ultima è poi predominante rispetto alla palitossina, sia nei pellets che nel filtrato. Si è osservata anche una variabilità quali quantitativa di carboidrati e proteine disciolte sia fra le diverse fasi della crescita, sia fra le diverse colture.

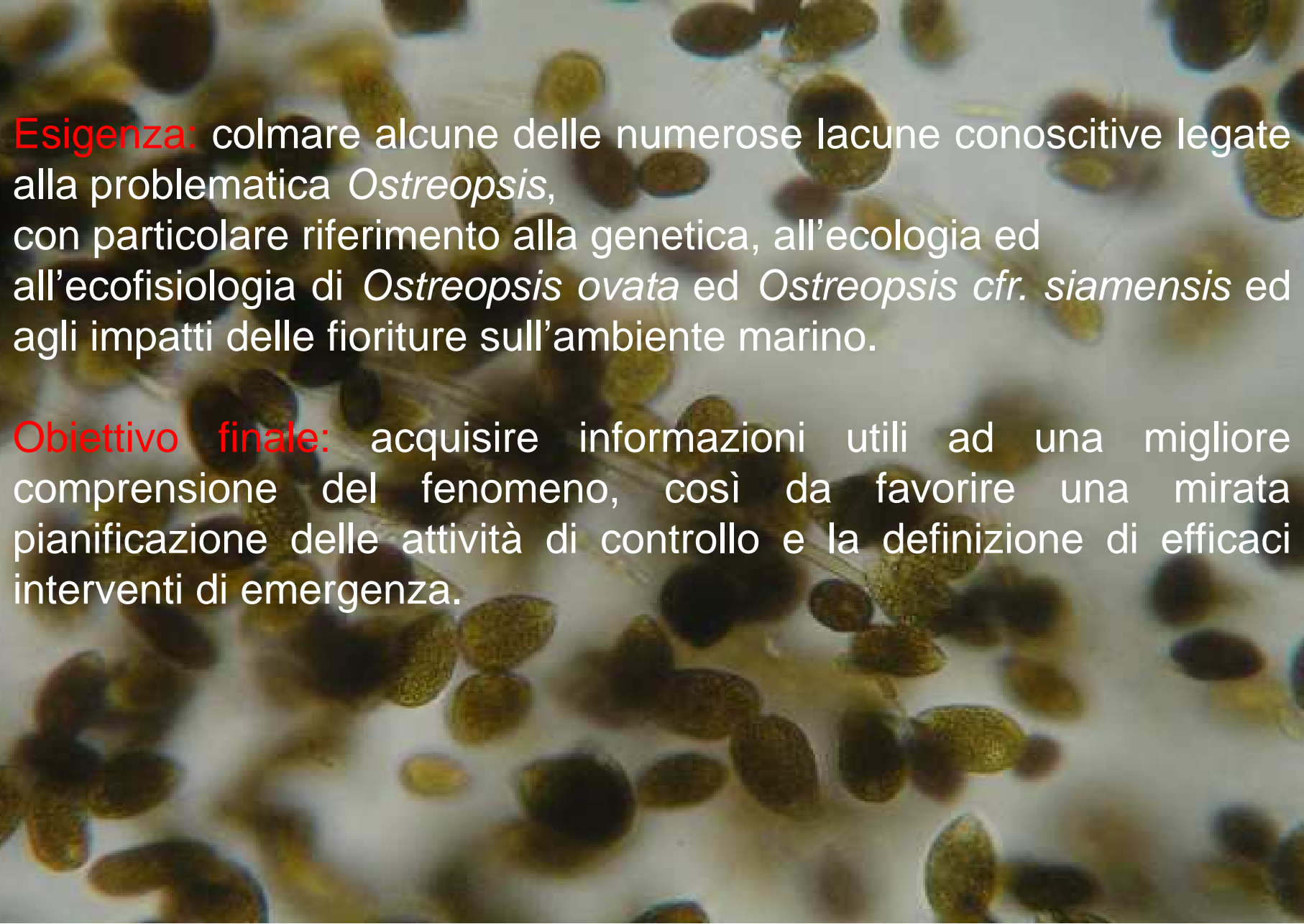
Per quanto riguarda le interazioni allelopatiche, dato che in presenza di *D. ovata* sono spesso presenti altre dinofitofite potenzialmente tossiche, lo studio ha evidenziato deboli effetti allelopatici, negativi su *Coolia monotis* e positivi su *Coscinodiscus granii*. *D. ovata* non sembra essere utilizzata come cibo da animali planctonici (ciliati e copepodi), ma viene filtrata da mitili e ingerita dai ricci, tuttavia il contatto diretto e prolungato con *D. ovata* danneggia copepodi, mitili e ricci e la detossificazione richiede più di 2 settimane. E' inoltre possibile individuare e quantificare la presenza di *D. ovata* in animali marini attraverso metodi molecolari molto sensibili.

Ostreopsis ovata e *Ostreopsis* spp:
nuovi rischi di tossicità microalgale nei mari italiani

Marina Cabrini



Workshop su *Ostreopsis ovata*, ISPRA, Roma 23 marzo 2011



Esigenza: colmare alcune delle numerose lacune conoscitive legate alla problematica *Ostreopsis*, con particolare riferimento alla genetica, all'ecologia ed all'ecofisiologia di *Ostreopsis ovata* ed *Ostreopsis cfr. siamensis* ed agli impatti delle fioriture sull'ambiente marino.

Obiettivo finale: acquisire informazioni utili ad una migliore comprensione del fenomeno, così da favorire una mirata pianificazione delle attività di controllo e la definizione di efficaci interventi di emergenza.

- ✓ Programma di Ricerca finanziato dal Ministero dell'Ambiente e della Tutela del Territorio e del Mare- DPN nell'ambito dell'Accordo di Programma triennale del 27.11.07 con l'ex ICRAM.
- ✓ Piano operativo predisposto da ICRAM approvato dal MATTM il 18.6.08.
- ✓ Avvio del Programma a novembre 2008
- ✓ Riunione preliminare (Roma, ISPRA, 2 ottobre 2008)
 - Workshop di presentazione del Programma (Roma, ISPRA, 9.12.2008)
 - I Workshop intermedio (Firenze, ARPAT, 15-16 giugno 2009)
 - II Workshop intermedio (Roma, ISPRA, 2 dicembre 2009)
 - Workshop finale (Roma, ISPRA, 29-30 aprile 2010)
- ✓ Termine del Programma il 30 aprile 2010 (durata: 17 mesi)

<p>Erika Magaletti Michele Giani (responsabili scientifici)</p>	<p>ISPRA Roma ISPRA Chioggia/ INOGS Trieste</p>	<p>Coordinamento del Programma, indagini ecofisiologiche e di campo</p>
---	---	---

Unità Operative

Maria Grazia Giacobbe	IAMC – CNR Messina	Studi tassonomici (microscopia), indagini ecofisiologiche in lab, indagini di campo.
Roberto Poletti Marinella Pompei	Centro Ricerche Marine - Cesenatico	Metodi di analisi delle biotossine, quantificazione biotossine, studi di tossicità
Marinella Abbate	ENEA Santa Teresa, La Spezia	Studi tassonomici (molecolari), indagini di campo, studio su strategia e metodi di campionamento.
Roberta Congestri	Dip. Biologia, Università di Roma 'Tor Vergata'	Indagini ecofisiologiche in lab

Adriana Zingone Marina Montresor	Stazione Zoologica 'A. Dohrn', Napoli	Studi tassonomici (microscopia), indagini ecofisiologiche in lab, studio su strategia e metodi di campionamento, indagini di campo, studi di tossicità.
Antonella Penna	Centro Biologia Ambientale - Università di Urbino	Studi tassonomici (molecolari), studi di genetica di popolazioni
Cecilia Totti	Università Politecnica delle Marche	Studi tassonomici (microscopia), indagini ecofisiologiche in lab, indagini di campo, studio su strategia e metodi di campionamento.

Ranieri Urbani Serena Fonda Umani	Dip. Scienze della Vita, Università di Trieste	Strategia e metodi di campionamento, indagini di campo e indagini ecofisiologiche in lab (caratterizzazione EPS, analisi biochimiche), Trasferimento alga nella rete trofica
Patrizia Ciminiello Ernesto Fattorusso	Dip. Chimica delle Sostanze Naturali, Università di Napoli "Federico II"	Caratterizzazione e metodi di analisi delle biotossine, quantificazione biotossine
Marina Cabrini Marina Monti	Dip. Oceanografia Biologica, Istituto Nazionale Oceanografia e Geofisica Sperimentale	Studi tassonomici (molecolari), Standardizzazione e intercalibrazione dei metodi di campionamento e analisi, indagini di campo, indagini ecofisiologiche in lab.

Attività in collaborazione con le ARPA

- Costituzione di comitato di coordinamento delle Agenzie Regionali al fine di collaborare strettamente alle attività del Programma di Ricerca, per il quale si sono proposte sette ARPA, anche in considerazione della loro esperienza pregressa: ARPA Calabria, ARPA Campania, ARPA Emilia Romagna, ARPA Liguria, ARPA Puglia, ARPA Sicilia ed ARPA Toscana.
- ARPA Campania, ARPA Friuli-Venezia Giulia, ARPA Puglia, ARPA Sardegna e hanno inviato campioni alle U.O. Università di Napoli/CRM di Cesenatico per l'analisi delle tossine.
- ARPA Calabria, ARPA Lazio, ARPA Liguria, ARPA Puglia, ARPA Toscana hanno inviato campioni alla U.O. Università di Urbino per le analisi genetiche.
- Il comitato ha proposto di svolgere alcune attività integrative rispetto a quanto già previsto dal Programma di Ricerca.
- Le attività integrative hanno riguardato il campionamento dell'aerosol marino per l'identificazione di cellule di *Ostreopsis* e biotossine e sono state condotte da ARPA Calabria e ARPA Toscana in collaborazione con le U.O. Università di Napoli e Università di Urbino.

Chi?

- genetica di popolazione (distribuzione, origine)
- approfondimenti tassonomici (variabilità morfometrica)
- strumenti di identificazione più sensibili per matrici diverse

Come/Quando?

- dinamica delle fioriture (condizioni che favoriscono l'instaurarsi, il mantenimento ed il declino di una fioritura)
- caratterizzazione della componente polisaccaridica
- meccanismi di allelopatia
- forme di resistenza

Perché?

- approfondimenti sui metodi di determinazione delle biotossine
- determinazione della produzione di biotossine in coltura e in campo
- campionamento ed analisi di aerosol marino
- indagini sul trasferimento dell'alga e della tossina nelle reti trofiche

Relazione della fioritura con le condizioni ambientali

Aree di studio

- Liguria
- Campania
- Sicilia
- Marche
- Friuli VG



Relazione della fioritura con le condizioni ambientali



Liguria: Baia Blu (2 siti)



**Campania: Nisida,
Gaiola, Rocce verdi
(3 siti)**



**Sicilia: Isolabella (4
siti)**



FVG: S. Croce (2 siti)



**Marche: Passetto e
Portonovo (2 siti)**

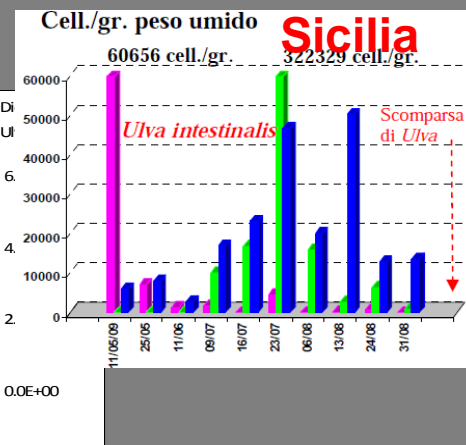
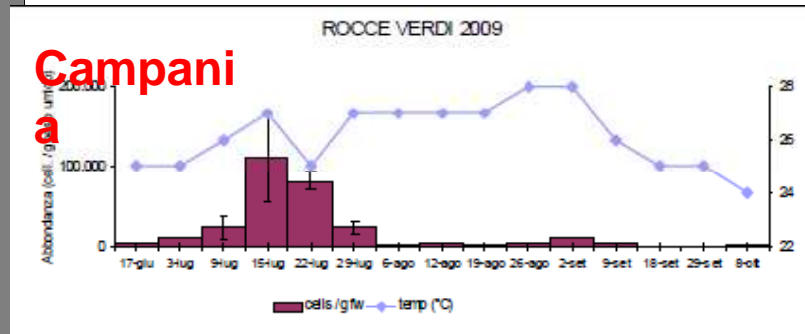
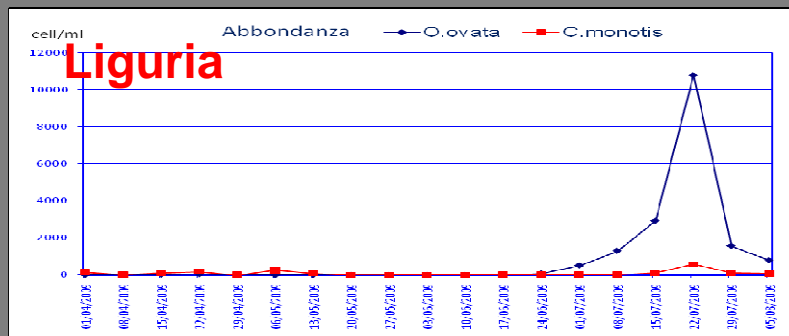
Qual è l'andamento temporale della fioritura?

Diverso andamento e intensità
differente nelle aree osservate:

- Ligure, Tirreno e Sicilia ionica: **picco a luglio**
- Adriatico: **picco a settembre/ottobre**

Massime abbondanze:

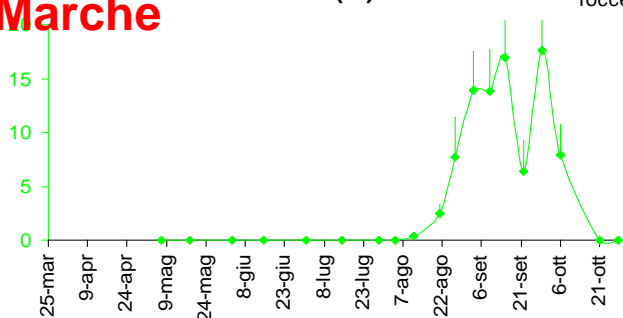
- in tutte le aree : **10^5 cell./g fw.**
- Riviera del Conero: **10^6 cell./g fw.**



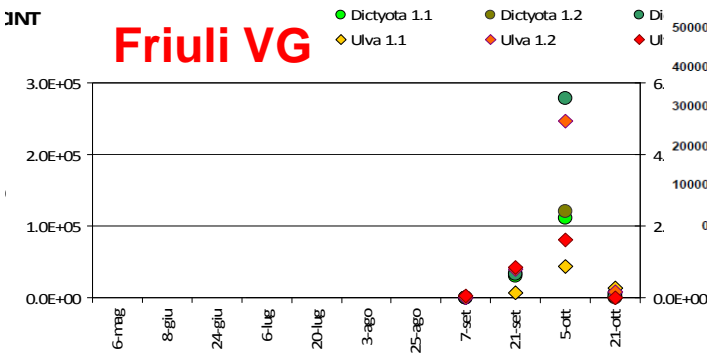
Marche

Passetto (M)

rocces JNT

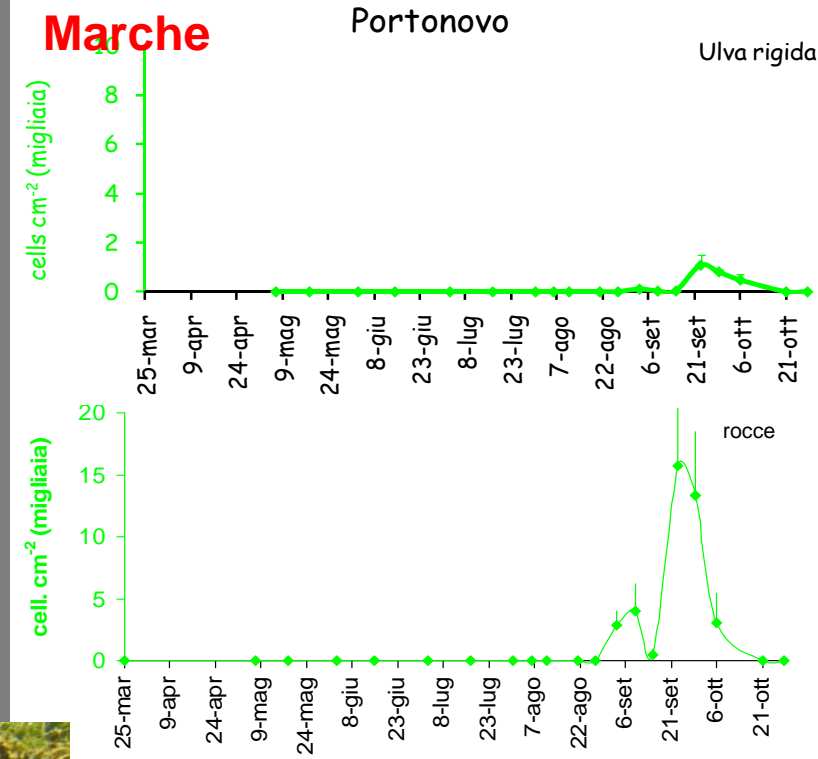


Friuli VG



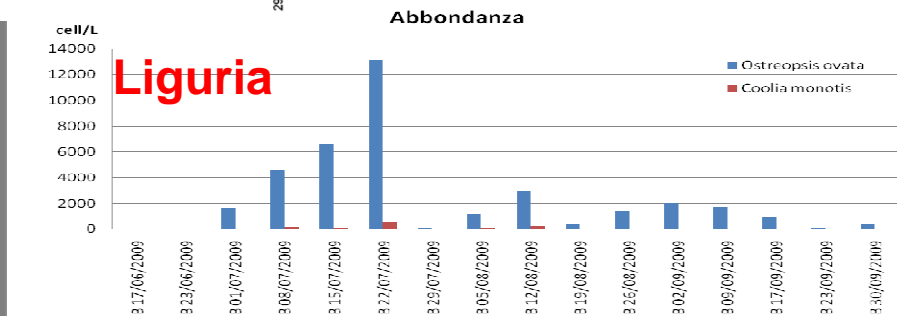
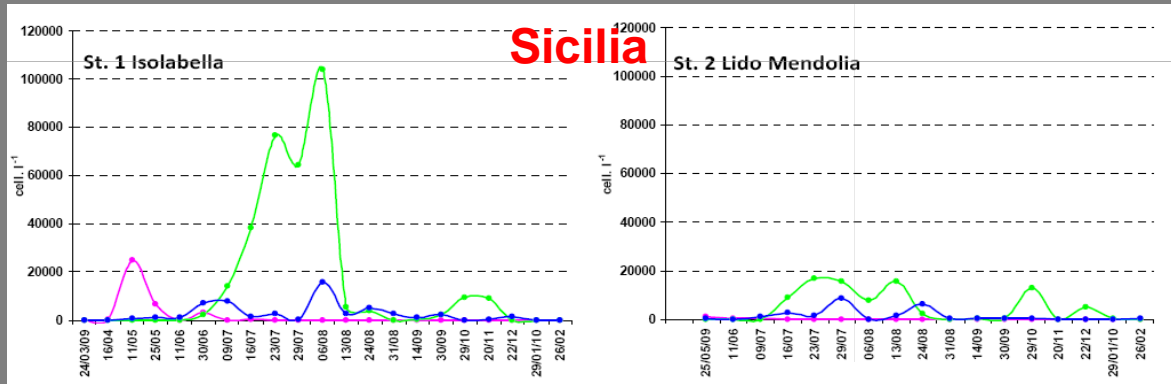
Su quali substrati si sviluppa la fioritura?

- *Ostreopsis* può colonizzare numerosi substrati.
- Distribuzione spaziale: elevata variabilità con marcate differenze su piccola scala.
- Sui **substrati rocciosi** abbondanze **significativamente più elevate** che sulle macroalghe.



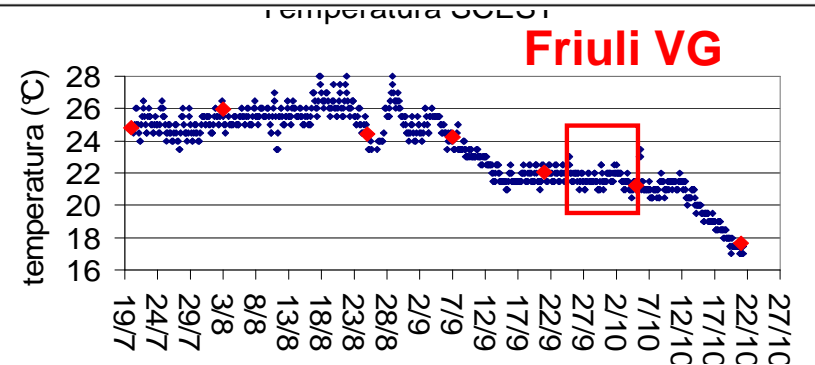
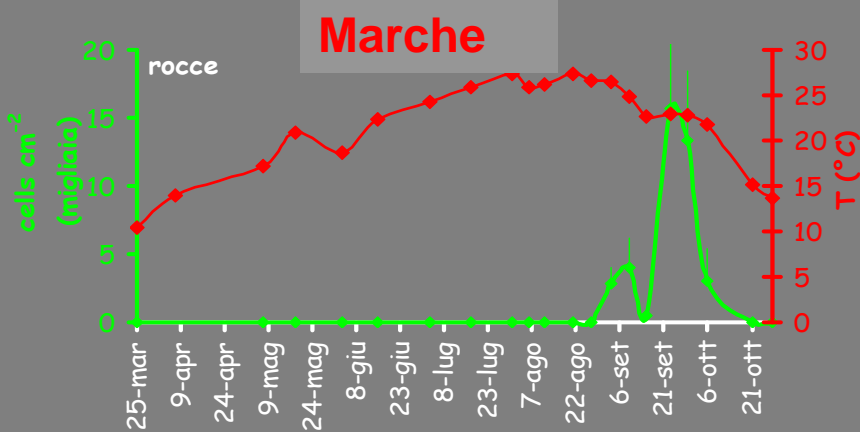
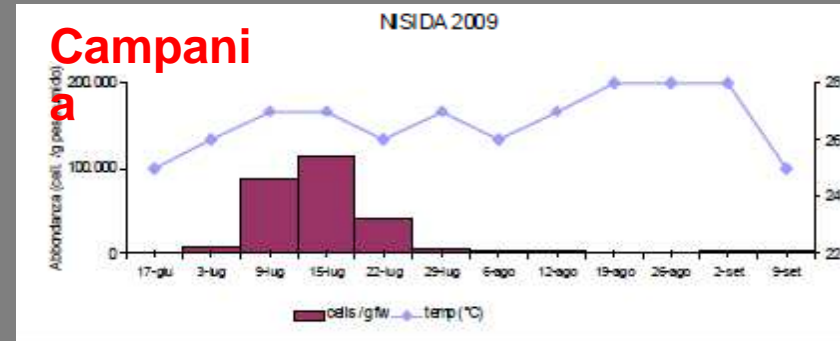
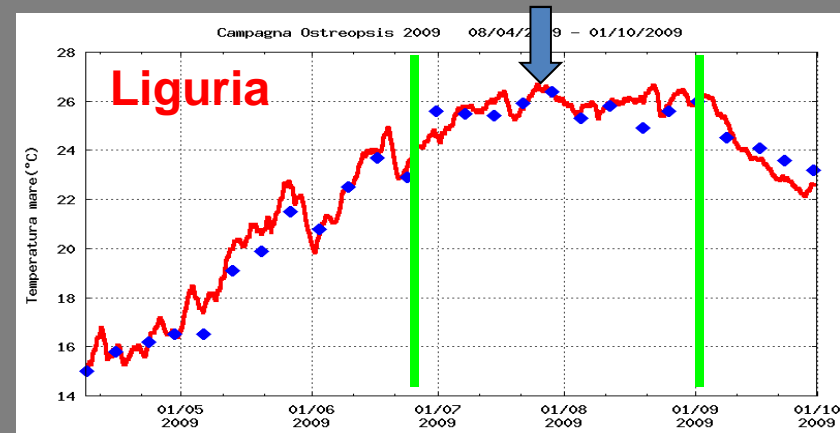
Che relazione con le cellule in colonna d'acqua?

- Le densità cellulari in colonna d'acqua sono molto variabili e influenzate dal regime idrodinamico.
- In alcune aree durante la fase stazionaria si forma un **biofilm** debolmente associato con il substrato → frammenti in colonna d'acqua.



Quali relazioni ci sono con la temperatura?

- **Liguria, Sicilia: correlazione positiva con la T:** picco il 20 luglio in corrispondenza di $T = 25-28\text{ }^{\circ}\text{C}$.
- **Campania:** picco a metà luglio ma prima del raggiungimento del massimo valore di temperatura.
- **Marche e Friuli VG:** fioritura alla fine dell'estate, **picco tra fine settembre e ottobre**, in corrispondenza di valori di temperatura inferiori ($20-23\text{ }^{\circ}\text{C}$).



Quali relazioni ci sono con i nutrienti?

- Relazioni non evidenti.
- Siti con condizioni trofiche anche molto differenti hanno tutte manifestato abbondanze di *Ostreopsis* paragonabili tra loro.
- Le concentrazioni di nutrienti erano sempre nella norma di quelli attesi nelle rispettive aree di studio.
- Nei siti Adriatici, concentrazioni dei nutrienti più elevate rispetto a alle altre aree, benché in linea con quanto atteso.

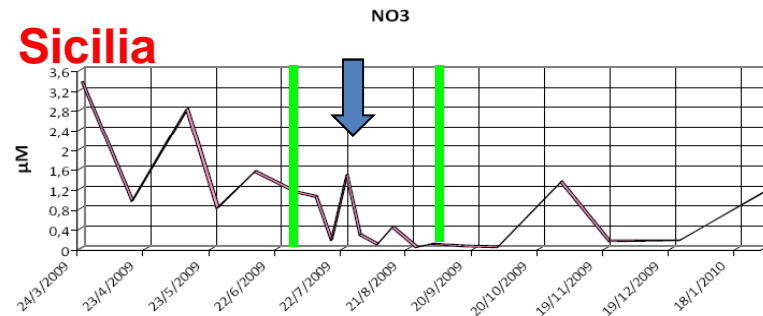
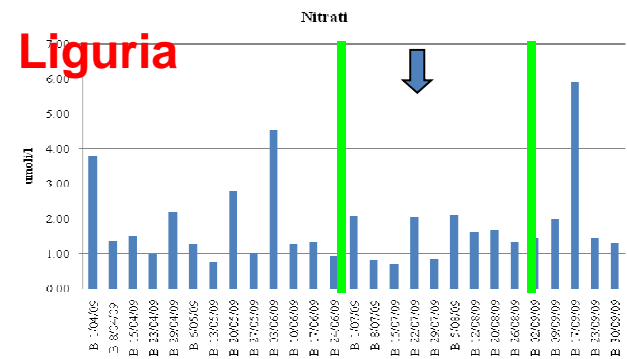
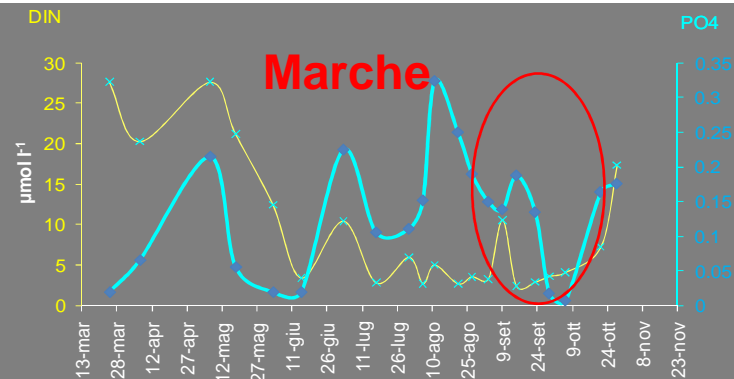


Fig. 14 Andamento temporale della concentrazione di nitrati

Valori presenti durante la fioritura

- Liguria, Campania, Sicilia: DIN: < 5 $\mu\text{mol/l}$, PO_4 < 0.2 $\mu\text{mol/l}$
- Friuli VG, Marche; DIN: < 10 $\mu\text{mol/l}$, PO_4 < 0.2 $\mu\text{mol/l}$



Quali relazioni ci sono con la profondità?

- Marche: substrati raccolti in profondità supportano abbondanze di *Ostreopsis* inferiori che quelli raccolti in superficie.
- Campania: relazione non chiara.

Marche

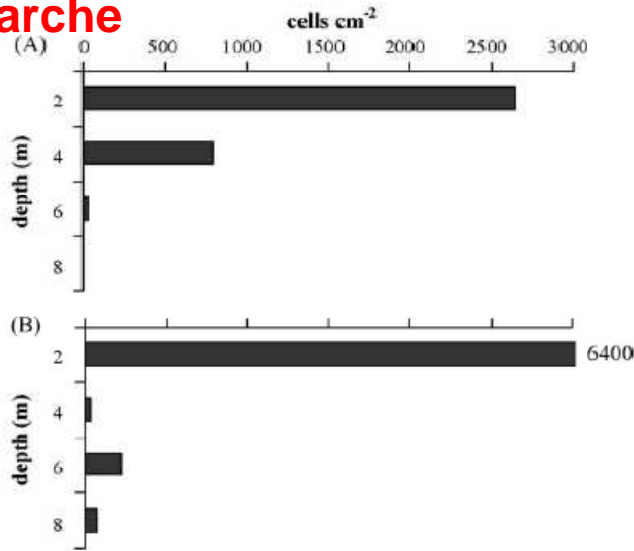
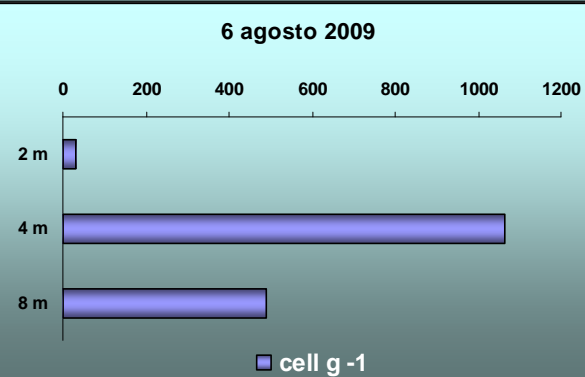
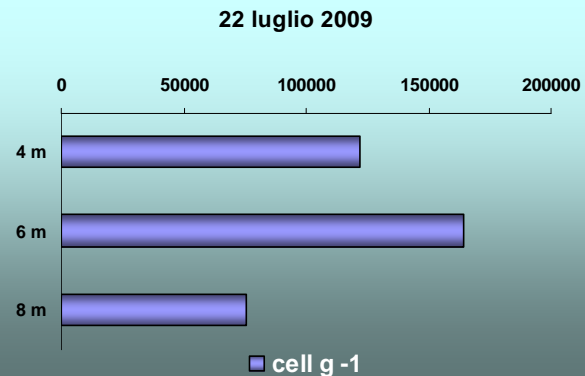
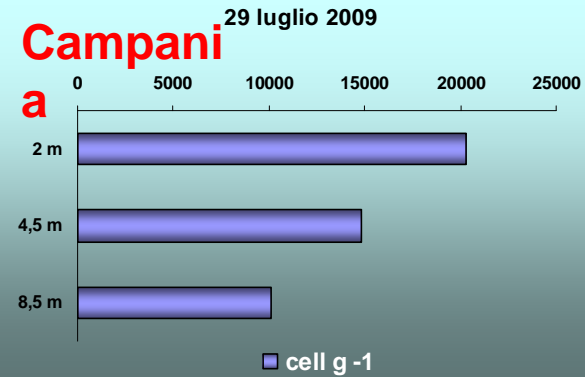


Fig. 5. Vertical distribution of *Ostreopsis ovata* abundances (cells cm⁻²) on seaweeds on September 24th: (A) st.3 and (B) st.5.

Da Totti et al, 2010 Harmful Algae



Chi è?

Uniformità genotipo *O. ovata* italiana e mediterranea, con bassa variabilità genetica

Uniformità genotipo mediterraneo con quello atlantico (sia orientale, es. Canarie, sia occidentale, es. Brasile)

Genotipo mediterraneo differenziato da quello asiatico

Come si identifica?

Messa a punto e validazione di sensibili strumenti molecolari di identificazione tassonomica, che consentono di rilevare basse concentrazioni cellulari, cisti, cellule in campioni di aerosol

Confronto tra metodo classico e 2 metodi speditivi (siringa e provetta): buone correlazioni, possibilità di utilizzo per surveys speditivi su ampie aree

Rilevate variazioni morfologiche legate allo stato di crescita

Non è stata rilevata *O. siamensis*

Sempre presenti le altre dinoficee potenzialmente tossiche (*Coolia monotis*, *Prorocentrum lima*, *Amphidinium cf carterae*)

Ciclo vitale: c'è evidenza che *O. ovata* produca stadi di resistenza?

Caratterizzazione ecofisiologica: quali sono le condizioni ambientali (temperatura, fotoperiodo, irradianza, salinità, concentrazioni di nutrienti) che risultano favorevoli alla crescita di *O. ovata*?

Produzione di tossine: c'è variabilità nella produzione di tossina nelle varie condizioni di crescita?

Produzione di biofilm: quali sono le caratteristiche strutturali e biochimiche dei biofilm prodotti dalla comunità microfitobentonica associata a *O. ovata*?

Produzione di EPS: quale è la composizione elementare di *O. ovata* nelle varie fasi

di crescita e quali sostanze organiche (EPS, proteine e polisaccaridi disciolti) produce questa microalga?

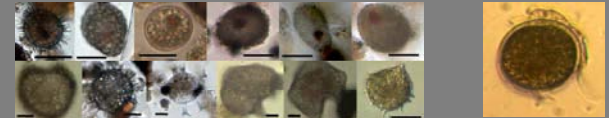
C'è evidenza di interazioni allelopatiche fra *O. ovata* e macroalghe/microalghe?

Ricerca di cisti di resistenza

- La presenza di cisti di resistenza di *Ostreopsis* spp. è stata ricercata nelle aree Campania, Sicilia, Marche e Friuli VG.
- Le analisi microscopiche e le prove di germinazione non hanno finora rilevato la presenza di cisti attribuibili a *Ostreopsis* spp.



Caratterizzazione morfologica di cisti con microscopia



Morfotipo non identificato

Estrazione DNA
totale
sedimento

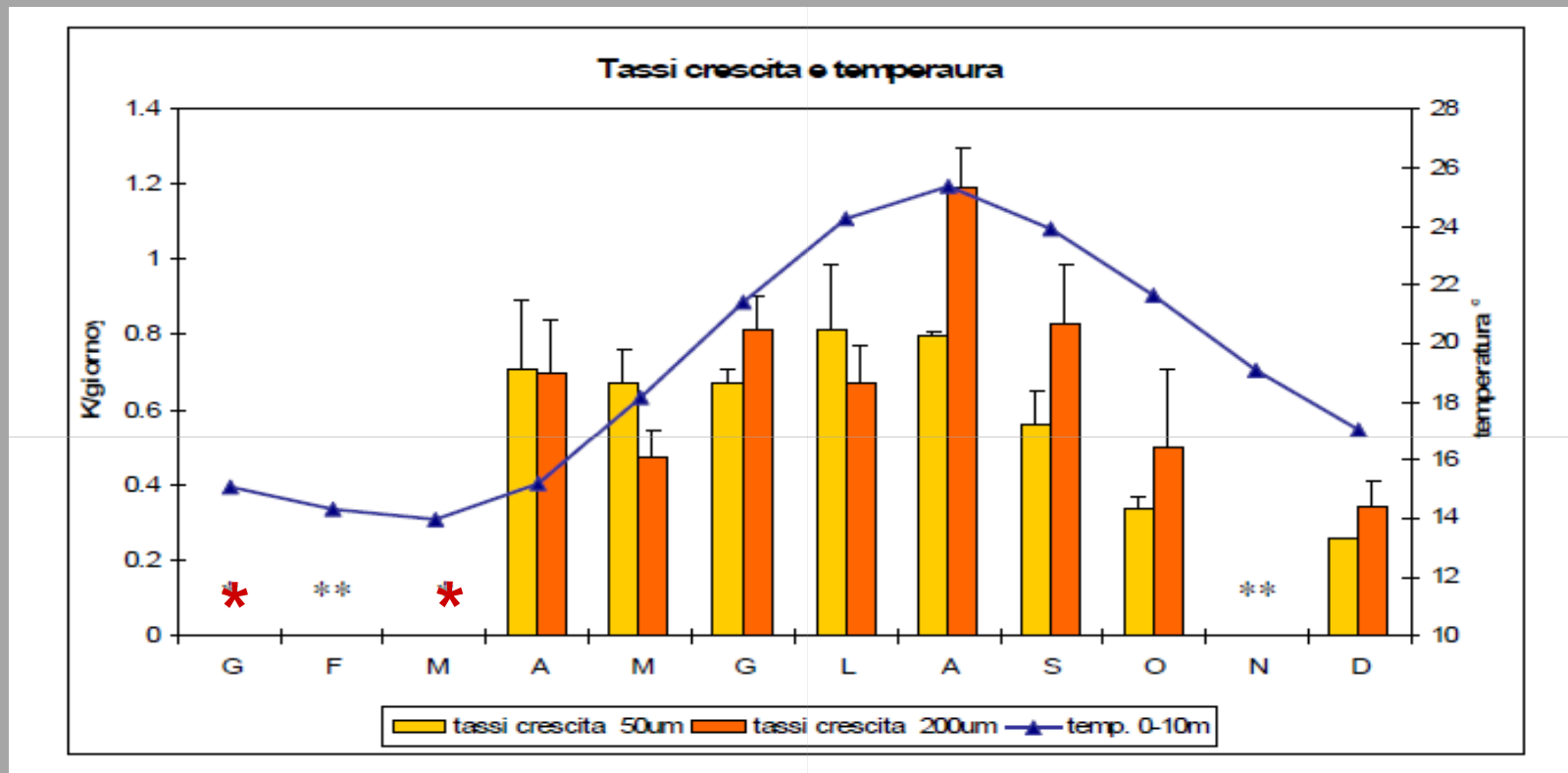


Analisi molecolari di PCR
genere e specie specifica
geni ribosomiali



Identificazione del genotipo *O. ovata*
in campioni di sedimento costiero della
Riviera del Conero

Caratterizzazione ecofisiologica: temperatura fotoperiodo



La crescita è possibile fra 18 e 30°C

La massima crescita fra 18 e 26°C in condizioni longidiurne (12L:12B e 15L:9B)

Bassa variabilità fra le risposte di crescita fra le 3 colture

Produzione di tossine: c'è variabilità nella produzione di tossina nelle varie condizioni di crescita?

Tossine nella coltura di *O. ovata* isolata nel Golfo di Trieste (OST2)

FASE	MATRICE	PLTX µg	OVATX-a µg	<i>O. ovata</i> cell/ml	PLTX pg/cell	OVATX-a pg/cell
Esponenziale	pellet	nd	nd	2230	nd	nd
	filtrato	nd	2,47	2230	nd	2,21
	filtro	nd	0,13	2230	nd	0,12
Senescente	pellet					
	filtrato	0,93	9,11	1950	0,96	9,34
	filtro	nd	0,16	1950	nd	0,17
Tarda senescenza	pellet	0,39	2,24	1180	0,66	3,80
	filtrato	0,99	7,53	1180	1,67	12,77
	filtro	nd	0,11	1180	nd	0,17

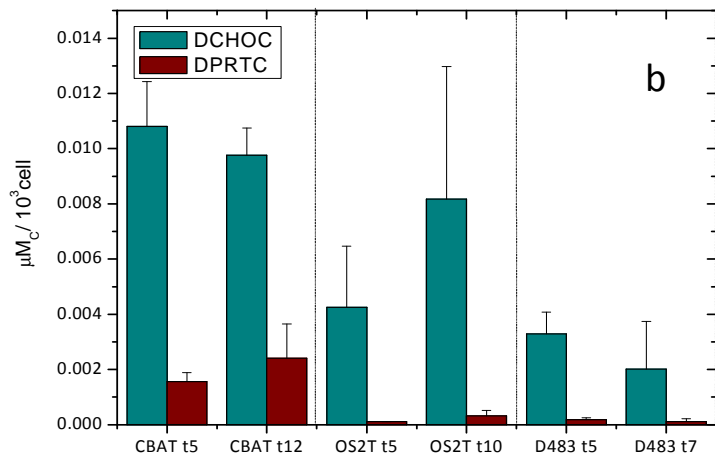
In fase di crescita esponenziale la produzione di pltx risulta non rilevabile mentre la presenza di ovtx è stata rilevata nel disciolto.

Nelle fasi senescente e tarda senescente c'è produzione sia di pltx che di ovtx.

C'è predominanza di ovtx rispetto alla paltx, sia nei pellets che nel filtrato.

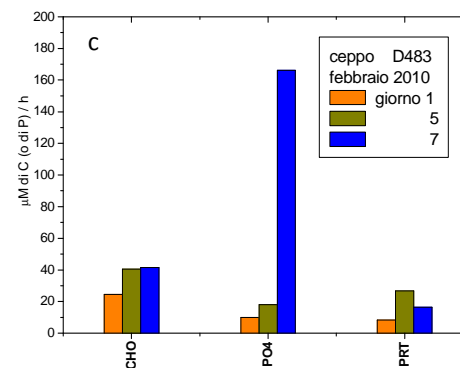
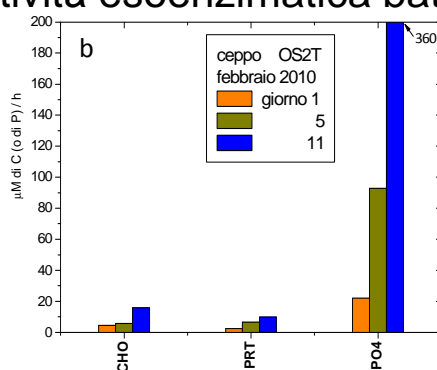
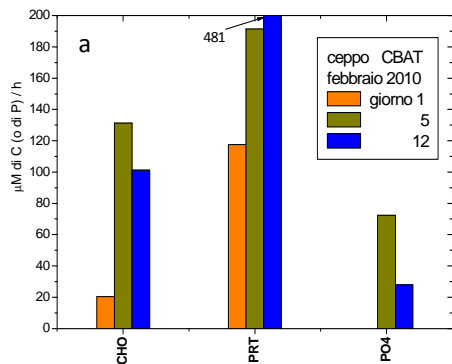
ESP e proteine disciolte, composizione elementale

Carboidrati e proteine disciolte



- Variabilità quali quantitativa di carboidrati e proteine disciolte sia fra le diverse fasi della crescita, sia fra le diverse colture
- Estrema variabilità qualitativa e quantitativa dell'attività esoenzimatica batterica.

Attività esoenzimatica batterica

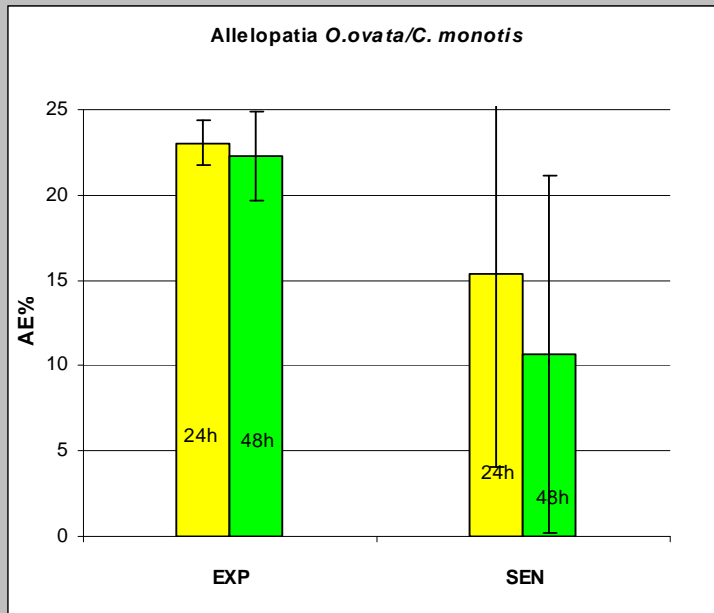


CHO=att. glicosidasi PRT=att. proteasica PO4=att. fosfatasi)

C'è evidenza di interazioni allelopatiche fra *O. ovata* e macroalghe/microalghe?

Specie scelte per l'esperimento

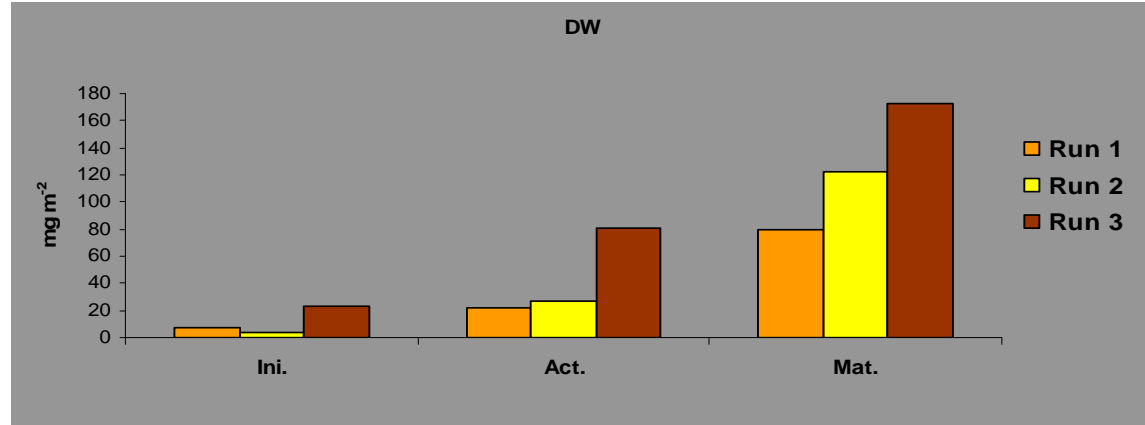
- *Coolia monotis*
- *Coscinodiscus granii*
- *Prorocentrum minimum*



deboli effetti allelopatici, negativi su *Coolia monotis* e positivi su *Coscinodiscus granii*

Biofilm prodotti dalla comunità associata ad *Ostreopsis*

Peso fresco dei biofilm nei tre esperimenti



Nella fase matura di crescita:

- pochi taxa di cianobatteri filamentosi non eterocistici (strutturanti)
- forme coccali coloniali (*Chroococccidiopsis* sp.)
- *Ostreopsis* sp. era abbondante durante lo stadio attivo di crescita, mostrando un successivo decremento
- *Amphidinium* cfr *carterae*
- Diatomee: specie “tube dwelling” e forme solitarie (*Amphora* sp. e *Ceratoneis closterium*)

Cosa potrebbe succedere nel futuro?

La dinoficea *O. ovata* potrebbe causare fioriture tossiche in un numero di siti sempre più ampio in situazioni ambientali abbastanza diversificate causando impatti negativi su:

bivalvi (mitili)

echinodermi (ricci)

altri organismi (patelle, ...)

uomo (aerosol, ingestione?, contatto?)

Sintesi

- *O.ovata* non sembra essere utilizzata come cibo da animali planctonici (**ciliati e copepodi**), ma viene filtrata da mitili e ingerita dai ricci
- Il contatto diretto e prolungato con *O. ovata* danneggia **copepodi, mitili e ricci**
- La detossificazione richiede più di **2 settimane**
- E' possibile individuare e quantificare la presenza di *O. ovata* in animali marini attraverso **metodi molecolari molto sensibili**

Messa a punto di un protocollo per l'identificazione della presenza di DNA di *Ostreopsis* in animali bentonici UNITS

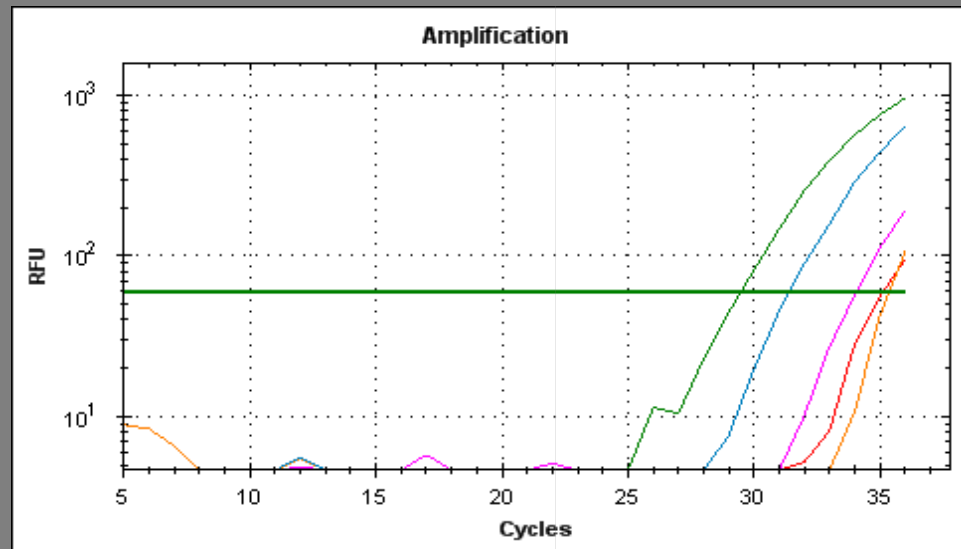


30 mg tessuto di mitilo



1000
200
40
8
1,6

Cellule di
O. ovata



Che fare?

Validare i metodi speditivi poiché sono necessari ed utili per indagare la presenza di *Ostreopsis* su un elevato numero di campioni in situazioni di possibile emergenza (validati su numeri di campioni elevati).

Perfezionare i metodi idonei al campionamento su substrati duri

Conoscere la dinamica di trasferimento nella rete trofica e comprendere gli effetti tossici su organismi bentonici (morie)

Ottimizzare i metodi di campionamento ed analisi ad elevata sensibilità per definire la dinamica del trasferimento e trasporto in aerosol

Perché causa problemi?

Trasferimenti via aerosol

Messa a punto del metodo di campionamento

Identificate tracce di *O. ovata* mediante metodi molecolari

Trasferimenti nella rete trofica

Il microzooplancton non sembra predare *Ostreopsis* mentre per il mesozooplancton non ci sono evidenze conclusive

Messa a punto di metodo molecolare per l'identificazione dell'alga in possibili consumatori

Accumulo di tossine in ricci e mitili durante le fioriture.

Dopo esposizioni prolungate ricci e mitili subiscono danni, anche letali

Detossificazione mitili in 2-3 settimane

Indagini sulla produzione di tossine

Range di concentrazione PITXs per cell in coltura e in campo per i diversi ceppi confrontabile e non molto ampio

Maggiore produzione in fase stazionaria rispetto alla fase esponenziale (in lab)

CONCLUSIONI

Fioriture in piena estate (luglio) in Liguria, Campania, costa ionica della Sicilia (influenza della T e del fotoperiodo)

Fioriture in autunno in Adriatico settentrionale (relazione con la T fotoperiodo non evidente)

Densità max raggiunte in Adriatico maggiori limitatamente ai siti indagati

Idrodinamismo influenza intensità e dinamica della fioritura

Substrati rocciosi preferenziali rispetto alle macroalghe (possibili effetti allelopatici), presenza nel sedimento trascurabile

Probabile assenza di cellule vegetative nei mesi invernali (non ci sono le condizioni di T e fotoperiodo idonei alla crescita)

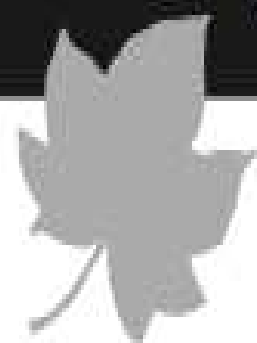
Evidenza che *O. ovata* produce stadi non mobili, in grado di persistere in fase quiescente nei sedimenti quando non è rilevata nelle acque (in inverno/inizio primavera)

Lievi effetti allelopatici di *Ostreopsis* in fase senescente sulla crescita di *Coolia monotis* (negativi) e *Coscinodiscus granii* (positivi)

Trends in *Ostreopsis* proliferation along the Northern Mediterranean coasts

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 A.M., Montserrat Sala M., Thibaut T., Totti C., Vila M., Lemée R.

ORIGINAL
ARTICLE



A phylogeographical study of the toxic benthic dinoflagellate genus *Ostreopsis* Schmidt

Antonella Penna^{1*}, Santiago Fraga², Cecilia Battocchi¹, Silvia Casabianca¹, Maria Grazia Giacobbe³, Pilar Riobó⁴ and Cristiano Vernesi⁵

OPEN ACCESS Freely available online

PLoS one

New Approach Using the Real-Time PCR Method for Estimation of the Toxic Marine Dinoflagellate *Ostreopsis* cf. *ovata* in Marine Environment

Federico Perini^{1,2}, Anna Casabianca^{1,2}, Cecilia Battocchi¹, Stefano Accoroni², Cecilia Totti², Antonella Penna^{1*}



Contents lists available at ScienceDirect

Toxicol

journal homepage: www.elsevier.com/locate/toxicol

Trends in *Ostreopsis* proliferation along the Northern Mediterranean coasts

Luisa Mangialajo^{a,*}, Nicolas Ganzin^b, Stefano Accoroni^c, Valentina Asnaghi^d, Aurélie Blanfuné^{e,a}, Marina Cabrini^f, Riccardo Cattaneo-Vietti^d, Fabienne Chavanon^b, Mariachiara Chiantore^d, Stéphanie Cohu^{a,c}, Eleonora Costa^d, Daniela Fornasaro^f, Hubert Grosselet^b, Françoise Marco-Miralles^b, Mercedes Masó^g, Albert Reñé^g, Anna Maria Rossi^d, M. Montserrat Sala^g, Thierry Thibaut^a, Cecilia Totti^c, Magda Vila^g, Rodolphe Lemée^e

Marine Pollution Bulletin 60 (2010) 1074–1084



Contents lists available at ScienceDirect

Marine Pollution Bulletin

journal homepage: www.elsevier.com/locate/marpolbul

Monitoring toxic microalgae *Ostreopsis* (dinoflagellate) species in coastal waters of the Mediterranean Sea using molecular PCR-based assay combined with light microscopy

Cecilia Battocchi^a, Cecilia Totti^b, Magda Vila^c, Mercedes Masó^c, Samuela Capellacci^a, Stefano Accoroni^b, Albert Reñé^c, Michele Scardi^d, Antonella Penna^{a,*}

- F. Guerrini, L. Pezzolesi, A. Felleri, M. R., P. Ciminiello, C. Dell'Aversano, L. Tartaglione, E. Dello Iacovo, E. Fattorusso, M. Forino and R. Pistocchi
- Comparative growth and toxin profile of cultured *Ostreopsis ovata* from the Tyrrhenian and Adriatic Seas
- *Toxicon*, **55**, 211-220 (2010).
- 2.. P. Ciminiello, C. Dell'Aversano, E. Fattorusso, M. Forino, L. Tartaglione, L. Boschetti, S. Rubini, M. Cangini, S. Pigozzi and R. Poletti
- Complex toxin profile of *Mytilus galloprovincialis* from the Adriatic sea revealed by LC-MS
- *Toxicon*, **55**, 280-288 (2010)
-
- P. Ciminiello, C. Dell'Aversano, E. Dello Iacovo, E. Fattorusso, M. Forino, L. Grauso, L. Tartaglione, F. Guerrini, R. Pistocchi
- Complex palitoxin-like profile of *Ostreopsis ovata*. Identification of four new ovatoxins by high resolution LC-MS
- *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, **24**, 2735–2744 (2010)
-
- 4. P. Ciminiello, C. Dell'Aversano, E. Dello Iacovo, E. Fattorusso, M. Forino, L. Grauso, L. Tartaglione, F. Guerrini, L. Pezzolesi, R. Pistocchi
- Characterization of 27-hydroxy-13-desmethyl spirolide C and 27-oxo-13,19-didesmethyl spirolide C. Further insights into the complex Adriatic *Alexandrium ostenfeldii* toxin profile
- *Toxicon*, **56**, 1327 (2010)
-
- 5. P. Ciminiello, C. Dell'Aversano, E. Fattorusso, M. Forino
- Palytoxins: A still haunting Hawaiian curse
- *Phytochem. Rev* **9**, 491 (2010)
-
- 6. P. Ciminiello, C. Dell'Aversano, E. Fattorusso, M. Forino, L. Grauso, L. Tartaglione
- A 4-decade-long (and still ongoing) hunt for palytoxins chemical architecture
- *Toxicon* **57**, 362 (2011)
-

- 7. P. Ciminiello, C. Dell'Aversano, E. Dello Iacovo, E. Fattorusso, M. Forino, L. Tartaglione
- LC-MS of palytoxin and its analogues: State of the art and future perspectives
- *Toxicon* **57**, 376 (2011)
-
- R. Pistocchi, L. Pezolesi, F. Guerrini, S. Vanucci, C. Dell'Aversano, E. Fattorusso
- A review on the effects of environmental conditions on growth and toxin production of *Ostreopsis ovata*
- *Toxicon* **57**, 421 (2011)
-

Grazie !



SVILUPPI DI METODI DI CAMPIONAMENTO SPEDITIVI PER LA RACCOLTA E IL CONTEGGIO DI MICROALGHE BENTONICHE

di Adriana Zingone, Stazione Zoologica Anton Dohrn di Napoli

Riassunto

Diversi metodi sono stati recentemente proposti per rendere più breve e sostenibile il monitoraggio delle fioriture di *Ostreopsis*. Uno dei metodi proposti consiste di 3 passaggi:

1) Un frammento di tallo della macroalga prescelta (circa 5 g di peso) viene prelevato e posto in un tubo Falcon (50 ml), portato a volume con acqua di mare e fissato con formalina o lugol. Prima o dopo la fissazione il campione viene agitato con vigore per distaccare le cellule di *O. cf. ovata* dal tallo della macroalga.

2) Per rapportare la concentrazione di *O. cf. ovata* al peso della macroalga, il frammento viene estratto, lasciato sgocciolare nel tubo Falcon e quindi pesato. In alternativa, si può ricavare il peso indirettamente misurando il volume approssimativo del frammento di tallo dalla variazione del volume del liquido nel tubo Falcon prima e dopo l'estrazione del frammento. Per conoscere il fattore di conversione fra volume e peso che è tipico di ogni specie di macroalga è necessario il confronto fra peso e volume di un buon numero di campioni.

3) Per effettuare il conteggio vengono prelevate, con pipetta automatica, tre aliquote (3 repliche) da 20 microlitri ciascuna, che vengono poste affiancate e regolarmente distanziate su uno stesso vetrino portaoggetto. Ogni goccia viene coperta con un vetrino coprioggetto di 18 mm di lato. Dai conteggi delle cellule nelle tre gocce si ottiene una media (M) corrispondente al numero di cellule in 20 microlitri di liquido. I valori dei conteggi vengono espressi in n° cell totali nel tubo moltiplicando per 50 e per il volume finale del liquido nel tubo Falcon (in ml) e quindi trasformati in n° cell/g macrofita dividendo per il peso del frammento di macroalga stimato o misurato. In caso di un numero di cellule troppo basso, è preferibile effettuare i conteggi su quantità maggiori di campione con il metodo Utermöhl al microscopio invertito

Il metodo presenta i seguenti vantaggi:

- si preleva una quantità minore di materiale;
- si utilizza una quantità minore di fissativo;
- la procedura per processare il campione è più rapida;
- ci sono meno passaggi critici;
- il conteggio si può effettuare senza sedimentazione;
- si possono evidenziare differenze a piccola scala anche laddove non sono disponibili grosse quantità della macroalga ospite;
- si ottiene un valore che ha la stessa unità di misura (cell/g di macroalga) di quelli ottenuti con il metodo classico..

L'unico svantaggio è dato dal fatto che, prelevando una quantità minore di materiale, c'è un errore maggiore nell'estrapolazione dell'abbondanza di *O. ovata* sulla macroalga..

Il metodo speditivo della Falcon è stato confrontato con quello "classico", nell'ambito del programma "Gestione del rischio associato alle fioriture di *Ostreopsis ovata* nelle coste italiane" Regione Campania, campionando in quattro date, su tre stazioni

(Nisida, Gaiola e Rocce Verdi), con tre repliche poco distanti, per un totale di 36 campioni. La correlazione fra le due misure è risultata bassa considerando i singoli dati, ma è alta quando si considerano le medie dei tre campioni per prelievo, che si spiega proprio con l'alta variabilità del prelievo.

Un ulteriore metodo speditivo è quello della "siringa". Questo metodo si avvale di una siringa modificata che aspira una quantità di acqua pari a 20 ml. Il prelievo delle microalghe viene effettuato mantenendo la siringa leggermente inclinata rispetto alla superficie del substrato, in modo da non occludere completamente il puntale. L'operazione viene ripetuta altre due volte aspirando in prossimità del primo prelievo e ogni volta si svuota la siringa nello stesso contenitore per ottenere un campione di 60 ml poi fissato con lugol. La sedimentazione e il conteggio viene effettuato secondo il metodo Utermöhl. I risultati vengono espressi in cells/ml.

Al fine di confrontare il metodo classico con quello della siringa, l'ENEA (La Spezia) e l'ARPA Liguria hanno effettuato contemporaneamente un campionamento settimanale, da luglio a settembre 2009, nello stesso punto e sulla stessa alga. L'ARPAL ha utilizzato il metodo classico (1 campione costituito da 3 talli, cells/gr), l'ENEA invece il metodo della siringa (media di 3 campioni da 60ml per tallo, cells/ml). Il risultato è stato che per questo tipo di substrato macroalgale i dati relativi ai due metodi sono altamente correlati e forniscono informazioni paragonabili sull'abbondanza di *O. ovata*.



stazione zoologica anton dohrn

Sviluppi di metodi di campionamento speditivi per la raccolta e il conteggio di microalghe bentoniche

Adriana Zingone

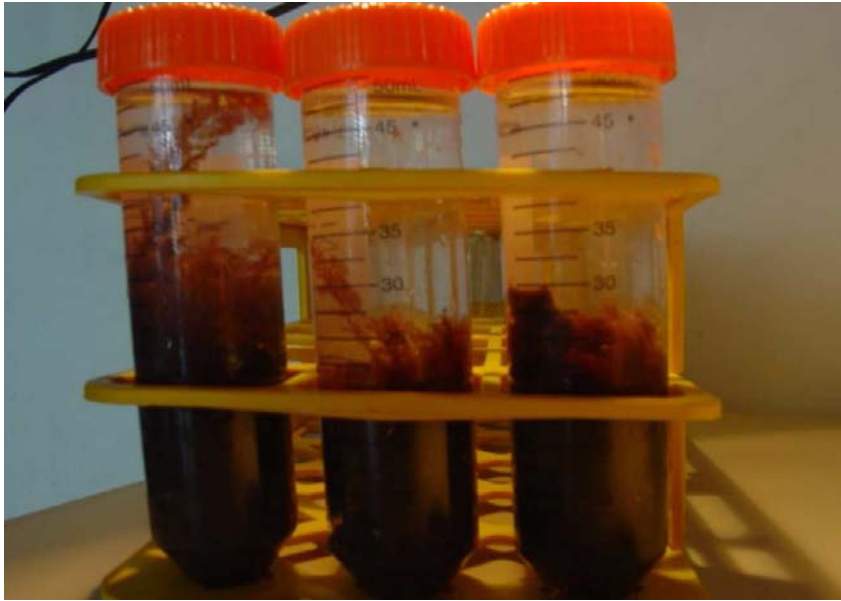
Stazione Zoologica Anton Dohrn di Napoli

**Programma “Gestione del rischio associato alle fioriture di
Ostreopsis ovata nelle coste italiane” Regione Campania (con
ARPAC, Univ. Federico II e IZSM)**



ISPRA
Istituto Superiore per la Protezione
e la Ricerca Ambientale

**Giornata di studio e confronto:
Fioriture algali di *Ostreopsis ovata* lungo le coste italiane
Roma, 23 Marzo 2011**



3 step alternativi:

- **Prelievo** di un frammento di tallo
- **Stima della concentrazione** su gocce di volume noto
- **Stima del peso della macroalga** attraverso la differenza di volume

O. ovata: metodo alternativo: Correlazione peso/volume per la macroalga

Il volume della macroalga si ottiene per differenza, sottraendo dal volume iniziale di liquido nella FALCON (ca 50 ml) il volume finale dopo aver estratto la macroalga



Il rapporto peso/volume varia a seconda delle macroalghe campionate!!!

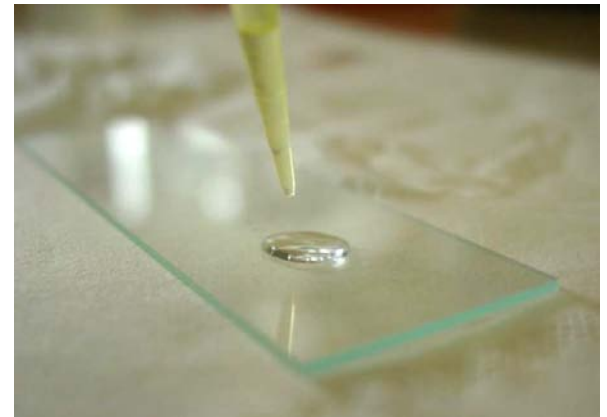
1. Metodo Utermohl

- Camere di sedimentazione
- 3 ml

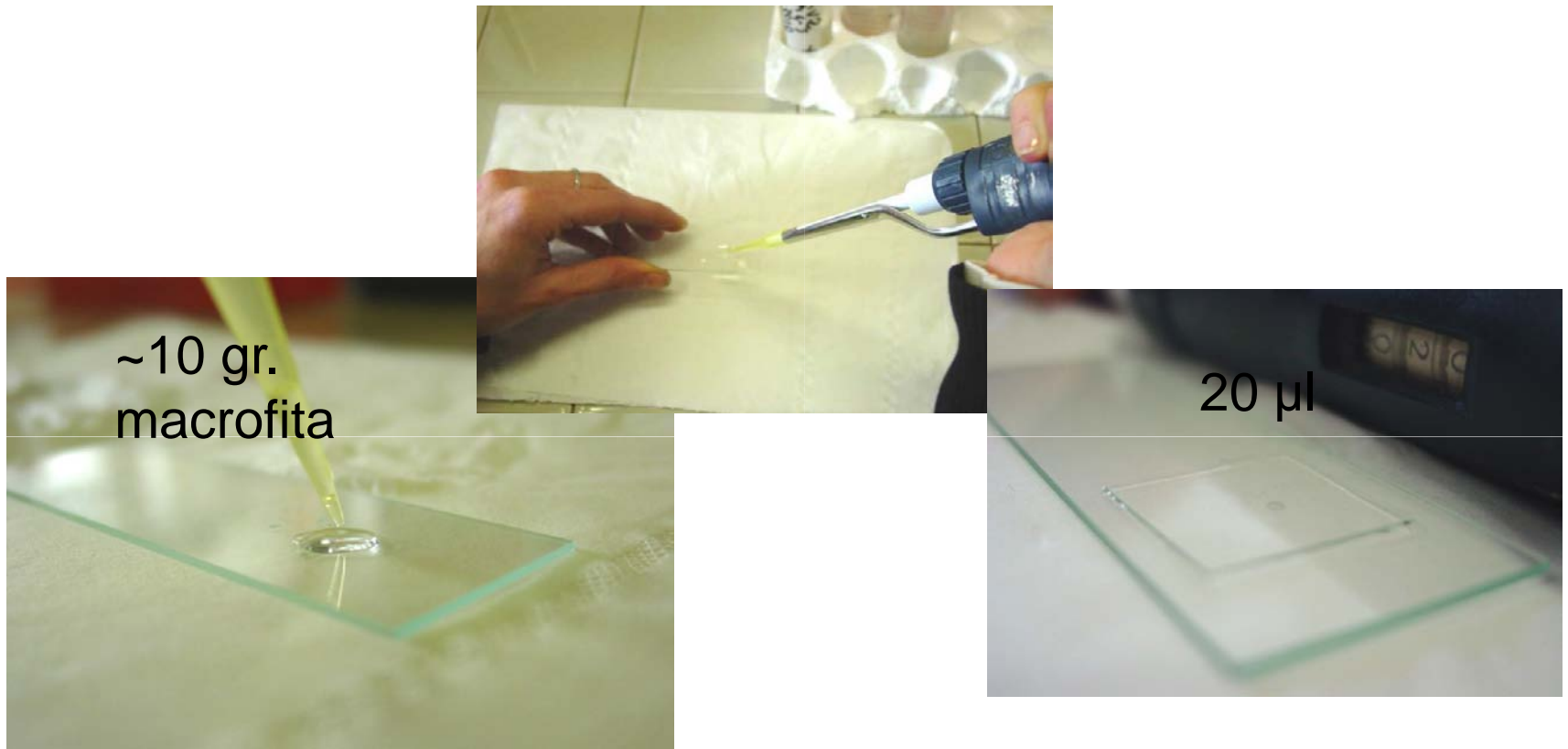
Valori espressi in
n° cell / grammi macrofita

2. Metodo speditivo

- Vetrino
- 20 μ l



O. ovata: metodo alternativo: CONTEGGIO



Coprioggetto 18x18

3 repliche (ripetere il conteggio se diverse)

VANTAGGI:

- Si preleva una quantità minore di materiale
- Si utilizza una quantità minore di fissativo
- La procedura per processare il campione è più rapida
- Ci sono meno passaggi critici
- Il conteggio si può effettuare senza sedimentazione
- Si possono evidenziare differenze a piccola scala anche laddove non sono disponibili grosse quantità della macroalga ospite
- Si ottiene un valore in concentrazione per grammo o per superficie

SVANTAGGI:

- Prelevando una quantità minore di materiale, c'è un errore maggiore nell'estrapolazione



Available online at www.sciencedirect.com



Harmful Algae 6 (2007) 658–669

**HARMFUL
ALGAE**

www.elsevier.com/locate/hal

A survey of epiphytic dinoflagellates from the coastal waters of the island of Hawai‘i

Michael L. Parsons ^{a,*}, Linda B. Preskitt ^b

^a *Marine Science Department, University of Hawai‘i at Hilo, 200 W. Kawili Street, Hilo, HI 96720, United States*

^b *Botany Department, University of Hawai‘i at Mānoa, 3190 Maile Way, Honolulu, HI 96822, United States*

Received 24 October 2006; received in revised form 18 December 2006; accepted 17 January 2007

Macroalgal samples were carefully picked (taking care to leave the holdfasts behind), placed into **50 ml screw-capped polypropylene centrifuge tubes**, and filled to approximately 49 ml with local seawater. Approximately 1 ml of 25% glutaraldehyde was added to each sample back onshore. All macroalgae samples were stored on ice in a cooler for transportation back to the laboratory.

Ostreopsis ovata
Ostreopsis sp. 1

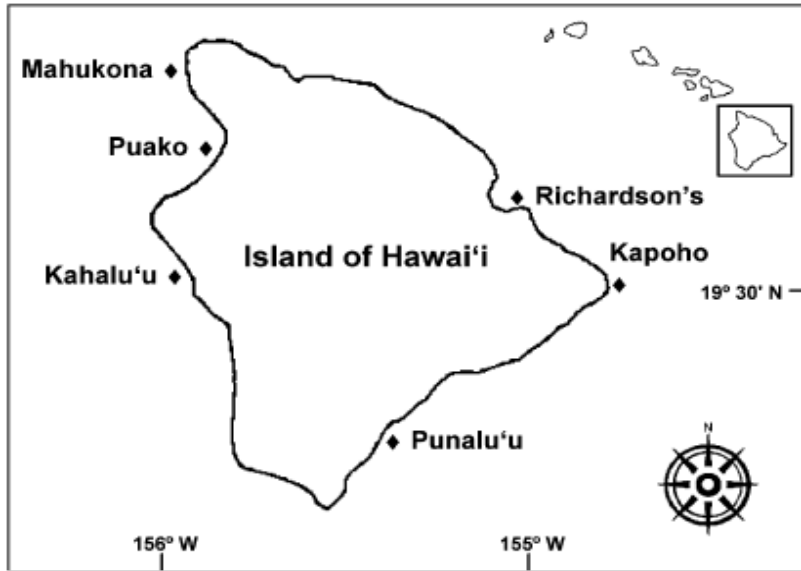
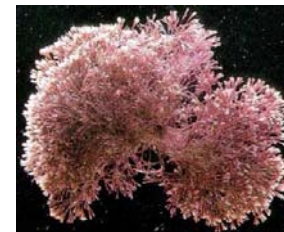


Fig. 1. Map of the island of Hawai'i showing the locations of the six sites sampled for this study.

Inconsistent host preference:

1. a host may be linked to a site
2. a host may produce species-specific allelopathic substances



Siti di campionamento



NISIDA

40° 47' 53.93"N
14° 09' 44.44" E

ROCCE VERDI

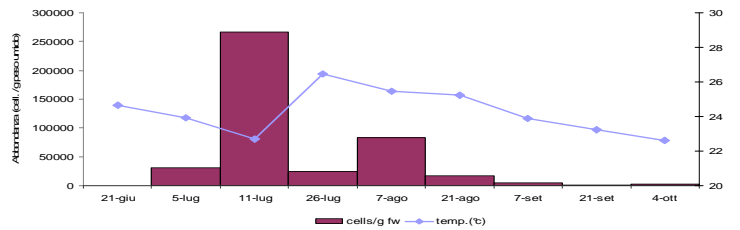
40° 47' 85.50" N
14° 12' 09.50" E

GAIOLA

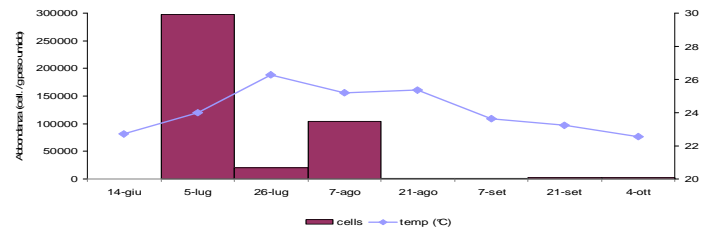
40° 47' 33.23" N
14° 11' 18.79" E

Programma “Gestione del rischio associato alle fioriture di *Ostreopsis ovata* nelle coste italiane” Regione Campania

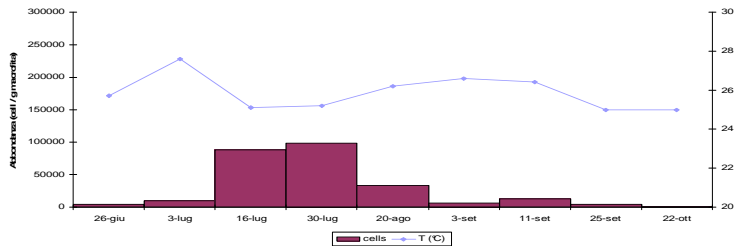
ROCCE VERDI 2007



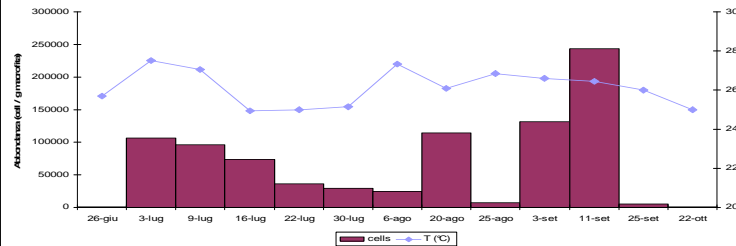
GAIOLA 2007



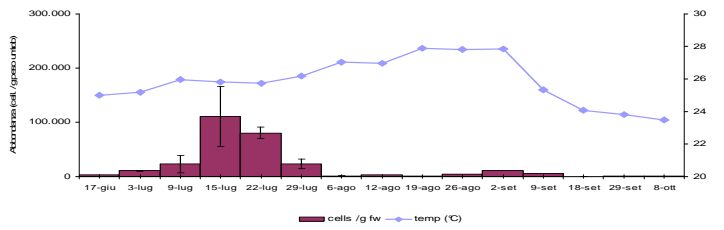
ROCCE VERDI 2008



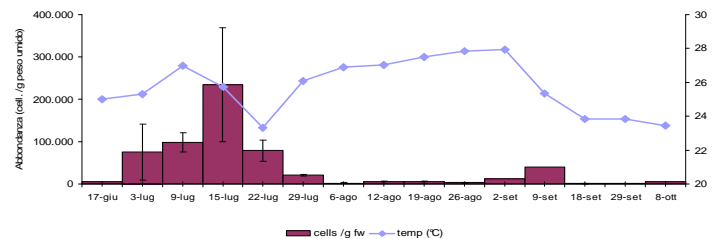
GAIOLA 2008



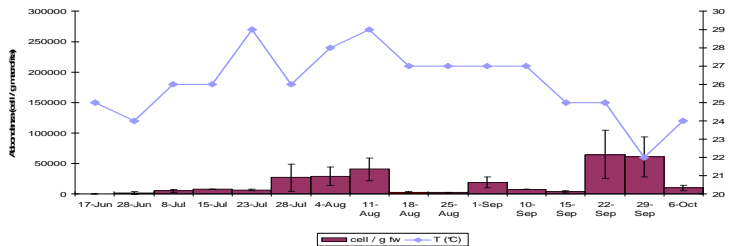
ROCCE VERDI 2009



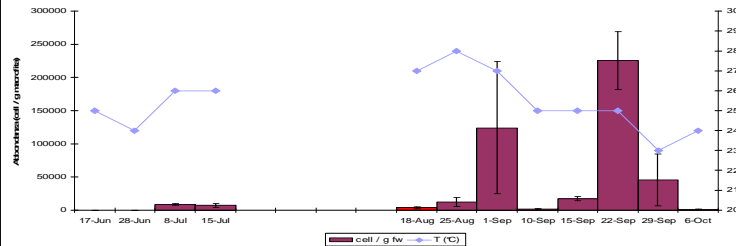
GAIOLA 2009



ROCCE VERDI 2010

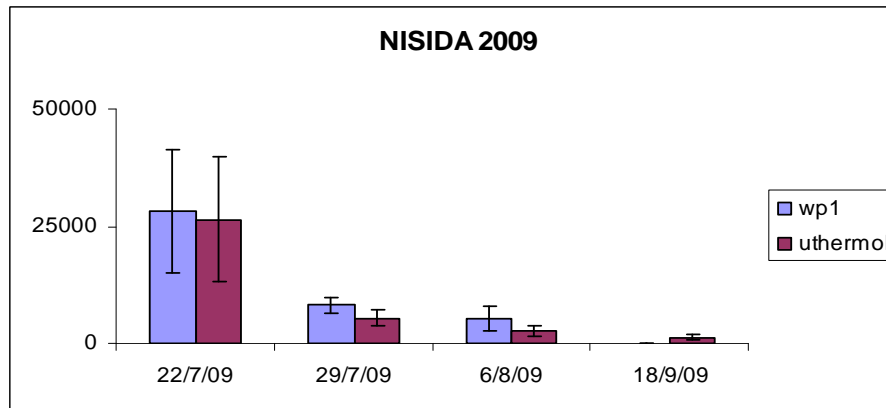
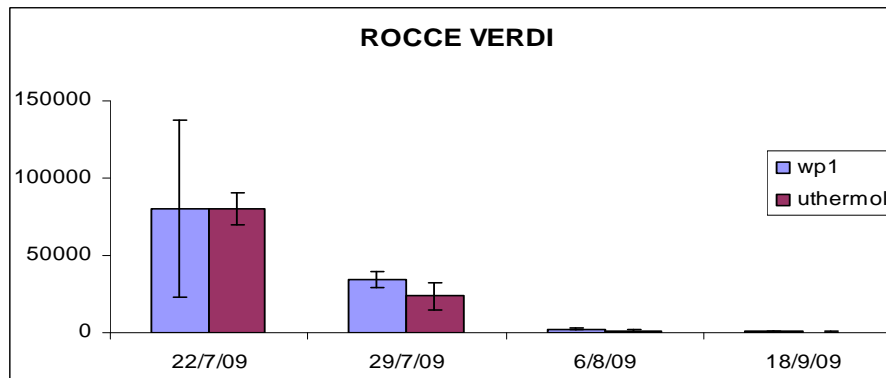
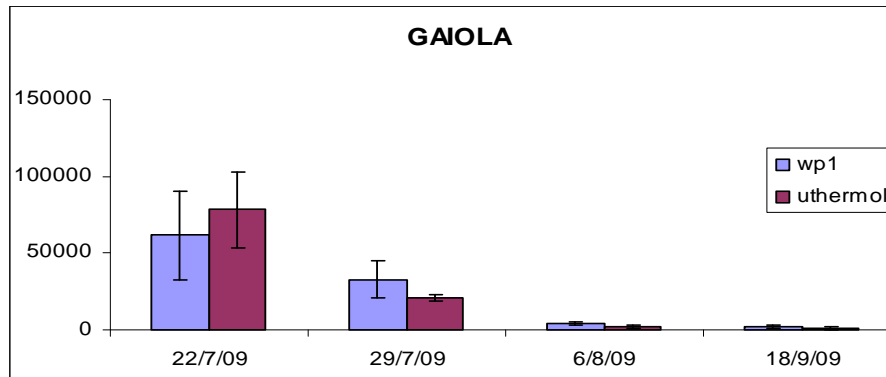


GAIOLA 2010



O. ovata: metodo alternativo

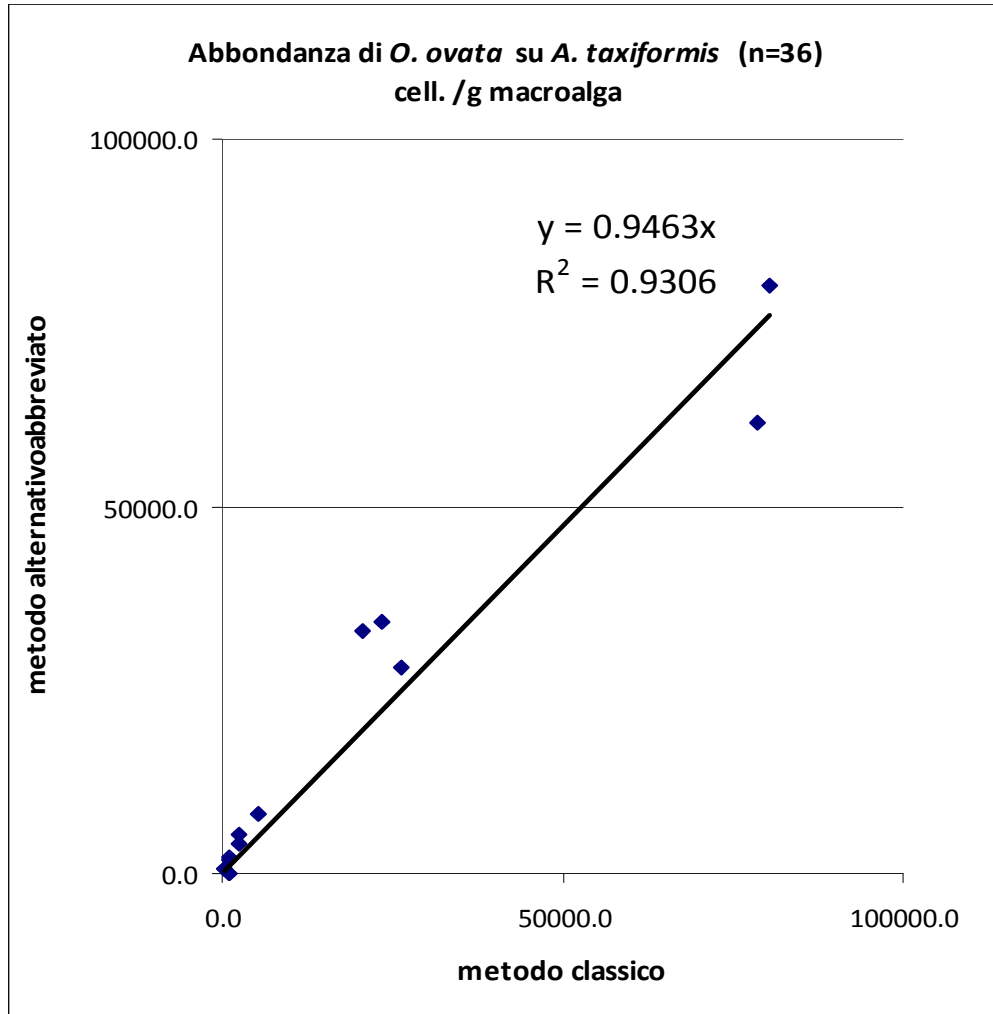
3-6 g di alga
in tubo 50 ml
3 repliche:
20 μ l di campione
Coprioggetto 18x18mm



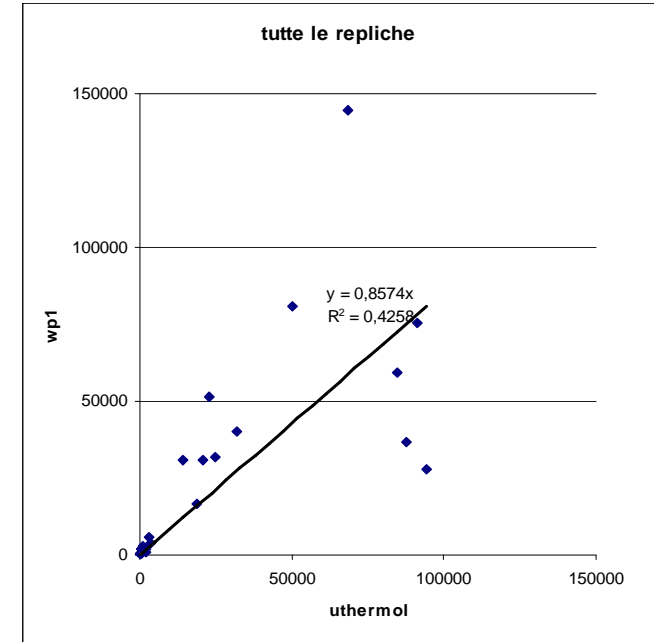
O. ovata: metodo alternativo: **CONFRONTO**

tutte le stazioni

valori medi (3 repliche)

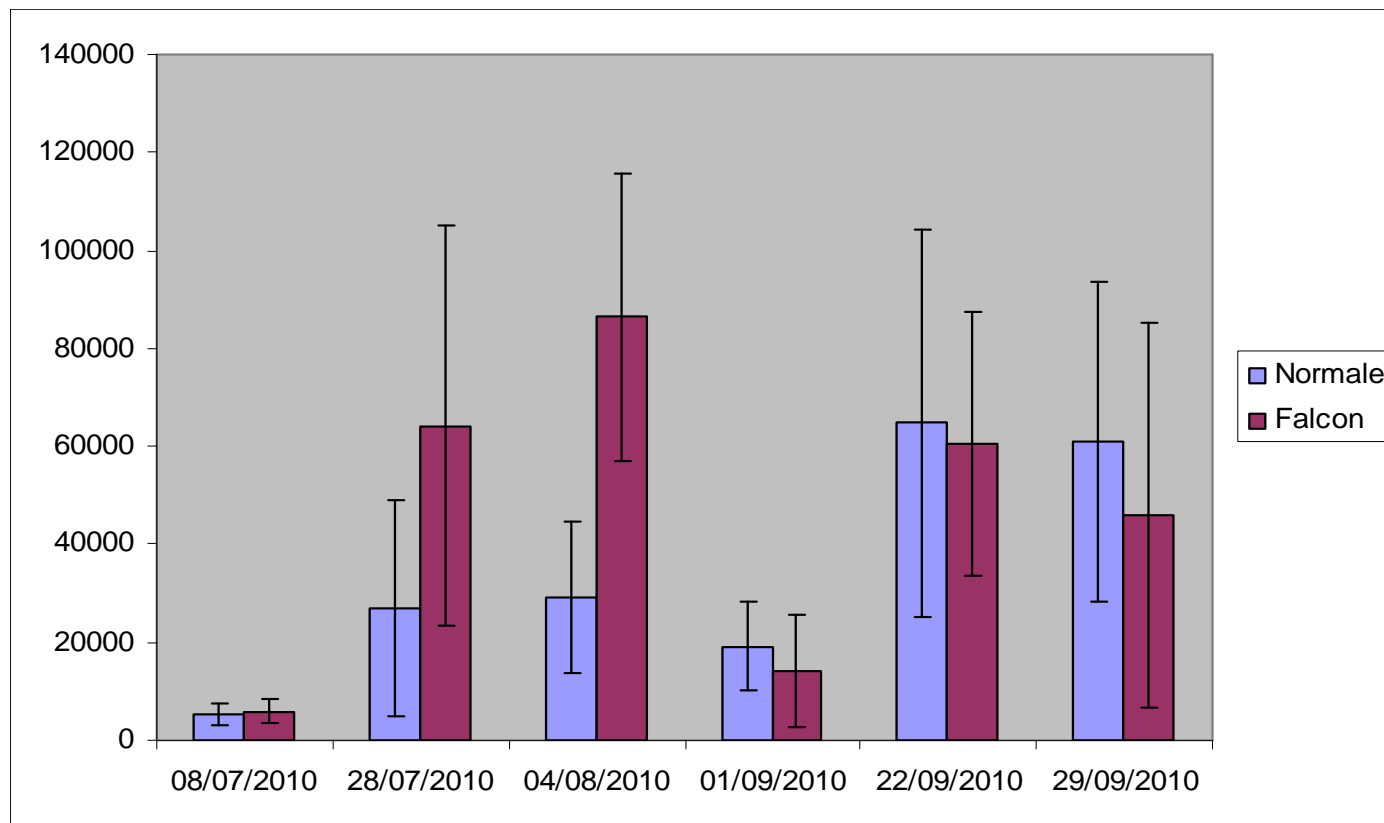


singoli valori



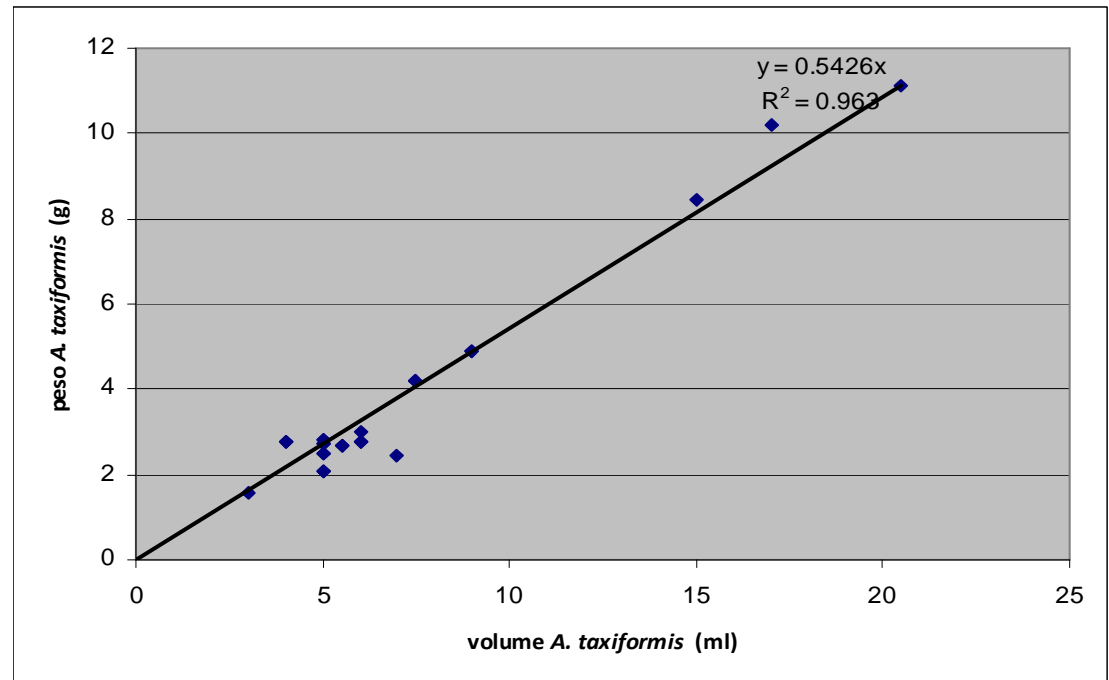
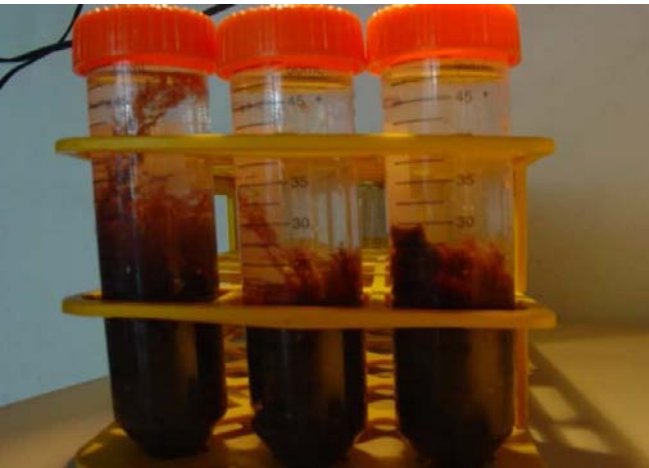
Il test è stato eseguito campionando in **quattro date** su **tre stazioni** con **tre repliche** poco distanti, per un totale di 36 campioni analizzati sia con il metodo classico che con quello alternativo

O. ovata: metodo alternativo: **CONFRONTO 2010**



O. ovata: metodo alternativo: Correlazione peso/volume per la macroalga

Il volume della macroalga si ottiene per differenza, sottraendo dal volume iniziale di liquido nella FALCON (ca 50 ml) il volume finale dopo aver estratto la macroalga



Il rapporto peso/volume varia a seconda delle macroalge campionate!!!

O. ovata: metodo alternativo

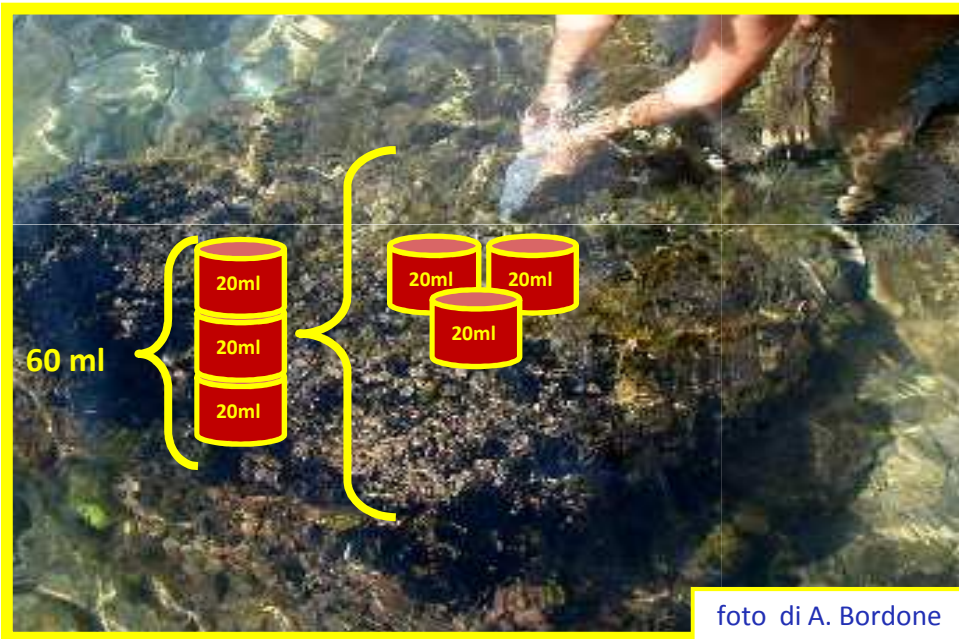
10 ml volume macroalga = ca 5 gr macroalga (*A. taxiformis*)

N° cellule contate per goccia di 20 μ l

<i>N</i>	cell g ⁻¹ fw	Rischio
1	400	Basso
5	2000	
10	4000	
20	8000	
30	12000	Medio
40	16000	
50	20000	
60	24000	
70	28000	
80	32000	Alto
90	36000	
100	40000	
150	60000	
200	80000	Altissimo
500	200000	
1000	400000	

Prelievo

Il prelievo delle microalghe viene effettuato mantenendo la siringa leggermente inclinata rispetto alla superficie del substrato, in modo da non occludere completamente il puntale. **L'aspirazione di un volume di 20 ml viene quindi effettuato su una superficie di 20 mm².**



Ripetere l'operazione
altre due volte
aspirando in prossimità del
primo prelievo e ogni volta
svuotare le siringate nello stesso
contenitore
in modo da ottenere
un campione di 60 ml
(20+20+20).

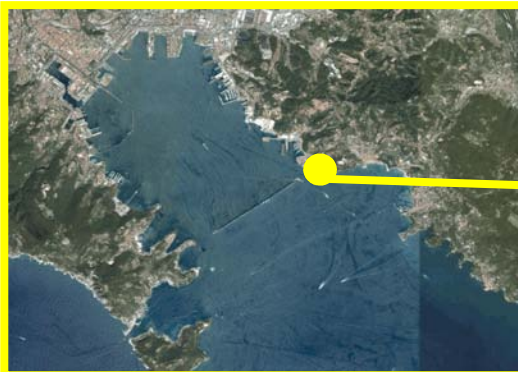
I campioni vengono fissati con lugol .

La sedimentazione e il conteggio viene effettuato secondo il metodo Utermöhl.

I risultati vengono espressi in **cells/ml**.

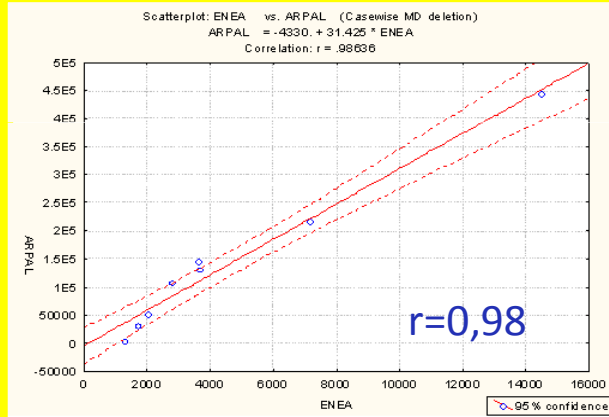
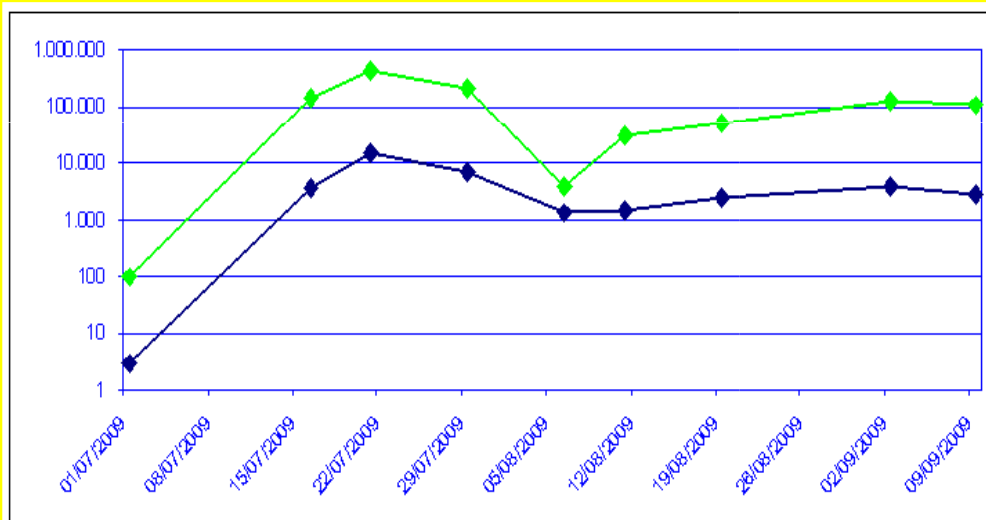
confronto fra i due metodi di prelievo

O
S
T
R
E
O
P
S
I
S
O
V
A
T
A



campionamento settimanale 1/7/2009-9/9/2009

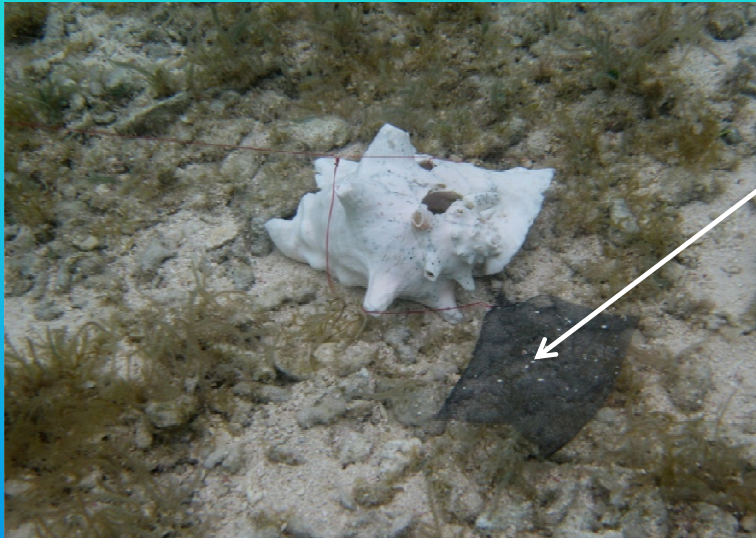
ENEA e ARPAL
contemporaneamente
nello stesso punto
sulla stessa alga



- ◆ Campioni ARPAL cells/gr metodo classico
(1 campione costituito da 3 talli)
- ◆ Campioni ENEA cells/ml metodo siringa
(media di 3 campioni da 60ml per tallo)

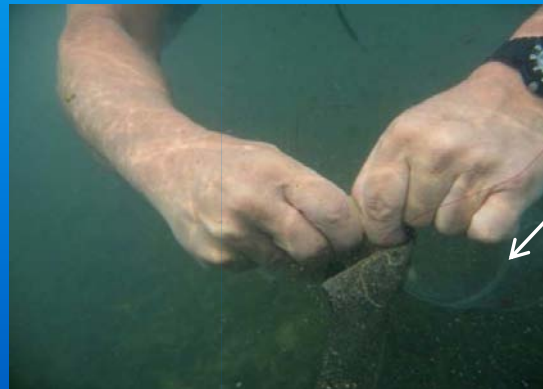
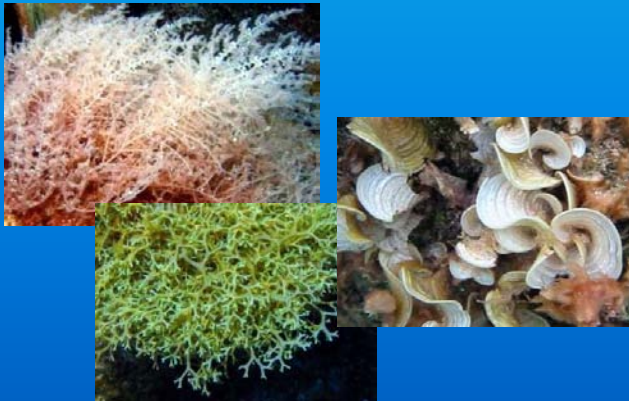
per questo tipo
di substrato macroalgale
i dati relativi ai due metodi
sono altamente correlati
e forniscono le stesse
informazioni

Gambierdiscus Artificial Substrate

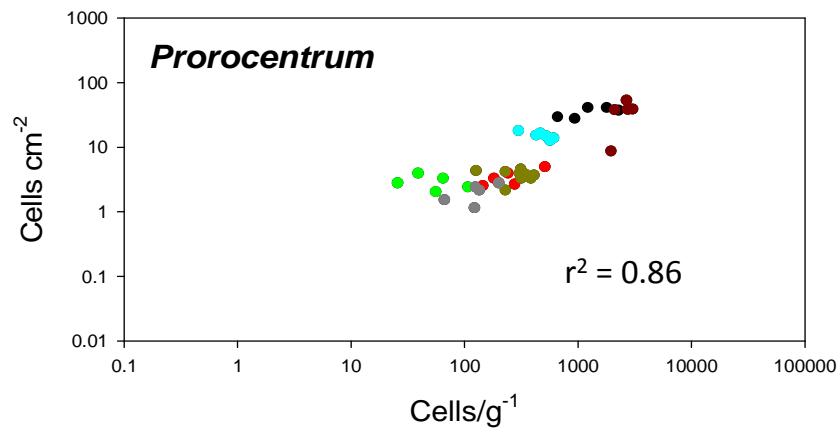
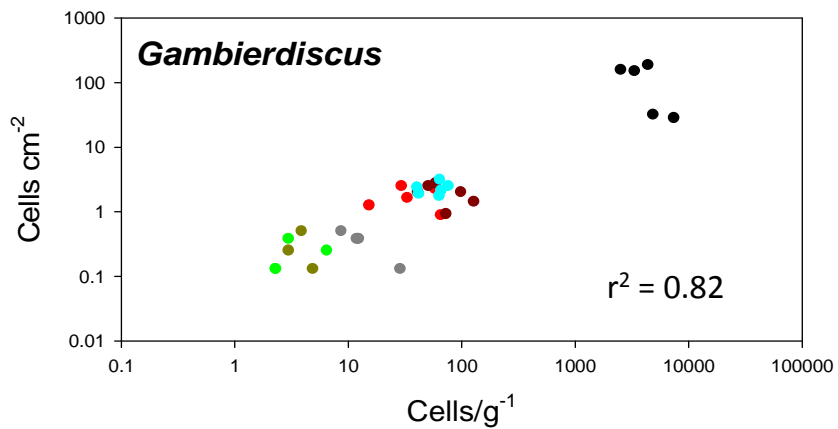


- Measured pieces of window screen anchored to bottom (or suspended in water column) provides uniform surface area
- Non destructive
- Can be deployed in all locations
- Can be deployed for different time periods

It is difficult to know how counts from this method relate to “ambient abundance”.



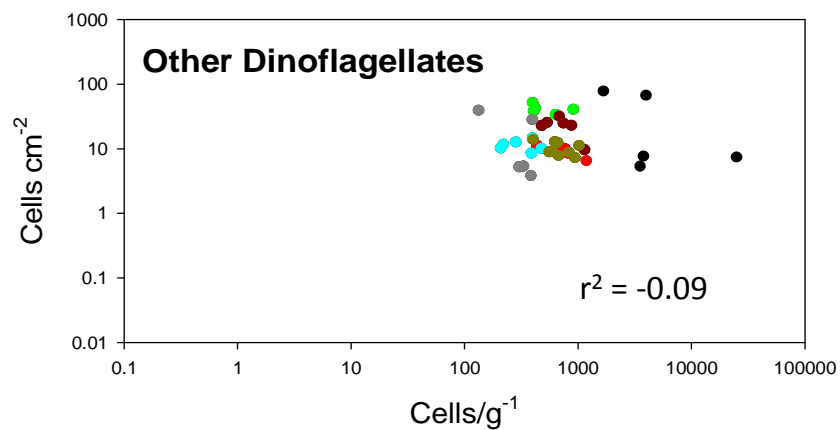
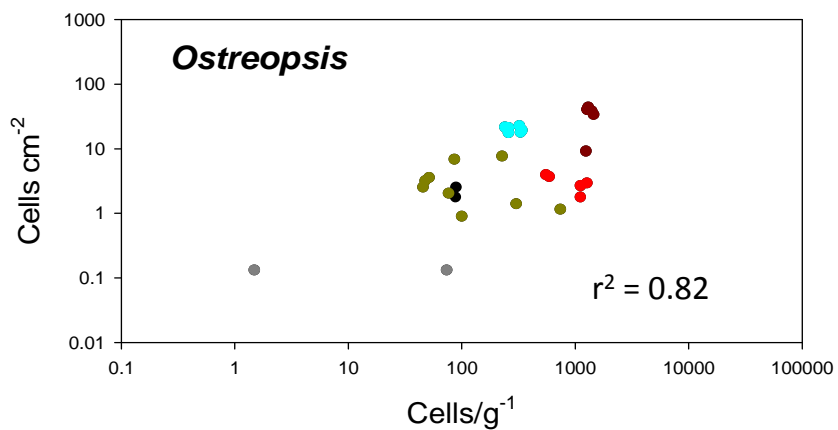
Window screen is detached underwater, placed in wide mouth bottle, capped, returned to surface & shaken. Samples are sieved to remove large particles, cells are counted & normalized to surface area of screen.



Central Lagoon – Belize
 Unpublished data S. Kibler,
 P. Tester, NOAA

Stations

- DC
- SWC
- SB
- CBC-1
- CBC-2
- CBC-3
- BGR



INIZIATIVE INTERNAZIONALI SCIENTIFICHE ED ORGANIZZATIVE SULLE ALGHE TOSSICHE BENTONICHE

di Adriana Zingone, Stazione Zoologica Anton Dohrn di Napoli

Riassunto

Negli ultimi anni si sono moltiplicate le iniziative per lo studio e la gestione delle alghe bentoniche potenzialmente tossiche a livello internazionale. In particolare, l'UNESCO-IOC (Intergovernmental Oceanographic Committee) sin dal 1992 ha sviluppato l'IOC HAB-Programme: (<http://ioc-unesco.org/hab>) per

- migliorare le capacità di gestione e scientifiche sulle alghe tossiche in un contesto globale;
- identificare risorse che permettano alla comunità internazionale di continuare nelle iniziative necessarie a sostenere la formazione, la ricerca e la diffusione di informazioni.

Nell'ambito delle attività scientifiche, l'IOC-HAB, insieme allo Scientific Committee on Ocean research (SCOR) coordina un programma a larga scala, GEOHAB (Global Ecology and Oceanography of Harmful Algal Blooms) che promuove le ricerche e la conoscenza delle fioriture algali nocive per poter migliorare la gestione del loro impatto sulle attività e la salute umana, con un approccio comparativo fra organismi e sistemi. La struttura di GEOHAB consiste sia di attività di base quali:

- Coordinamento
- Modeling
- Gestione Dati
- Formazione
- Remote Sensing

sia di Programmi di ricerca (Core Research Programmes, CRP) su argomenti scelti, quali:

- HABs in sistemi di Upwelling
- HABs in sistemi eutrofizzati
- HABs in sistemi stratificati
- HABs in fiordi e baie
- HABs Bentoniche (Benthic Harmful Algal Blooms, BHABs)

Quest'ultimo CRP in ordine di tempo riguarda proprio l'ecologia delle fioriture di alghe tossiche bentoniche, che includono principalmente specie appartenenti ai generi *Ostreopsis*, *Gambierdiscus* e *Prorocentrum*. Il CRP GEOHAB-BHAB è stato lanciato in un workshop svoltosi a giugno 2010 ad Honolulu, il cui rapporto finale è in fase di completamento, durante il quale sono state discusse tematiche pertinenti quali:

- quante specie sono effettivamente coinvolte nelle fioriture bentoniche;
- qual è la reale distribuzione geografica di queste specie;
- quali sono le loro caratteristiche biologiche ed ecologiche;
- quali sono i tipi di ambienti dove queste microalghe bentoniche fioriscono;
- quali sono i cicli interannuali a lungo termine di questi organismi;
- come si fa a prevedere i rischi che questi organismi comportano, in particolare per la salute umana;
- quali metodologie sono più adeguate per il loro studio.

Il programma IOC HAB viene periodicamente discusso e rivisto dall'Intergovernmental Panel on Harmful Algal Blooms (IPHAB), la cui X sessione si svolge a Parigi nell'aprile 2011. Tra le varie attività in discussione all'IPHAB-X, ricordiamo:

- gruppi di lavoro regionali (Sud -America, Pacifico Occidentale, nord Africa, Caraibi);
- formazione;
- ricerca scientifica (GEOHAB);
- HAB e salute umana, regolamentazioni e limiti, acqua potabile e dosi subletali;
- sistemi informativi sul web, newsletters (Harmful Algae News) e portale HAB (HAIS);
- gestione fascia costiera ed eutrofizzazione;
- HABs e cambiamento climatico globale.

Altre recenti attività relative alle microalghe bentoniche sono l'International Conference on Harmful Algae (Creta, novembre 2010), e l'International Conference on *Ostreopsis* Development (ICOD, Villefranche-sur-Mer, aprile 2011) e la mappatura di *Ostreopsis* cf. *ovata* e altre alghe tossiche in Mediterraneo nell'ambito di HAB-map, un progetto sviluppato dall'IOC-HAB e dall'International Society for the Study of Harmful Algae (ISSHA).



stazione zoologica anton dohrn

Iniziative internazionali scientifiche ed organizzative sulle alghe tossiche bentoniche

Adriana Zingone

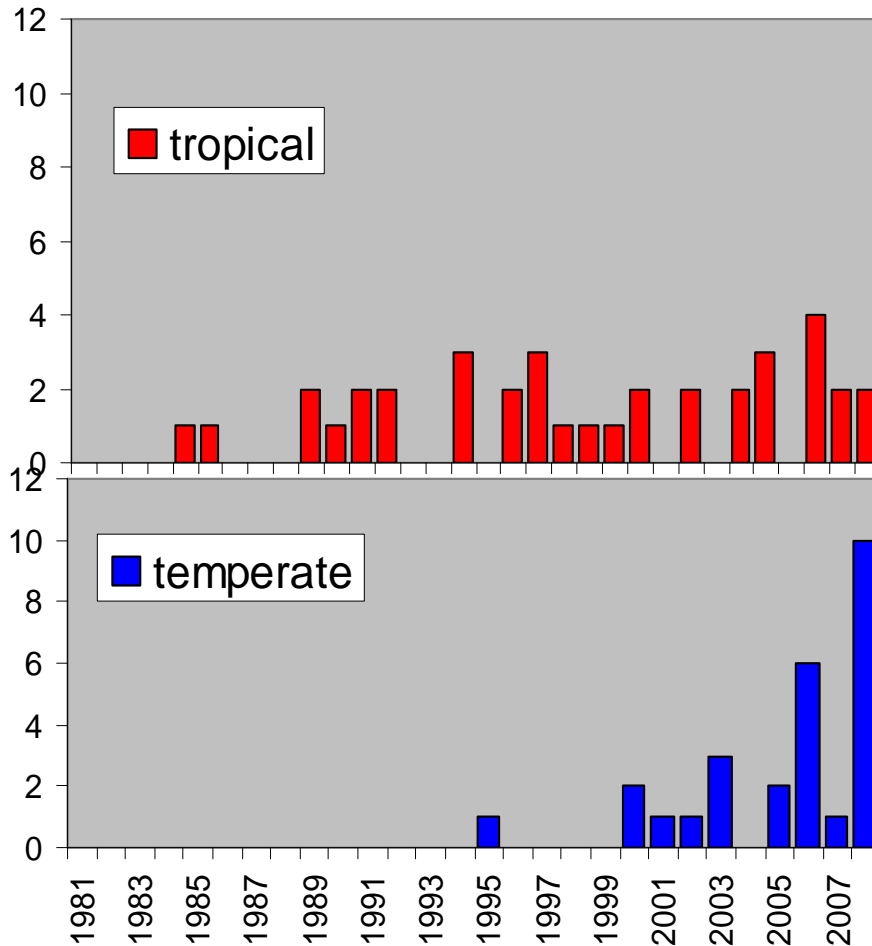
Stazione Zoologica Anton Dohrn di Napoli



ISPRA
Istituto Superiore per la Protezione
e la Ricerca Ambientale

Giornata di studio e confronto:
Fioriture algali di *Ostreopsis ovata* lungo le coste italiane
Roma, 23 Marzo 2011

L'attenzione della ricerca scientifica su Ostreopsis spp.



Il numero di pubblicazioni scientifiche su *Ostreopsis* nelle aree temperate è aumentato negli ultimi 10 anni

ISI data,
from Shears & Ross 2009



- GEOHAB- BHAB Core Research Programme on Benthic Harmful Algal Blooms- Honolulu 18-24 giugno 2010
- XIV International Conference on Harmful Algae, Hersonissos (Creta) 1-5 Novembre 2010
- ICOD, International Conference on *Ostreopsis* Development, Villefranche-sur-Mer, 6-8 Aprile 2011
- X IPHAB, Intergovernmental Panel on Harmful Algal Blooms, Parigi 12-14 aprile 2011

SCOR: Scientific Committee
on Ocean research

IOC: Intergovernmental
Oceanographic Committee



Global Ecology and Oceanography
of Harmful Algal Blooms

Promuovere le ricerche e la conoscenza delle fioriture algali nocive per poter migliorare la gestione del loro impatto sulle attività e la salute umana, con un approccio comparativo fra organismi e sistemi



Global Ecology and Oceanography
of Harmful Algal Blooms

Infrastruttura::

- Coordinamento
- Modeling
- Gestione Dati
- Formazione
- Remote Sensing

Programmi di ricerca (Core Research Programmes, CRP):

- Upwelling
- Sistemi eutrofizzati
- Sistemi stratificati
- Fiordi e baie
- HABs Bentoniche

La ciguatera



Gambierdiscus toxicus

Gambierdiscus spp.

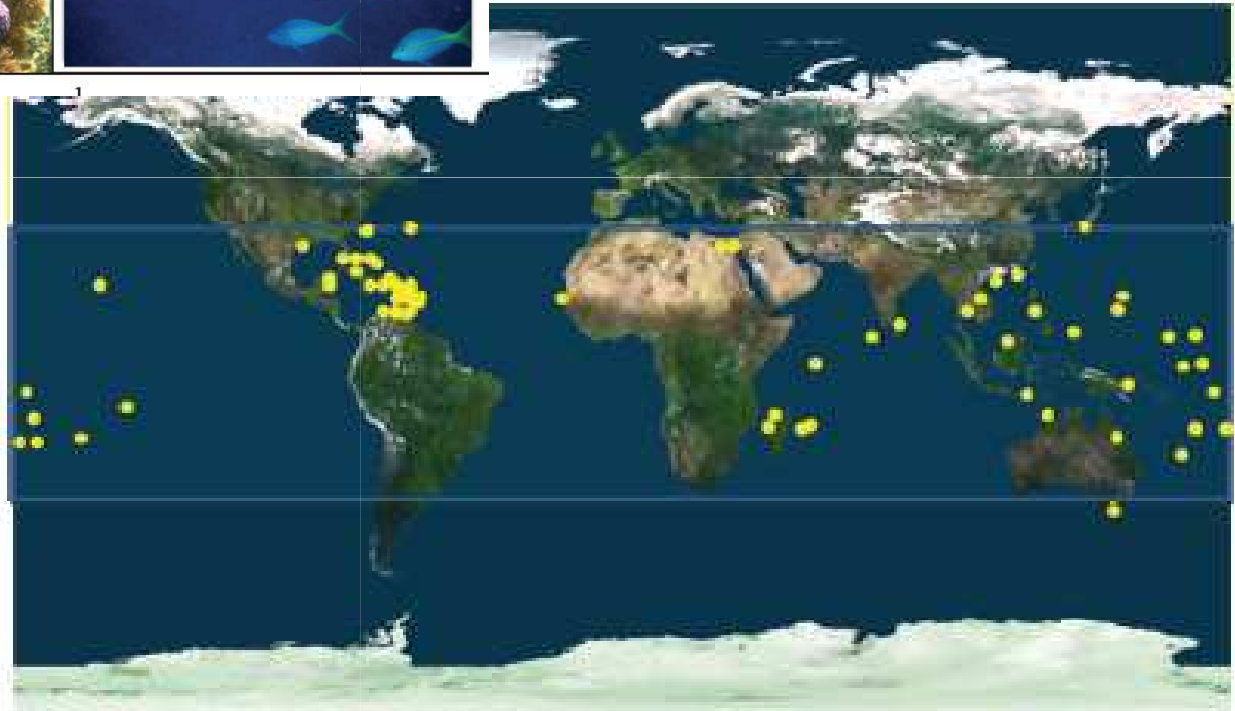
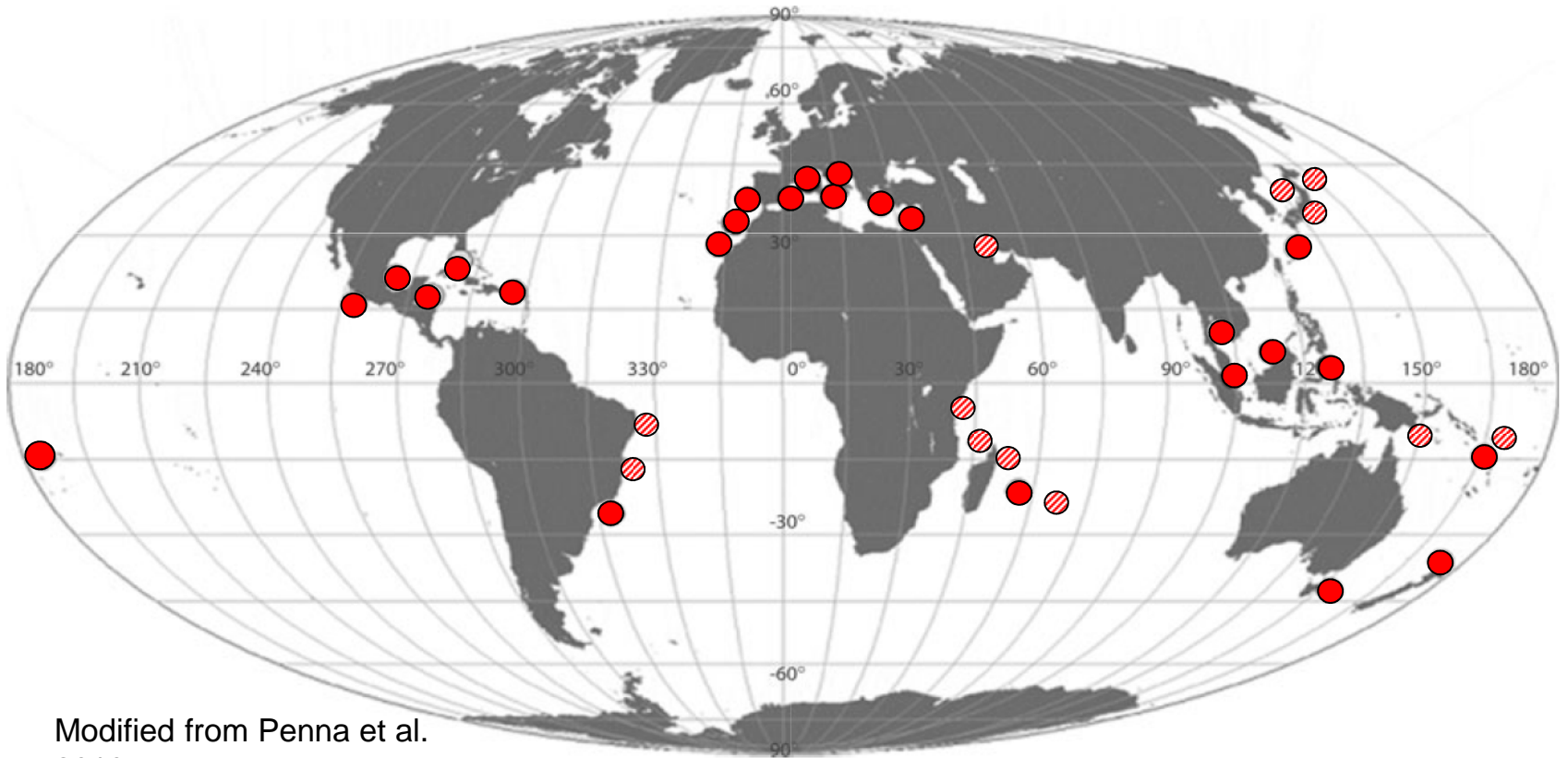


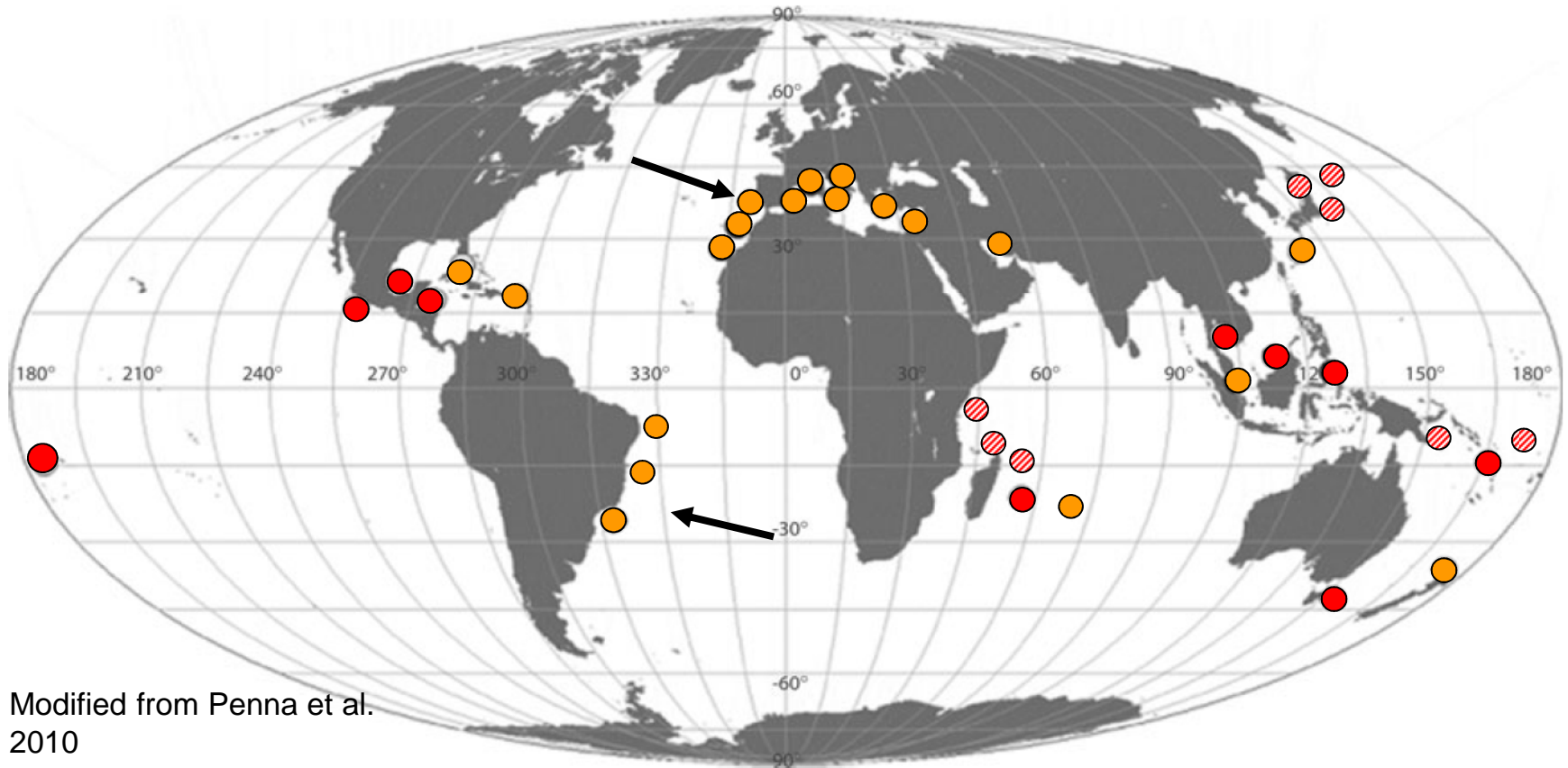
Figure 1. Global distribution of ciguatera fish poisoning (CFP) reports (after Tester et al. 2010). Maps of CFP frequently are used as surrogates for *Gambierdiscus* spp. distributions, when in fact, they should only be viewed as potential distribution maps for toxic *Gambierdiscus* species.

Distribuzione mondiale di *Ostreopsis* spp.



Modified from Penna et al.
2010

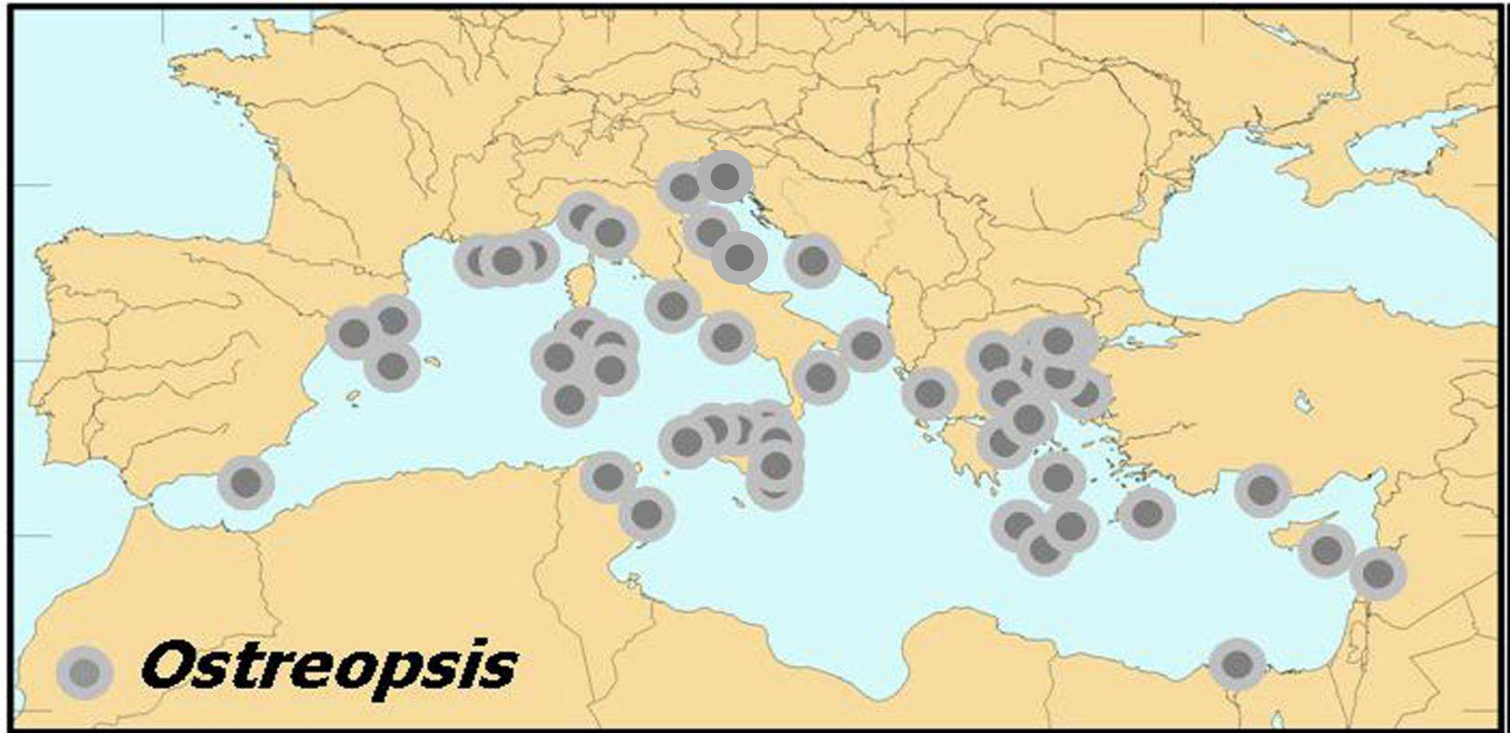
Ostreopsis cf. ovata
Ostreopsis spp.



Modified from Penna et al.
2010

10^5 - 10^6 cells g^{-1} FWM / 6.2×10^4 cells cm^{-2}

Ostreopsis cf. *ovata* in Mediterranean



HAB-map, a special project of



International Society for the
Study of Harmful Algae

ISSHA

GEOHAB- BHAB Core Research Programme on Benthic Harmful Algal Blooms Open Science Meeting, Honolulu 18-24 giugno 2010

- 60 partecipanti (5 italiani)



Le microalghe marine bentoniche tossiche

- 1) *Gambierdiscus*
- 2) *Ostreopsis*
- 3) *Prorocentrum*
- 4) *Coolia* (ad oggi non ha creato problemi)
- 5) *Amphidinium carterae*
- 6) *Amphora, Nitzschia*
- 7) Cyanobacteria

Le domande

- **Quante specie** sono effettivamente coinvolte?
- Qual è la loro reale **distribuzione geografica**?
- Quali sono le loro **caratteristiche biologiche ed ecologiche**?
- Quali sono **i tipi di ambienti** dove queste microalghe bentoniche fioriscono?
- Quali sono **i cicli interannuali a lungo termine** di questi organismi?
- Come si fa a prevedere **i rischi** che questi organismi comportano, in particolare **per la salute umana**?
- Quali **metodologie** sono più adeguate per il loro studio?

GEOHAB- BHAB Core Research Programme on Benthic Harmful Algal Blooms Open Science Meeting, Honolulu 18-24 giugno 2010

Harmful Algal Blooms in Benthic Systems



GEOHAB
Global Ecology and Oceanography of
Harmful Algal Blooms



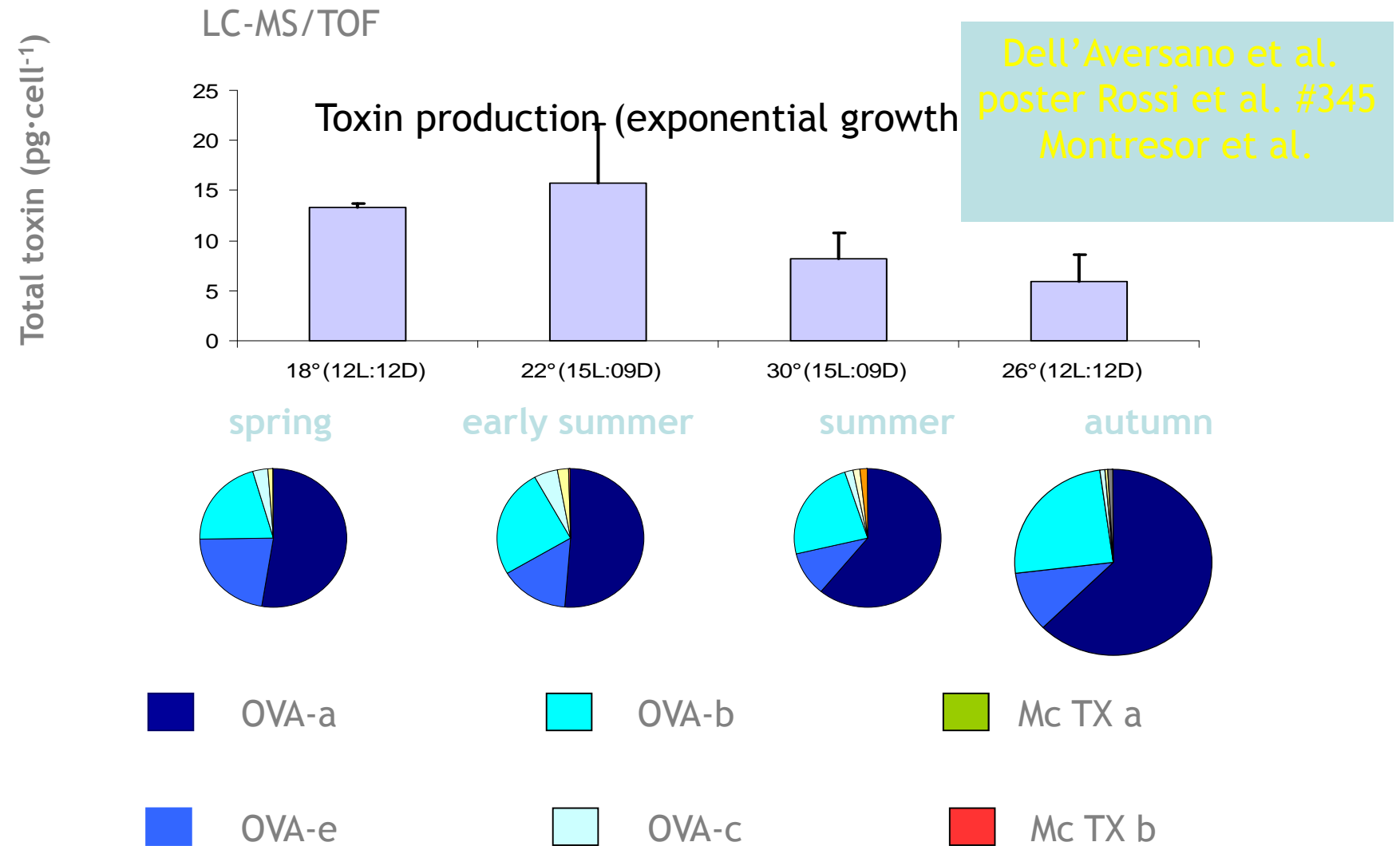
- Una pubblicazione-guida sullo stato dell'arte, le tematiche di ricerca e le infrastrutture da sviluppare nel campo delle BHABs

- Un workshop sulle metodologie di campionamento

XIV International Conference on Harmful Algae, Hersonissos (Creta) 1-5 Novembre 2010

- 9 comunicazioni orali (7 italiane)
- Ca 15 poster
- Una nuova specie di *Ostreopsis* in Mediterraneo (oltre alle due note)
- *Gambierdiscus* sp. in Mediterraneo
- Molte altre tossine oltre all'ovatossina

XIV International Conference on Harmful Algae, Hersonissos (Creta) 1-5 Novembre 2010



ICOD, International Conference on *Ostreopsis* Development,
Villefranche-sur-Mer, 6-8 Aprile 2011

- 1° giorno: Ecologia, biogeografia e impatti sui sistemi costieri
- 2° giorno: Metaboliti Secondari e tossicità di *Ostreopsis*
- 3° giorno: Ambiente, salute e gestione economica: stato dell'arte e prospettive
- 40 presentazioni orali e 22 poster

X IOC-IPHAB, Intergovernmental Panel on Harmful Algal Blooms, Parigi 12-14 aprile 2011



INTERGOVERNMENTAL OCEANOGRAPHIC COMMISSION
COMMISSION OCÉANOGRAPHIQUE INTERGOUVERNEMENTALE
COMISIÓN OCEANOGRÁFICA INTERGUBERNAMENTAL
МЕЖПРАВИТЕЛЬСТВЕННАЯ ОКЕАНОГРАФИЧЕСКАЯ КОМИССИЯ
اللجنة الدولية الحكومية لعلوم المحيطات
政府间海洋学委员会

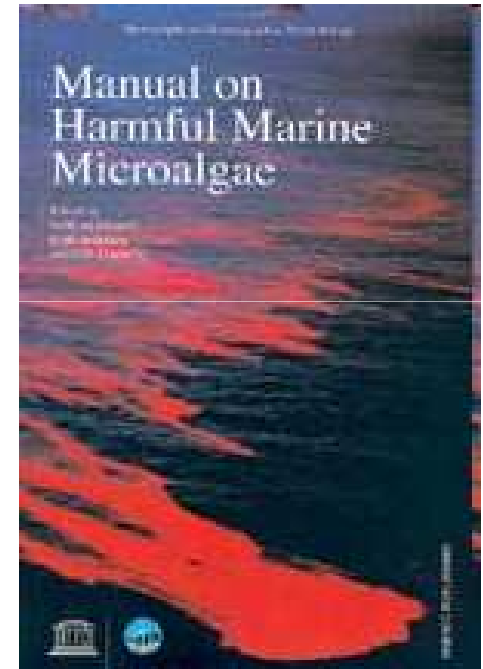
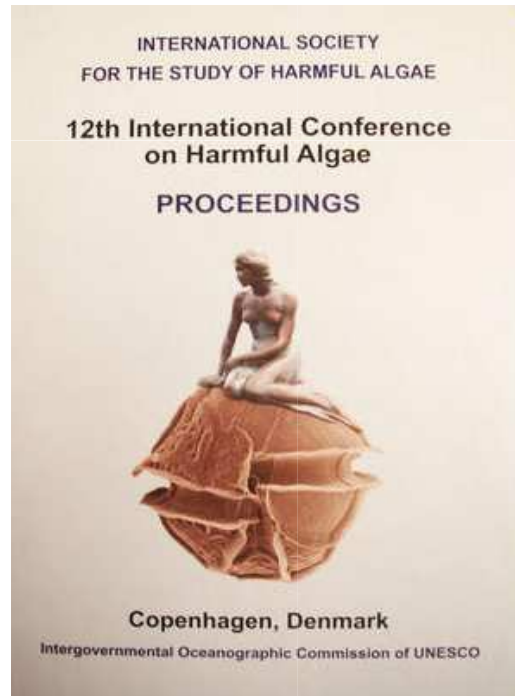
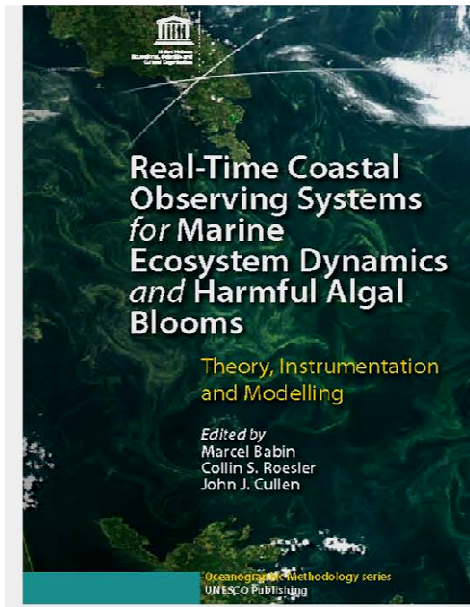
IOC HAB –Programme: <http://ioc-unesco.org/hab/>

-migliorare le capacità di gestione e scientifiche sulle alghe tossiche **in un contesto globale** .

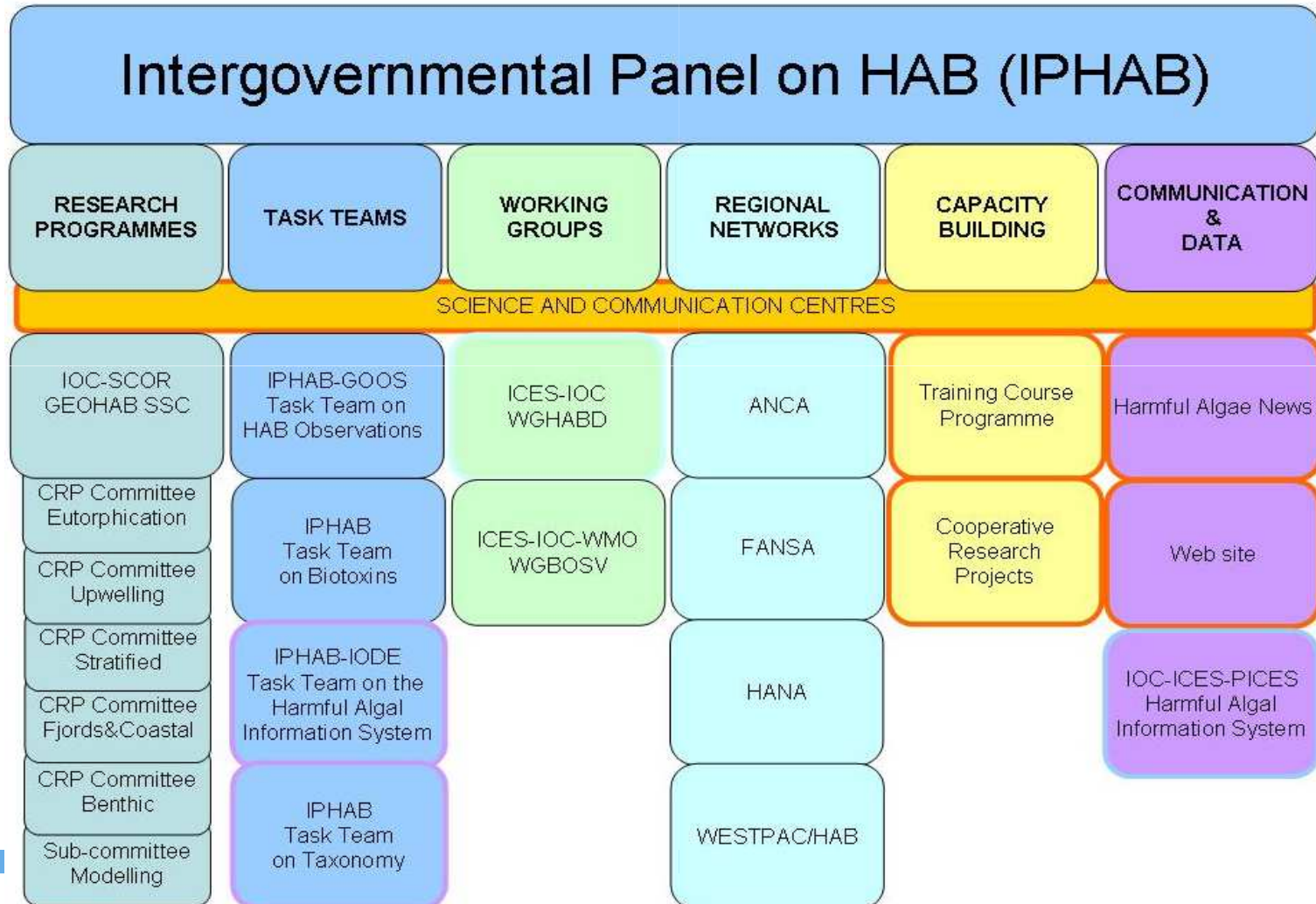
-Identificare risorse che permettano alla comunità internazionale di continuare nelle iniziative necessarie a sostenere la **formazione, la ricerca** e la diffusione di **informazioni**

X IOC-IPHAB, Intergovernmental Panel on Harmful Algal Blooms, Parigi 12-14 aprile 2011

The Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO



X IOC-IPHAB, Intergovernmental Panel on Harmful Algal Blooms, Parigi 12-14 aprile 2011



X IOC-IPHAB, Intergovernmental Panel on Harmful Algal Blooms, Parigi 12-14 aprile 2011



INTERGOVERNMENTAL OCEANOGRAPHIC COMMISSION
COMMISSION OCÉANOGRAPHIQUE INTERGOUVERNEMENTALE
COMISIÓN OCEANOGRÁFICA INTERGUBERNAMENTAL
МЕЖПРАВИТЕЛЬСТВЕННАЯ ОКЕАНОГРАФИЧЕСКАЯ КОМИССИЯ
اللجنة الدولية الحكومية لعلوم المحيطات
政府间海洋学委员会

- **gruppi di lavoro regionali** (Sud –America, Pacifico Occidentale, nord Africa, Caraibi)
- **formazione**
- **Ricerca scientifica (GEOHAB)**
- **HAB e salute umana**, regolamentazioni e limiti, acqua potabile e dosi subletali
- **Sistemi informativi** sul web, portale HAB (HAIS)
- **Gestione fascia costiera ed eutrofizzazione**
- **HABs e cambiamento climatico globale**

MONITORAGGIO DI *O. OVATA* NELL'AEROSOL MARINO LUNGO LE COSTE TOSCANE. PRIMI DATI MOLECOLARI DI IDENTIFICAZIONE DI *OSTREOPSIS* SPP.

di Gioia Benedettini¹ e Antonella Penna²

¹ARPA Toscana, ²Università degli Studi di Urbino "Carlo Bo"

INTRODUZIONE

Relativamente alle problematiche, sia di tipo ambientale che sanitario, legate alla presenza di fioriture di microalghe potenzialmente tossiche nelle acque costiere (e di balneazione) italiane, è stata ravvisata l'opportunità di indagare gli aspetti inerenti lo sviluppo di aerosol marino ed i possibili effetti di tossicità legati a questo. Infatti, per quanto l'aerosol sia indicato come il principale veicolo di compromissione della salute pubblica anche nelle zone immediatamente circostanti le acque di balneazione, a tutt'oggi resta da dimostrare in modo inequivocabile la presenza della tossicità e/o delle cellule (intere o in frammenti) di *O. ovata*.

Nel 2009 ARPAT, avvalendosi della collaborazione di alcuni Centri di Eccellenza, ha potuto elaborare uno "Studio Sperimentale sulla Presenza di Biotossine Algali nell'Aerosol Marino" con l'intento di trovare elementi certi su cui, eventualmente, avviare una metodologia scientificamente valida e condivisa a livello nazionale, che le diverse Agenzie possano utilizzare nelle attività di controllo e tutela della salute e dell'ambiente (Studio sulla presenza di biotossine algali nell'aerosol marino nell'ambito del programma di ricerca di ISPRA-MATTM "*Ostreopsis ovata* ed *Ostreopsis* spp.: nuovi rischi di tossicità microalgale nei mari italiani").

Sulla base dei risultati incoraggianti ottenuti da questo studio le indagini sono proseguite anche nel 2010.

Tra i campionatori utilizzati nel 2009 AIR CUBE COM2 era risultato molto sensibile, infatti, la quasi totalità delle aliquote di campioni prelevati era risultata positiva sia per la presenza di *O. ovata* e *O. siamensis* sulla base delle analisi molecolari. La presenza di *Ostreopsis* non era stata correlata né con l'intensità del vento, né con il tipo di filtro (quarzo o vetro).

Negativi, invece, i campioni prelevati con SAS PCR sia per quanto riguarda le analisi chimiche effettuate dal Centro Ricerche Marine di Cesenatico e dall'Università di Napoli che per quelle ecotossicologiche effettuate da ARPAT.

La sperimentazione nel 2010 è proseguita sia con AIR CUBE COM2 che con SAS PCR; il campionamento è stato effettuato nel periodo che è stato dimostrato essere critico, mentre le ore di campionamento sono state ridotte alla fascia oraria che è risultata quella più favorevole per rilevare la positività. Inoltre, per aumentare l'efficienza di cattura è stata aumentata la velocità di campionamento da 10 l/min a 30 l/min del campionatore SAS PCR.

Lo scopo di questa indagine è stato quello di confermare la presenza di *Ostreopsis* sp. con analisi molecolari di real time PCR, e di evidenziare la presenza di tossicità nell'aerosol marino in un tratto di costa soggetto a fioriture di *O. ovata*, quale è quello del litorale apuano e pisano, in un periodo critico dal 4 al 12 agosto 2010.

Ulteriore obiettivo è stato quello di sviluppare metodiche e analisi molecolari di tipo quantitativo in real time PCR su campioni prelevati con AIR CUBE COM2 con l'intento di correlare i risultati molecolari con la concentrazione di *Ostreopsis* sp. su macrofite, nella colonna d'acqua, e con l'eventuale presenza di tossine in campioni di aerosol prelevati con lo strumento SAS PCR.

ZONE AD INTENSA CRITICITÀ (HOT SPOT)

Anche per l'attuazione di questa sperimentazione è stato scelto il litorale apuano (Comune di Massa) che a partire dal 1998 ha evidenziato ripetuti episodi di malesseri nella popolazione balneare durante i mesi estivi (luglio-agosto) e che ogni anno è comunque interessato da fioriture di *O. ovata* (Sansoni et al., 2003; Rustighi & Casotti, 2004). Inoltre, è stata aggiunta una stazione situata lungo il litorale pisano.

In queste acque ARPAT nel 2008 e 2009 ha attuato un progetto sperimentale, finanziato dalla Regione Toscana, per effettuare la sorveglianza delle fioriture microalgali (ARPAT, 2008; ARPAT, 2009), mentre dal 2010, con l'entrata in vigore del decreto 30 marzo 2010, attuativo del D.Lgs 116/2008, il monitoraggio in aree a rischio di *O. ovata* è diventato obbligatorio (art.3) e routinario.

I punti di campionamento lungo il litorale apuano e pisano sono stati quelli che negli anni passati hanno mostrato le maggiori criticità: tali zone, soggette a fenomeni erosivi, sono caratterizzate da scogliere parallele e perpendicolari alla costa, che determinano una compartimentazione in specchi d'acqua con un debole ricambio idrico.

Inoltre, a Marina di Pisa oltre alle barriere è stata costruita una spiaggia di ghiaia e ciottoli che prosegue anche nel fondale e che nel tempo è diventata substrato colonizzato da *O. ovata*.

La presenza di tossicità nell'aerosol marino è stata valutata anche con un test ecotossicologico. La scelta del saggio si basa sui risultati di studi precedenti, condotti nel laboratorio di ecotossicologia del Centro Regionale di Riferimento delle Attività Biologiche del dipartimento ARPAT di Pisa, che avevano dimostrato la sensibilità del rotifero *Brachionus plicatilis* (al contrario di *V. fischeri*), ad uno standard di palitossina (WAKO Chemicals GmbH). Infatti, saggi di tossicità effettuati con il rotifero hanno evidenziato una mortalità del 50% degli organismi testati con concentrazioni molto basse di palitossina (EC50_{24h} 3.8 x 10⁻⁵ mg/mL e EC50_{48h} di 2.6 x 10⁻⁵ mg/mL) ed assenza di tossicità con batteri marini (Fontanelli, 2009).

Le stesse indagini hanno evidenziato la capacità di *O. ovata* di produrre tossina in colture di laboratorio e l'effetto tossico di queste colture su *B. plicatilis*.

MATERIALI E METODI

1. Area indagata e stazioni di campionamento

Litorale apuano. L'area scelta per l'indagine del litorale apuano è situata tra le stazioni "storiche" di monitoraggio OST-MS2 e OST-MS3 di seguito descritte.

Prov	Dip	Comune	Località	Cod_pto	Nome punto
MS	MS	Massa	Marina di Massa	OST-MS2	Tratto di mare a sinistra Bagno Maurizio
MS	MS	Massa	Marina di Massa	OST-MS3	Tratto di mare a sinistra Bagno Sayonara



Figura 2: OST-PI 2 Punto di campionamento di Ostreopsis e di bioaerosol



Figura 3: Stazione OST-PI 2 particolare della spiaggia artificiale di ghiaia e ciottoli

2. Periodo di campionamento

Il periodo di campionamento si è svolto dal 4 al 12 agosto 2010. Durante questo periodo sono stati attivati un campionatore SAS PCR ed un campionatore AIR CUBE COM 2, le cui date e tempi di campionamento sono riportati rispettivamente nel paragrafo 3.1 e nelle Tabelle 3 e 4.

3. Campionatori utilizzati

3.1. Il campionatore SAS PCR

Per raccogliere campioni liquidi di aerosol marino, su cui effettuare le necessarie analisi per determinare presenza e concentrazione di palitossina e/o ovatossina, si è utilizzato SAS PCR della ditta PBI (Fig. 4).

SAS PCR è un campionatore portatile (alimentato a batteria) di bioaerosol, con sistema di cattura in fluido (nella nostra indagine è stata utilizzata acqua di mare sintetica) mediante impatto ricircolante (Tunnel del vento a bassa velocità "LSWT"): l'aria aspirata dallo strumento (il tempo di aspirazione è programmabile in funzione dei litri di aria che si intende prelevare) ed il fluido di raccolta confluiscono congiuntamente attraverso un condotto a spirale e sono convogliati in un recipiente di raccolta, dove il liquido è mantenuto in costante ricircolazione per prolungare e favorire il contatto liquido/bioaerosol. Il "set" di campionamento (costituito dal recipiente di raccolta, spirale di cattura, testata di campionamento e fluido) è sterile ed è a "circuito chiuso".

Per avere la massima possibilità di cattura, si è posizionato il campionatore liquido direttamente sulla battigia della spiaggia libera presso il pontile di Marina di Massa, a Nord-Ovest della stazione OST-MS3, orientato verso il mare in modo che non vi fossero ostacoli alla circolazione dell'aria. Il campionatore è stato, inoltre, posizionato sulla spiaggia di ciottoli del litorale pisano corrispondente alla stazione OST-PI 2 con lo stesso orientamento.

L'apparecchio è stato programmato per aspirare 30 litri d'aria al minuto, aumentando, in questa indagine, rispetto al 2009, la velocità di aspirazione .

I campionamenti sono stati effettuati in queste date e tempi:

Litorale apuano

04 agosto 2010 campionamento unico dalle ore 11:30 alle ore 14:35

06 agosto 2010 campionamento unico dalle ore 11:30 alle ore 14:30

Litorale pisano

09 agosto 2010 campionamento unico dalle ore 11:45 alle ore 14:45

10 agosto 2010 campionamento unico dalle ore 11:00 alle ore 14:00

11 agosto 2010 campionamento unico dalle ore 11:30 alle ore 14:30

12 agosto 2010 campionamento unico dalle ore 11:00 alle ore 14:00



Figura 4: Campionatore liquido per bioaerosol SAS PCR (Ditta PBI).

3.1.1.SAS PCR analisi chimiche

I campioni ottenuti sono stati congelati ed inviati al Dipartimento di Chimica delle Sostanze Naturali dell'Università "Federico II" di Napoli, per la ricerca delle tossine algali

3.1.2. SAS PCR Metodologia Saggio di tossicità con *Brachionus plicatilis*

Il saggio si basa sulla valutazione della mortalità del rotifero *B. plicatilis* (Halbach et al., 1983) in presenza di fonti di stress, rispetto ad un controllo. Il saggio è stato condotto secondo il protocollo sperimentale (Snell, Persoone, 1989) fornito da Microbiotests Inc. produttrice del Rotokit test.

Prima di condurre il saggio è stata preparata l'acqua di mare standard (salinità finale di 35ppm) aggiungendo ad 800 mL di acqua deionizzata fiale contenenti soluzioni di sali concentrati (NaCl, KCl, CaCl₂, MgCl₂, MgSO₄, NaHCO₃, H₃BO₃) fornite nel Kit. Lo standard di acqua di mare è stato portato al volume finale di un litro aggiungendo altra acqua deionizzata e conservato al buio in cella frigorifera a +4°C±2°C, fino al momento dell'utilizzo sia come diluente del campione da analizzare che, opportunamente diluito, come terreno per la schiusa delle cisti.

La schiusa delle cisti di *B. plicatilis* è stata allestita 28-30 ore prima dell'inizio del test utilizzando acqua di mare a salinità ridotta (25 ppm) preparata mescolando 5,7 mL di acqua di mare standard con 4,3 mL di acqua deionizzata. Il contenuto di una fiala di cisti di *B. plicatilis* è stato svuotato nel pozzetto di schiusa della piastra multipozzetto dove è stato effettuato il test. Tale operazione è stata eseguita avendo cura di risciacquare la fiala per raccogliere le eventuali cisti rimaste all'interno e verificando che la maggior parte delle cisti fosse sommersa dopo aggiunta di 2 mL di acqua di marea a salinità ridotta. La piastra è stata coperta con parafilm ed è stata incubata a 25°C±1°C per 28 ore con illuminazione continua (fonte luminosa di 3000-4000 Lux). Il test è basato su un controllo e su 5 diluizioni del campione, ognuna con 6 repliche di 5 organismi ed è considerato valido se la mortalità del controllo non supera il 10%.

Il saggio è stato effettuato in una speciale piastra multipozzetto in PVC che contiene, come descritto precedentemente, oltre un pozzetto di schiusa, 6 pozzetti di risciacquo e 36 pozzetti test, ordinati orizzontalmente in colonne da A ad F e in righe da X (controllo) e da 1 a 5 (per le varie diluizioni). La distribuzione delle soluzioni test è stata effettuata a partire dal controllo negativo (riga X, in alto) fino alla concentrazione più alta (riga 5, in basso). Sono stati aggiunti 0,7 mL di acqua standard nel pozzetto di risciacquo e 0,3 mL nei pozzetti test per il controllo negativo, le stesse quantità delle varie diluizioni nei rispettivi pozzetti numerati. Con l'aiuto di uno stereomicroscopio sono stati trasferiti circa 50 rotiferi dal pozzetto di schiusa a quello di risciacquo del controllo e ripetendo l'operazione nelle file dalla 1 alla 5. Dopo circa un'ora, per permettere ai rotiferi di adattarsi al cambiamento di salinità, sono stati trasferiti in sequenza, 5 rotiferi dal pozzetto di risciacquo in ognuno dei 6 pozzetti test, ripetendo l'operazione per le file dalla 1 alla 5. La piastra è stata, quindi, nuovamente coperta con il Parafilm e con il coperchio in plastica ed incubata a 25°C±1°C al buio.

Dopo 24 ore è stato effettuato il conteggio dei rotiferi morti in ogni pozzetto (considerando come morti gli organismi immobili in 5 secondi di osservazione). È stata, quindi, calcolata la percentuale di mortalità.

3.2. Campionatore portatile AirCube COM2

Il campionamento del bioaerosol per la ricerca di *Ostreopsis ovata* mediante tecniche di biologia molecolare, è stato effettuato mediante il campionatore portatile AirCube COM2 della Analytica Instrument (Fig. 5). Lo strumento è stato posizionato sulla battigia della spiaggia libera presso il pontile di Marina di Massa, a Nord-Ovest della

stazione OST-MS3, orientato verso il mare e sulla spiaggia di ciottoli del litorale pisano corrispondente alla stazione OST-PI 2 con lo stesso orientamento.

Il campionatore ha le seguenti caratteristiche: Campo regolazione del flusso 0,2-30 litri minuto in un unico range dinamico senza ausilio di adattatori o orifizi. Flusso massimo di impiego 30 lit/minuto. Massima compensazione raggiungibile: 2200 mm/H₂O. Compensazione a controllo elettronico delle perdite di carico. Pompa aspirante membrana singola testa. Attenuatore di pulsazioni con controllo di pressione incorporato. Regolazione automatica del flusso di aspirazione con valvola proporzionale motorizzata. Controllo del flusso con dispositivo Mass Flow Meter e lettura istantanea ed integrata. Impostazione del campionamento per tempi e volumi direttamente dalla tastiera. Impostazione del flusso di campionamento da tastiera. Rilevazione istantanea e calcolo della media per: Temperatura al contatore, Temperatura ambiente, Pressione barometrica atmosferica, Flusso di aspirazione, Velocità e direzione del vento. Visualizzazione grafica dell'andamento del campionamento con calcolo della deviazione standard. Possibilità di controllo remoto mediante scheda GSM/GPRS.

L'orifizio di aspirazione è stato collegato ad un tubo al silicone lungo 15 cm alla cui estremità è stato inserito un apposito porta filtri. Sono stati utilizzati filtri in fibra di vetro Whatman GF/D 47 mm Cat.No 1823 047



Figura5: Campionatore portatile AirCube COM2.

L'apparecchio è stato programmato per aspirare 10 litri d'aria al minuto che corrisponde approssimativamente alla capacità respiratoria umana.

3.2.1 AIR CUBE COM 2 e analisi molecolari

Dai campionamenti effettuati con AirCube COM2, si sono ottenuti dei filtri che sono stati immessi in etanolo e conservati a 4°C.

I campioni raccolti sono stati analizzati presso la Sezione di Biologia Ambientale del Dipartimento di Scienze Biomolecolari dell'Università degli Studi di Urbino "Carlo Bo". Per l'identificazione molecolare di *Ostreopsis ovata* e *Ostreopsis siamensis* sono stati utilizzati protocolli precedentemente ottimizzati per l'analisi dei campioni attraverso saggi molecolari di PCR (Penna *et al.*, 2007; Battocchi *et al.*, 2010). In particolare, sui campioni è stato svolto anche un saggio real-time PCR (qrt-PCR) per la quantificazione del DNA presente nel bioaerosol riconducibile al numero di cellule (Perini *et al.*, 2011).

4. Dati meteo climatici

Per il litorale apuano sono stati acquisiti i dati meteo-climatici rilevati da una centralina posizionata a Marina di Massa, mentre per il litorale pisano è stata utilizzata una centralina (Davis Instruments) del Dipartimento di Pisa posizionata in prossimità dei campionatori. Quindi, i dati meteo-climatici del litorale apuano sono riferiti alle 24 ore del giorno di prelievo, mentre quelli del litorale pisano sono riferiti a ciascun periodo di campionamento.

RISULTATI

1. Campionatori SAS PCR E AIR CUBE COM 2

1.1 SAS PCR Analisi Ecotossicologiche

I campioni prelevati con il campionatore SAS PCR (PBI) sono stati sottoposti sia ad analisi ecotossicologiche con *B. plicatilis*, gli stessi campioni sono stati al Dipartimento di Chimica delle Sostanze Naturali dell'Università "Federico II" di Napoli. I risultati del saggio di tossicità con *B. plicatilis* sono riportati nella Tab.1. La tossicità è risultata assente in tutti i campioni analizzati.

Tabella 1: Campionamento eseguito tramite l'apparecchio PCR SAS con gorgogliamento in acqua di mare sintetica. Risultati del test con rotifero *Brachionus plicatilis*

Data di campionamento	Orario di campionamento	Durata del campionamento	Mortalità
04 agosto 2010	11:30 -14:35	3	0%
06 agosto 2010	11:30 -14:30	3	0%
09 agosto 2010	11:45 -14:45	3	0%
10 agosto 2010	11:00 -14:00	3	0%
11 agosto 2010	11:30 -14:30	3	0%
12 agosto 2010	11:00 -14:00	3	0%

2.3 AIR CUBE COM 2 analisi biomolecolari

Il campionamento del bioaerosol per la ricerca di *Ostreopsis ovata* mediante tecniche di biologia molecolare, è stato effettuato mediante il campionatore portatile AirCube COM2 della ditta Analitica Instrument. L'apparecchio è stato programmato per aspirare 10 litri d'aria al minuto che corrisponde approssimativamente alla capacità respiratoria umana. L'aria aspirata ha impattato in filtri in lana di vetro Whatman GF/D 47 mm Cat. No 1823 047 che sono stati immessi in etanolo e conservati a +4°C.

Una parte dei campioni raccolti durante il campionamento estivo del 2010 sono stati analizzati secondo gli stessi protocolli utilizzati nel 2009. In questi campioni di bioaerosol, prelevati alla stazione di Marina di Massa e Marina di Pisa, attraverso analisi molecolari di PCR, è stata evidenziata la presenza di DNA di *O. ovata* e *O. siamensis*.

Gli stessi campioni raccolti durante il periodo estivo del 2010 sono stati sottoposti ad un nuovo e più innovativo metodo di PCR quantitativa (qrt-PCR). I risultati ottenuti (Tab. 2) sono preliminari in quanto la metodologia molecolare di PCR per la

quantificazione specie-specifica di *Ostreopsis* spp. è in fase di ottimizzazione presso il laboratorio della Sez. Biologia Ambientale, Dip. Scienze Biomolecolari, Università di Urbino.

Per ottenere il numero di cellule presenti all'interno del campione di aerosol, i risultati ottenuti tramite il saggio di qrt-PCR (in termini di Ct) sono stati comparati con una curva standard ambientale ottenuta durante lo studio della fioritura che ha interessato la Riviera del Conero durante l'estate 2009. Questa curva è in grado di quantificare le cellule presenti in un campione ambientale all'interno di un range di 5 ordini di grandezza (da 8 a $8 \cdot 10^4$ cellule) con un'efficienza del 98% ed una riproducibilità di 3.3 (CV_α%) (Perini *et al.*, 2011).

Tabella 2.: Campionamento eseguito tramite l'apparecchio AIR CUBE COM 2 e analisi molecolari di qrt-PCR sui campioni di bioaerosol.

Stazione	Data di campionam.	Ore	Tipo Filtro	Quantificazione <i>O. ovata</i>	Quantificazione <i>O. siamensis</i>
Pisa	11/08/2010	11:00 - 12:30	Glass microfibre filter Whatman GF/D 47 mm	< 5 cellule	in corso
Massa	06/08/2010	13:00 - 14:30	Glass microfibre filter Whatman GF/D 47 mm	< 5 cellule	in corso
Massa	04/08/2010	11:30 - 13:00	Glass microfibre filter Whatman GF/D 47 mm	< 5 cellule	in corso
Massa	03/08/2010	13:30 - 15:00.	Glass microfibre filter Whatman GF/D47 mm	< 5 cellule	in corso

3. Dati meteo-climatici

I risultati sono riportati di seguito nelle Tabelle 3 e 4 .

Tabella 3: Dati meteo-climatici del litorale apuano

Data	Periodo di campionamento	T (°C) Media*	T (°C) Massima*	T (°C) Minima*	Vento velocità Media* (Km/h)	Vento velocità Massima* Km/h	Vento direzione (direzione dominante)*
02.08.10	11:40-13:10	23,6	27,7	18,9	3,1	16,1	WNW
	13:15-14:45						
03.08.10	11:45-13:30	24,1	27,9	19,7	2,4	12,9	NE
	13:32-15:00						
04.08.10	11:30-13:00	23,9	27,5	19,8	2,7	12,9	WNW
	13:05-14:35						
06.08.10	11:30-13:00	22,9	27,6	19,5	5,1	24,1	NW
	13:02-14:30						

Sono riportati i dati meteo climatici rilevati da una centralina posizionata a Marina di Massa

* I dati sono riferiti alle 24 ore del giorno indicato

Tabella 4: Dati meteo-climatici del litorale pisano

Data	Periodo di campionamento	T (°C) Media*	T (°C) Massima*	T (°C) Minima*	Vento velocità Media* (m/sec)	Vento velocità Massima* (m/sec)	Vento direzione (direzione dominante)*
09.08.10	11:45-13:15	24,5	25,8	24,0	1,9	2,7	NNW
	13:15-14:45	24,8	27,2	24,4	2,0	2,7	N
10.08.10	11:00-12:30	NR	NR	NR	NR	NR	NR
	12:30-14:00	NR	NR	NR	NR	NR	NR
11.08.10	11:30-13:00	24,9	25,1	24,7	1,7	2,2	NNE
	13:00-14:30	26,8	30,1	25,1	1,6	2,7	NN
12.08.10	11:00-12:30	26,2	26,7	25,7	0,3	0,9	ENE
	12:30-14:00	26,0	26,4	25,6	1,6	2,2	E

La centralina per la rilevazione dei parametri meteo-climatici è stata posizionata vicino ai campionatori di aerosol.

* I dati meteo-climatici sono riferiti a ciascun periodo di campionamento. NR=non rilevato

CONCLUSIONI

Il disegno sperimentale e la sintesi dei risultati sono rappresentati nel diagramma a blocchi riportato nella Fig. 6 e Fig. 7, mentre nella Fig. 1 sono rappresentati i punti di monitoraggio storici di *O. ovata* nella colonna d'acqua e sulle macroalghe lungo il litorale apuano situati in prossimità delle stazioni di campionamento del bioaerosol e nella Fig. 2. è rappresentato il punto di campionamento lungo il litorale pisano.

Come si può osservare dai risultati della Tab. 5, estratta dalla relazione annuale sul monitoraggio di *O. ovata* lungo le coste toscane, durante la stagione 2010 la concentrazione di *Ostreopsis ovata* è risultata, nel periodo di campionamento dell'aerosol nell'area indagata superiore al limite di 10.000 cells/L, valore indicato dalle Linee Guida del Ministero della Salute (Ministero della Salute, 2007).

Questi risultati hanno confermato che lo studio della presenza di biotossine algali nell'aerosol marino si è svolto in un periodo di tempo e in una zona ad intensa criticità.

I risultati di questa indagine confermano che il campionamento con AIR CUBE COM è idoneo per il campionamento di aerosol marino.

Attraverso le metodiche molecolari di PCR è stato possibile sia una determinazione qualitativa (presenza/assenza) di *Ostreopsis* spp. e, per la prima volta, un'analisi quantitativa determinando il numero di cellule di *Ostreopsis* spp. presenti nel campione di aerosol. Le caratteristiche fondamentali del metodo sono estrema specificità, sensibilità e rapidità delle analisi; peculiarità essenziali per questo tipologia di campione e di risposta in tempi brevi riguardo la potenziale tossicità dell'aerosol in presenza di fioriture di *Ostreopsis* spp. sul litorale toscano

La positività dei risultati ottenuti con AIR CUBE è molto importante perché testimonia che durante il periodo critico, quando nella colonna d'acqua sono presenti concentrazioni algali superiori al limite previsto dalle linee guida ministeriali (10000 cell/l), la presenza dell'alga può essere rivenuta nell'aerosol marino tramite analisi molecolari. Questi risultati avvalorano la tesi che anche prodotti tossici elaborati dall'alga possano essere veicolati dall'aerosol marino. Questa ipotesi potrà essere confermata dai risultati chimici.

I risultati delle analisi ecotossicologiche effettuate sui campioni prelevati con SAS PCR hanno dato esito negativo. Segni di sofferenza a carico delle principali biocenosi marine sono stati riscontrati durante il periodo di fioritura in entrambe le aree, tuttavia, dal punto di vista sanitario non sono stati segnalati casi di malessere tra i bagnanti.

Tabella 5: Litorale apuano e pisano -Ostreopsis ovata risultati monitoraggio 2010

Punto di campionamento	Data	<i>Ostreopsis ovata</i>	
		ACQUA (cell/L)	MACROALGHE (cell /g)
OST-MS1	29.07.10	-	14.723
OST-MS1	30.07.10	285.600	-
OST-MS1	09.08.10	113.200	1.726
OST-MS1	29.08.10	<40	-
OST-MS2	29.07.10	-	351
OST-MS2	30.07.10	80	-
OST-MS2	09.08.10	148.320	20.614
OST-MS2	29.08.10	240	-
OST-MS3	29.07.10	-	95
OST-MS3	30.07.10	3.360	-
OST-MS3	09.08.10	28.560	2.878
OST-MS3	29.08.10	<40	-
OST-PI 2	20.07.10	185.095	545.422
OST-PI 2	09.08.10	13.698	11.333
OST-PI 2	12.08.10	11.388	29.355

Prospettive future

I risultati hanno confermato che il campionamento con AIR CUBE COM 2 è risultato idoneo per evidenziare, con tecniche di biologia molecolare, la presenza del genoma di *O. ovata* nell'aerosol marino quando nella colonna d'acqua sono presenti concentrazioni algali superiori alle linee guida ministeriali.

Gli sviluppi futuri possono prevedere nuove campagne di monitoraggio di aerosol marino con una maggiore frequenza di campionamento e con l'applicazione della metodologia molecolare di qrt-PCR per analisi di monitoraggio di *Ostreopsis* spp. in matrici di aerosol. Queste analisi richiedono tempi brevi e sono in grado di dare informazioni utili alle Autorità competenti sulla possibilità di presenza di *Ostreopsis* in aerosol associata a malesseri nei bagnanti che frequentano le spiagge nei periodi estivi.

Sarà inoltre interessante considerare i risultati molecolari ottenuti, in associazione ad analisi chimiche di tossine per verificare una possibile corrispondenza tra presenza di DNA e positività alla tossina in campioni di aerosol marino.

La messa a punto di metodiche molecolari di tipo quantitativo in correlazione con la presenza delle tossine nell'aerosol consentirà di stabilire limiti di allerta in situazioni di emergenza.

Importante sarà individuare centri operativi in grado di fornire risultati in tempi rapidi.

La tipologia e la conformazione delle strutture poste in opera per contrastare l'erosione possono essere fattori che giocano un ruolo molto importanti nel creare le condizioni ambientali favorevoli per l'innesco delle fioriture di *Ostreopsis*. Questo aspetto dovrà essere valutato nella progettazione di tali opere al fine di mitigare questi effetti negativi

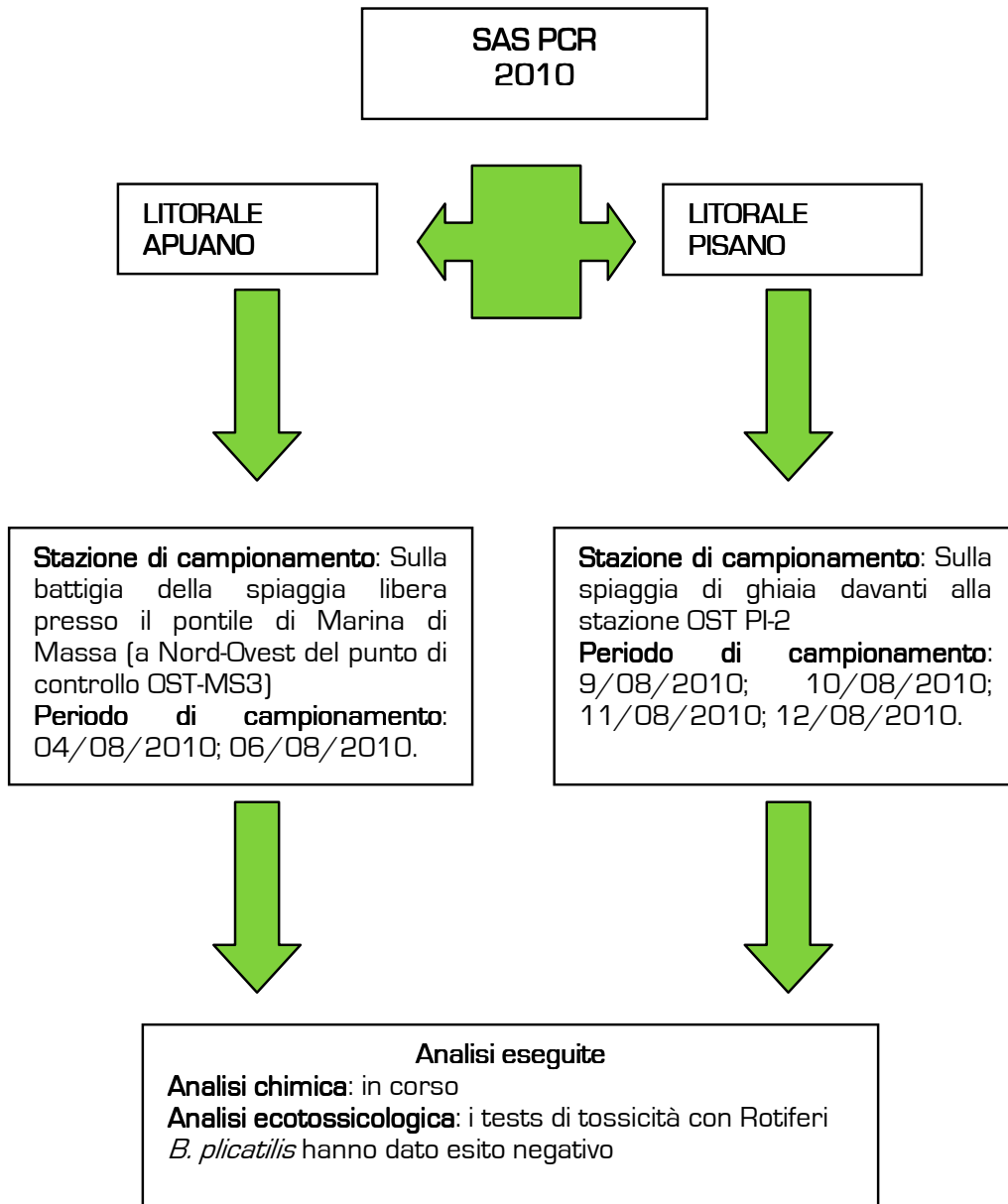


Figura 6

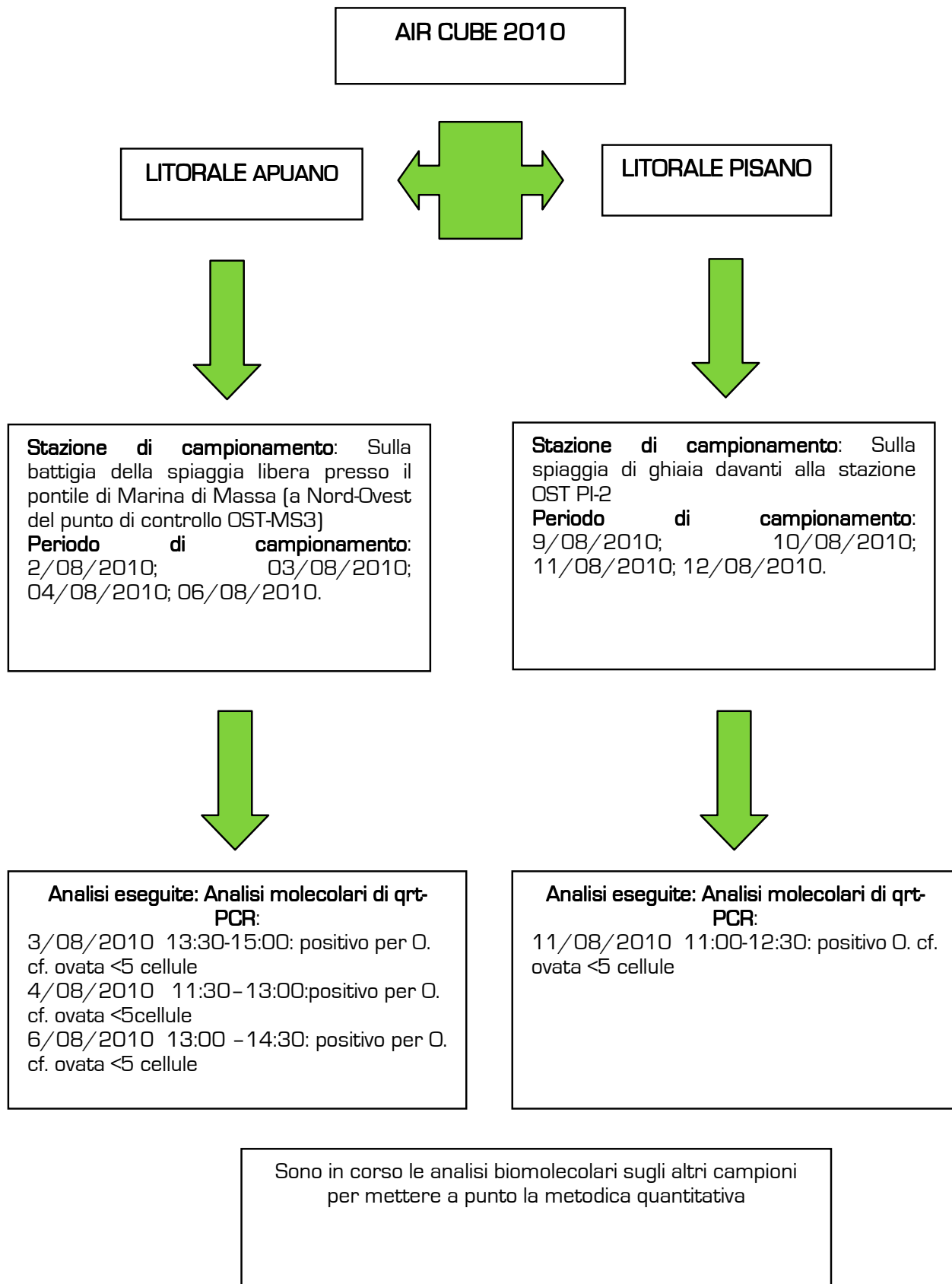


Figura 7

Ringraziamenti L'attuazione di questo progetto ha richiesto l'integrazione ed il coordinamento di varie strutture agenziali . Per Arpat si ringraziano gli operatori dell'Area Mare e dei dipartimenti di Massa, Pisa e Pistoia che hanno partecipato al progetto.

Per il Dipartimento di Chimica delle Sostanze Naturali dell'Università "Federico II" di Napoli Ernesto Fattorusso e Patrizia Ciminiello.

Bibliografia

- ARPAT, (2004), Monitoraggio Aerobiologico e Pollinosi in Toscana, Firenze, pp. 103.
- ARPAT, 2008, Controllo delle fioriture algali delle acque costiere della Toscana.
- ARPAT, 2009, Controllo delle fioriture algali delle acque costiere della Toscana.
- ARPAT, 2009 -Studio sulla presenza di biotossine algali nell'aerosol marino nell'ambito del programma di ricerca di ISPRA-MATTM "*Ostreopsis ovata ed ostreopsis spp.*: nuovi rischi di tossicità microalgale nei mari italiani".
- Battocchi, C., Totti, C., Vila, M., Masò, M., Capellacci, S., Accoroni, S., Renè, A., Scardi, M., Penna, A., 2010. Monitoring toxic microalga *Ostreopsis* (Dinoflagellate) species in coastal waters of the Mediterranean Sea using molecular PCR-based assay combined with light microscopy. *Marine Pollution Bulletin*, 60: 1074–1084.
- Ciminiello, P., Dell'Aversano, C., Fattorusso, E., Forino M., Magno G.S., Tartaglione L., Grillo C., Melchiorre N., 2006. The Genoa 2005 outbreak. Determination of putative palytoxin in Mediterranean *Ostreopsis ovata* by a new liquid chromatography tandem mass spectrometry method. *Analytical Chemistry* 78, 6153-6159.
- Ciminiello, P., Dell'Aversano, C., Fattorusso, E., Forino M., Tartaglione L., Grillo C. e Melchiorre N., 2008. Putative palytoxin and its new analogue, ovatoxin-a, in *Ostreopsis ovata* collected along the Ligurian coasts during the 2006 toxic outbreak. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* 19, 111–120.
- Fontanelli, C., 2009. Valutazione del rischio biologico e della tossicità dei blooms di *Ostreopsis ovata* sulle coste toscane, Tesi di laurea Università degli Studi di Pisa.
- Halbach, U., Wiebert, M., Westermayer, M., Wissel, C., 1983. Population ecology of rotifers as a bioassay tool for ecotoxicological tests in aquatic environments. *Ecotox. Envir. Safety* 7:484-513.
- Hirst, J.M ,1952. An automatic volumetric spore trap. *Ann.. Appl. Biol.*; 39: 257-65.
- Lanzoni, C., VPPS2000 Istruzioni per l'uso e manuale di servizio, Lanzoni S.R.L., Bologna.
- Ministero della Salute, 2007 .Linee guida. Gestione del rischio associato alle fioriture di *Ostreopsis ovata* nelle coste italiane
- Penna, A., Bertozzini, E., Battocchi, C., Giacobbe, M. G., Galluzzi, L., Garcés, E., Vila, M., Lugliè, A., Magnani, M., 2007. Monitoring of HAB species in the Mediterranean Sea through molecular techniques techniques. *Journal of Plankton Research*, 29: 19-38.
- Perini F., Casabianca A., Battocchi C., Accoroni S., Totti C., **Penna A.** 2011. New Approach Using the Real-Time PCR Method for Estimation of the Toxic Marine Dinoflagellate *Ostreopsis cf. ovata* in Marine Environment. *Plos One*, 6: 1-9.
- Riobò, P., Paz, B., Franco, J.M., 2006. Analysis of palytoxin-like in *Ostreopsis* cultures by liquid chromatography with precolumn derivatization and fluorescence detection. *Analytica Chimica Acta* 566, 217-223.
- Riobò, P., Paz, B., Franco, J.M., Vázquez, J.A., Murado, M.A., 2008. Proposal for a simple and sensitive haemolytic assay for palytoxin. Toxicological dynamics, kinetics, ouabain inhibition and thermal stability. *HarmfulAlgae* 7, 415-49.
- Rustighi, C., Casotti, M., 2004. Le fioriture tossiche di *Ostreopsis ovata* sul litorale apuano, Workshop "Le fioriture algali tossiche nelle acque italiane", Roma.

Sansoni, G., Borghini, B., Camici, G., Casotti, M., Righini, P., Rustighi, C., 2003. Fioriture algali di *Ostreopsis ovata* (Gonyaulacales: Dinophyceae): un problema emergente, *Biologia ambientale* 17(1):17-23.

Snell, T.W., Persoone, G., 1989. Acute toxicity bioassay using rotifers. I. A test for brackish and marine environments with *Brachionus plicatilis*. *Aquatic Toxicology* 14:65-80.

UN'INIZIATIVA DI RICERCA ISPRA: IL PROGETTO RE.N.O.: RETI NEURALI PER LO STUDIO DI *OSTREOPSIS OVATA*

di Antonello Bruschi, ISPRA

Riassunto

Il progetto Re.N.O. (Reti Neurali per lo *Ostreopsis ovata*) si pone l'obiettivo di valutare l'influenza delle condizioni ambientali (fisico-chimiche e biologiche) sulla presenza e sulla concentrazione di *Ostreopsis ovata*, tramite l'utilizzo di reti neurali.

Il progetto sarà articolato attorno a due tipologie di attività: la prima volta alla raccolta di tutti i dati esistenti sul territorio nazionale e delle conoscenze scientifiche pre-esistenti, la seconda volta all'analisi dei dati e all'applicazione delle reti neurali per investigare le relazioni esistenti tra i parametri misurati alla luce delle conoscenze acquisite. Queste due attività sono ciclicamente legate tra loro perché la prima è propedeutica alla seconda che a sua volta produce un feed-back per l'approfondimento della prima.

Nella prima fase l'attività sarà incentrata attorno alla raccolta dei dati e alla loro omogeneizzazione e organizzazione in un data-set integrato. Il data-set conterrà anche informazioni di tipo qualitativo (es: presenza e tipologia di opere di difesa) che andranno opportunamente convertite in forma numerica per essere utilizzate dalle reti neurali (es: presenza/assenza di opere indicata con 0/1). Sarà parallelamente eseguita una raccolta bibliografica di studi e pubblicazioni anche internazionali, da cui estrapolare le relazioni che legano i fattori ambientali alla concentrazione di *Ostreopsis ovata*.

La finalità dell'analisi dei dati sarà lo studio della cross-correlazione tra i diversi parametri misurati e la concentrazione di *Ostreopsis ovata* e la valutazione delle possibili aggregazioni spaziali e temporali sulle serie di dati al fine di eseguire gli studi su quantitativi di dati quanto più numerosi possibile. Successivamente verranno applicate le reti neurali al fine di verificare la dipendenza della concentrazione della microalga bentonica dai fattori ambientali, ossia dai parametri fisici, chimici, morfologici e biologici. Tale applicazione consisterà nella verifica della capacità delle reti neurali (opportunamente ottimizzate per ogni caso) di mettere in relazione i vari parametri con la concentrazione di *Ostreopsis ovata* al fine di investigare la loro influenza relativa sia singolarmente che in maniera combinata sulla concentrazione di *Ostreopsis ovata*. Successivamente sia la ricerca bibliografica che l'analisi dei dati saranno integrate alla luce dei risultati forniti dalle varie applicazioni delle reti neurali. Oltre all'obiettivo principale il progetto Reno si prefigge di ottenere anche indicazioni su eventuali parametri che potrebbero essere inseriti nel monitoraggio eseguito dalle regioni, rendendolo così più mirato.

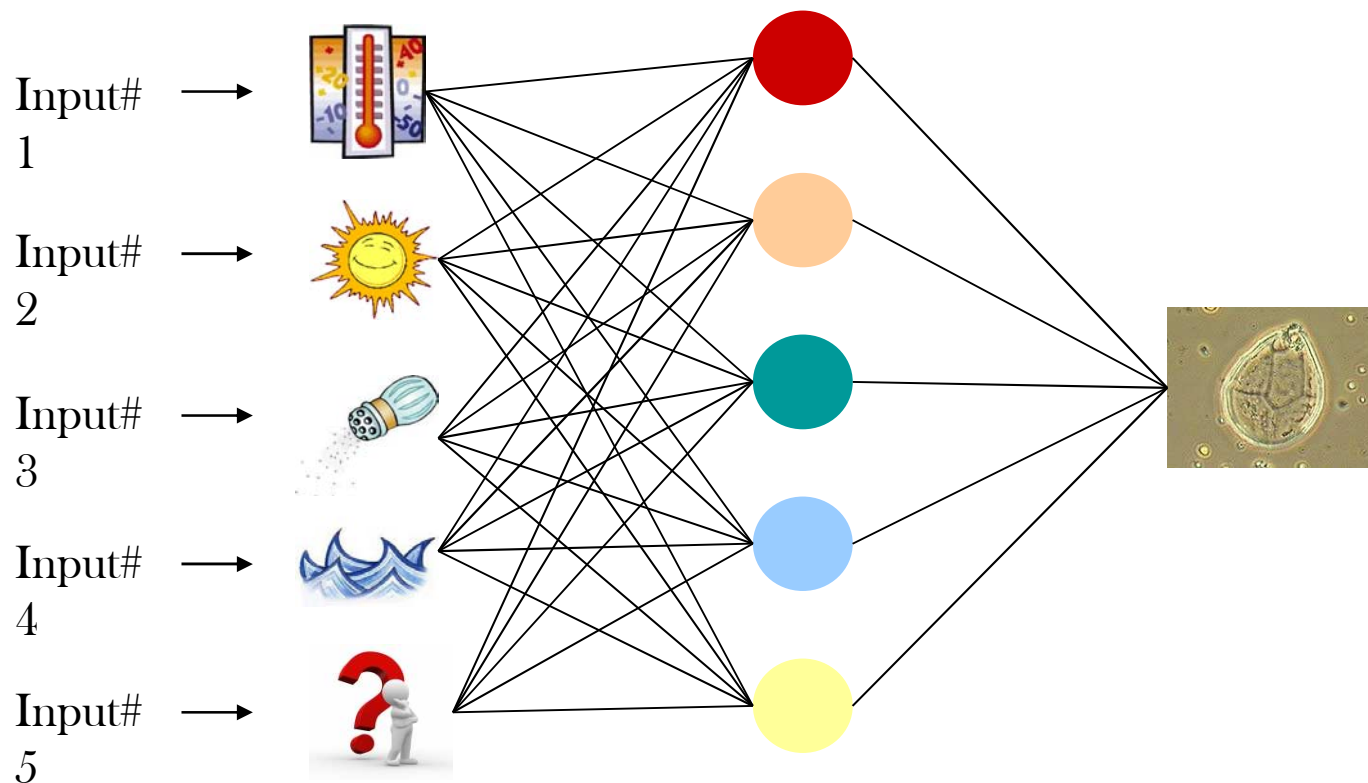
PROGETTO RENO

(REti Neurali per *l'Ostreopsis ovata*)



ISPRA

Istituto Superiore per la Protezione
e la Ricerca Ambientale



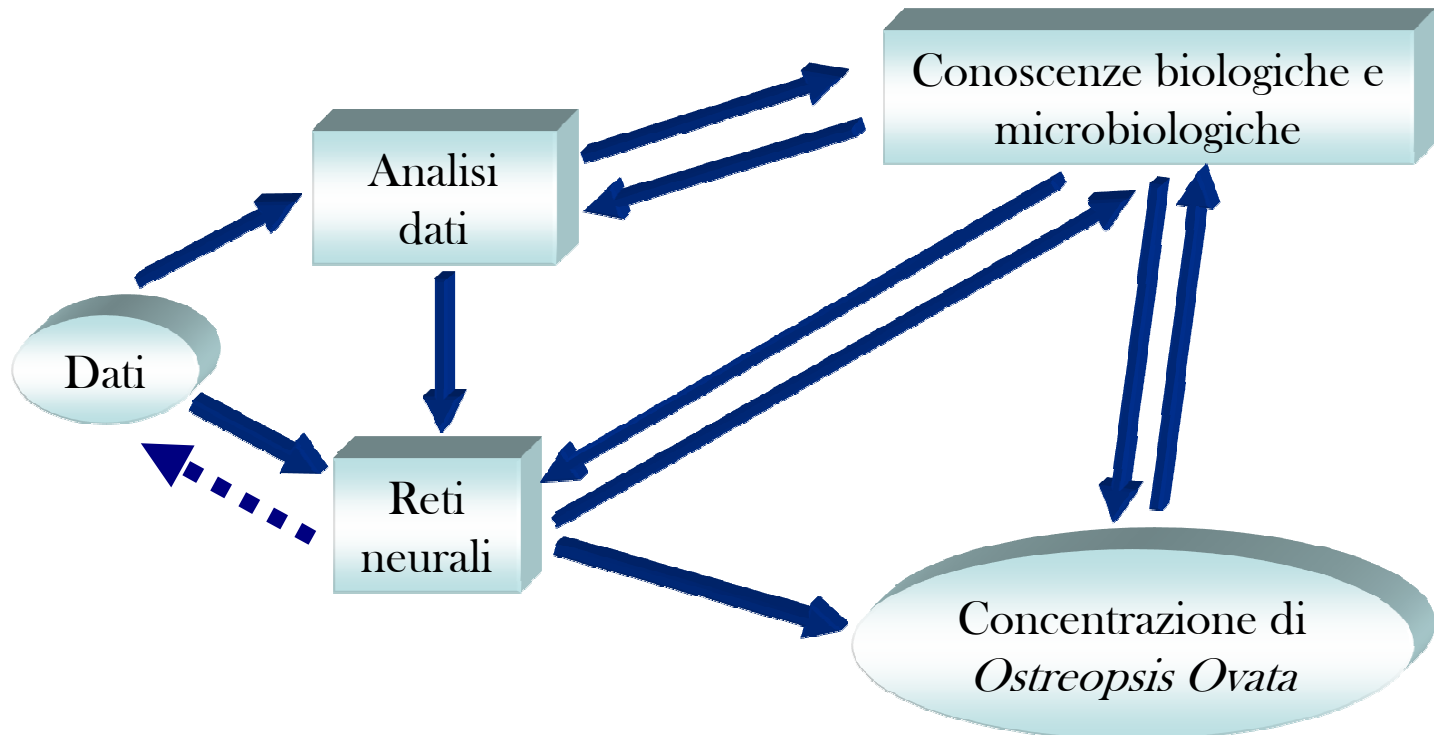
Relatore: *Antonello Bruschi*
Servizio Difesa delle Coste

OBIETTIVO



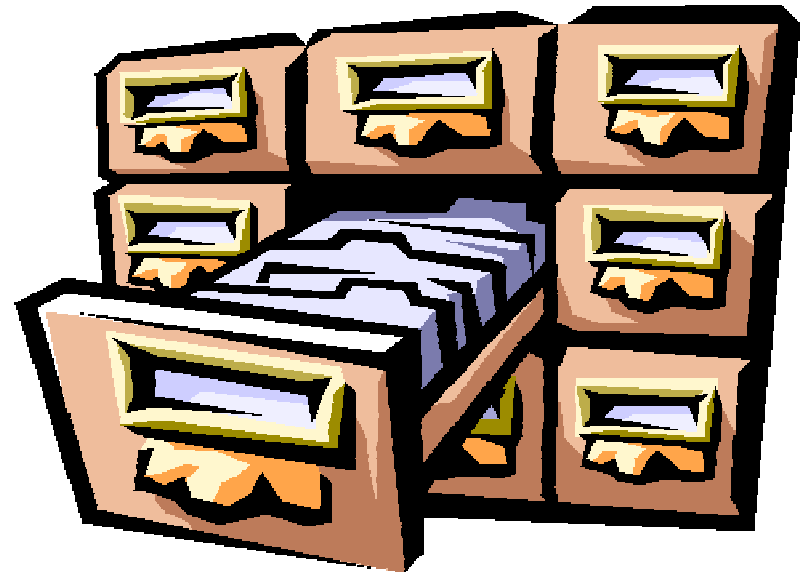
Valutare l'influenza delle condizioni ambientali (fisico-chimiche e biologiche) sulla presenza e sulla concentrazione di *Ostreopsis ovata*, tramite l'utilizzo di reti neurali.

SCHEMA DELLE ATTIVITÀ PREVISTE



1. RACCOLTA DEI DATI

- Raccolta di tutte le fonti di dati disponibili. Integrazione dei dati provenienti dal monitoraggio della Legge 979/82 con dati provenienti da altre fonti (ad es. Rete Ondametrica Nazionale e Rete Mareografica Nazionale, informazioni sulle opere di difesa, ...).



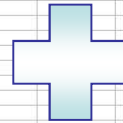
- Omogeneizzazione dei dati e progettazione di un data-set unico.
- Creazione del data-set e conversione delle informazioni descrittive in forma numerica (es: presenza di opere di difesa indicata con 0 o 1).

1. RACCOLTA DEI DATI

A3	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P	Q	R	S	T	U	V	W	X	Y	Z	AA	AB	AC	AD	AE
Data	Transetto	Corpo Idrico N.	Denominazione Campione/ località	Prov.	Comune	Coordinate punto campionamento		Tipo di substrato	Distanza a costa	Profondità del fondale (m)	Profondità campionamento (m)	cell/l O. ovata	cell/l C. monotis	cell/l P. lima	Diatomee	Dinoflagellati	Altro	Specie macroalga	N.cell/g di O.ovata	N.cell/g di P. lima	N.cell/g di C. monotis	Mouse Test Positivo	Profondità Camp CTD	Salinità (PSU)	Temp [C] aria	Ossigeno disciolto (Sat%)	Ossigeno disciolto (mg/l)	pH	Chi "a" [spt.] mg/m³	C
						Lat	Lon																		acqua					

Ad esempio:

- Data campionamento (gg/mm/aaaa)
- Coordinate in WGS 84 (Lat. Lon.)
- Conc. O. ovata (cell/l)
- Conc. P. lima e C. monotis (cell/l)
- Diatomee e Dinoflagellati
- Tipo di macroalga
- Numero cell/g di O. ovata
- Numero cell/g di P. lima e C. monotis
- Profondità campione
- Salinità
- Temperatura aria/acqua
- Ossigeno disciolto
- pH
- Clorofilla a
- Torbidità
- Condizioni meteo-marine (mare e vento)



- Irraggiamento solare
- Parametri meteo-marini (es: onde, pioggia, nuvolosità) da reti di misura o da modelli numerici.
- Parametri morfologici (es: morfologia, sedimenti, presenza di opere di difesa, ...)
- Altri dati da determinare in corso d'opera

2. RACCOLTA BIBLIOGRAFICA DI STUDI E PUBBLICAZIONI

- Raccolta di tutte le pubblicazioni reperibili inerenti la tematica del progetto (nazionali e internazionali).



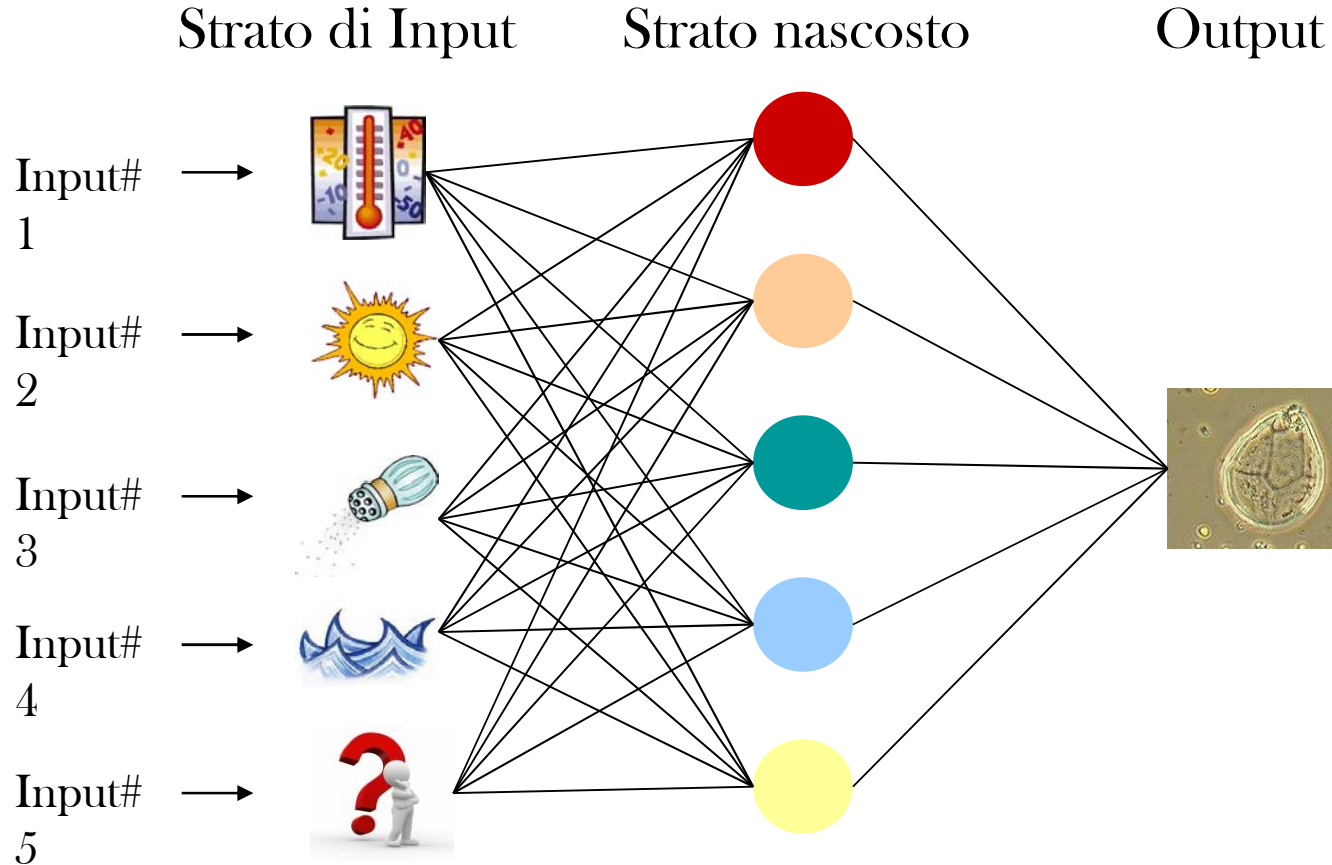
- Studio e sintesi delle conoscenze, focalizzandosi sulle relazioni che legano i fattori ambientali alla concentrazione di *Ostreopsis ovata*.

3. ANALISI DEI DATI

- Studio della cross-correlazione tra i diversi parametri misurati e la concentrazione di *Ostreopsis ovata*.
- Valutazione delle possibili aggregazioni spaziali e temporali sulle serie di dati.

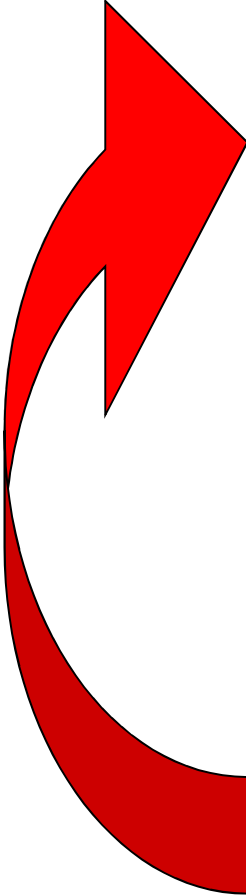


4. APPLICAZIONE DELLE RETI NEURALI

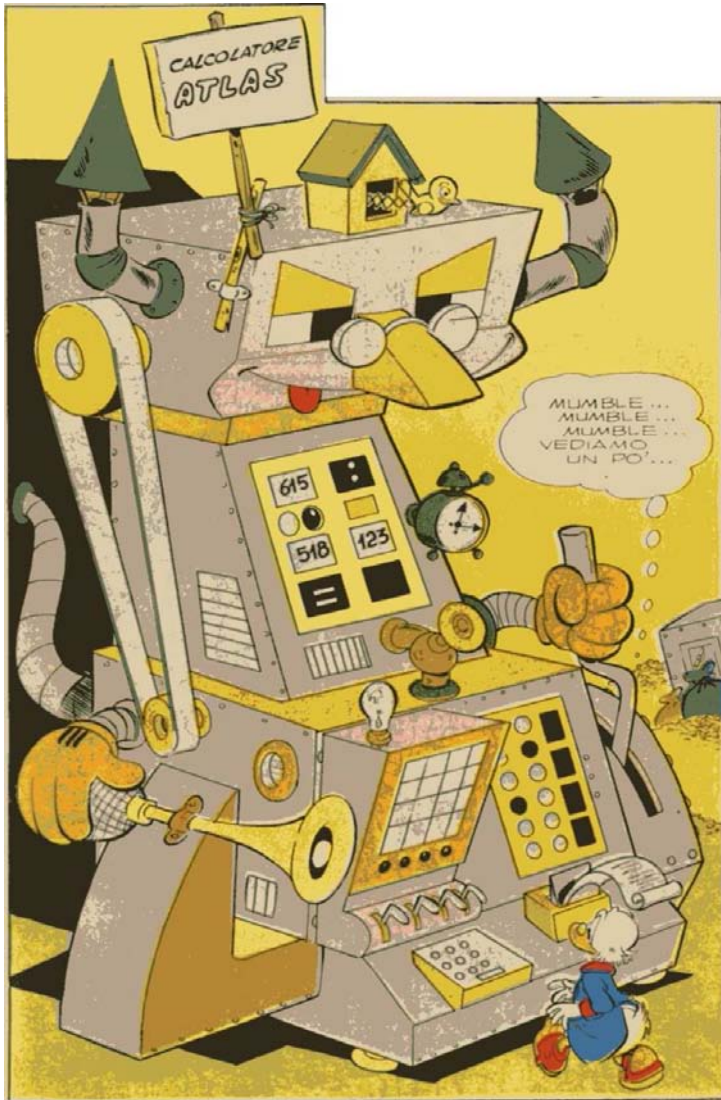


Le reti neurali sono utilizzate per verificare la dipendenza della concentrazione di *Ostreopsis ovata* dai fattori ambientali, ossia dai parametri fisici, chimici, morfologici e biologici.

4. APPLICAZIONE DELLE RETI NEURALI

- 
- Selezione dei parametri di input sulla base degli studi eseguiti.
 - Test sulla struttura ottimale della rete neurale (numero di strati, numero di neuroni in ogni strato, algoritmo di apprendimento)
 - Analisi dei risultati alla luce degli studi bibliografici, delle conoscenze microbiologiche e dell'analisi dei dati.
 - Integrazione della ricerca bibliografica e dell'analisi dei dati sulla base dei risultati ottenuti nel punto precedente.

5. RISULTATI ATTESI



- Ottenere indicazioni circa l'influenza dei fattori ambientali sulla concentrazione di *Ostreopsis ovata*. Valutazione dell'influenza relativa dei singoli fattori.
- Ottenere indicazioni su eventuali parametri che potrebbe essere utile inserire nel monitoraggio.

6. CONCLUSIONI E CRITICITÀ

- Il progetto allo stato attuale non è finanziato e non richiede finanziamenti.
- Partecipazione aperta a tutti coloro che fossero interessati a questa iniziativa, sia a supporto delle attività proposte che con attività integrative.

Principale criticità:

Servono molti dati (qualche migliaio per l'addestramento della rete neurale e altrettanti per valutarne la capacità di generalizzazione).

LA DIRETTIVA 2008/56/CE (G.U L 164 DEL 25.06.2008): STRATEGIA AMBIENTE MARINO

di Cecilia Silvestri, ISPRA

Riassunto

Il 15 luglio 2008 è entrata in vigore la Direttiva Quadro Europea sulla Strategia per l'ambiente marino (Direttiva 2008/56/EC) che si prefigge di raggiungere un buono stato ambientale europeo per tutte le acque marine entro il 2020, ovvero di raggiungere entro tale data un "buono stato generale dell'ambiente nelle acque marine, tenuto conto della struttura, della funzione e dei processi degli ecosistemi marini che lo compongono, nonché dei fattori fisiografici, geografici e climatici e delle condizioni fisico-chimiche, comprese quelle risultanti dalle attività umane all'interno o all'esterno della zona considerata".

La Direttiva definisce le regioni (es. Mediterraneo) e le sub regioni marine (es. Mediterraneo Occidentale, Mar Adriatico, Mar Ionio e Mediterraneo Centrale, Mar Egeo orientale) e fornisce agli Stati Membri la facoltà di decidere se sviluppare strategie marine a livello regionale o sub regionale la attraverso la cooperazione con i Paesi terzi con cui condividono le Regioni e Sub - regioni marine, integrando le diverse politiche ambientali: normative comunitarie accordi internazionali. Il campo di applicazione comprende le Acque territoriali e quelle sottoposte alla giurisdizione dello stato costiero e le Acque costiere come definite dal D.lgs152/2006 per gli aspetti specifici dello stato ambientale marino non trattati dal decreto.

In Italia il recepimento della Direttiva è avvenuto il 13 ottobre 2010 (D. Lgs. 190/2010) e la prossima tappa è il 15 luglio 2012 con la

-Valutazione iniziale dello stato ambientale attraverso i dati esistenti (art. 8 della Direttiva)

-Determinazione del "Buono Stato ambientale" (art.9 della Direttiva)

-Determinazione di una serie di traguardi ambientali e indicatori (art.10 della Direttiva)

Entro il 15 luglio 2014 devono essere attuati programmi di monitoraggio per la valutazione continua dello stato ambientale (art.11 della Direttiva) e l'anno successivo programmi di misure per conseguire o mantenere il buono stato ambientale, per poi arrivare al 2020 con il raggiungimento del buono stato ambientale

Per far ciò Gli Stati Membri si devono basare sui criteri e gli standard metodologici stabiliti dalla CE, la quale a sua volta si è avvalsa del JRC/ICES che ha creato 11 Task groups di esperti che hanno prodotto 11 report. Nell'allegato I della Direttiva sono riportati gli 11 descrittori qualitativi per la determinazione del *Good Environmental Status* (GES).

Gli esperti hanno valutato: le richieste di altre Direttive e convenzioni (2000/60/CE, 2008/105/CE, OSPAR, HELCOM, UNEP/MAP-MEDPOL); i programmi di monitoraggio esistenti; gli standard metodologici esistenti; le linee guida sulla valutazione della qualità del dato esistenti; gli sviluppi futuri della ricerca. Gli 11 report sono stati discussi all'interno del gruppo di lavoro GES istituito dalla CE all'interno del quale ci sono le diverse DGs della Commissione, i rappresentanti degli SM, i rappresentanti delle Convenzioni internazionali e gli stakeholder. Sulla base degli input derivati dal GES un Committee, formato dagli Stati Membri, ha assistito la CE nello sviluppo di una *Commission decision* in cui ci sono i criteri e le metodologie

standard da seguire per arrivare a definire il GES. Tale decisione è stata inoltrata al Parlamento Europeo.

L'Italia con i rappresentanti del MATTM e i contributi degli esperti ISPRA ha lavorato attivamente all'interno di queste fasi per far approvare una *Commission decision* applicabile a livello di Mediterraneo e delle sub-regioni.

La decisione della Commissione pubblicata il 1 Settembre 2010, illustra i CRITERI che consentono di valutare in che misura il buono stato ambientale è conseguito e gli INDICATORI che forniscono una misura dei criteri e sono necessari per rendere operativi quest'ultimi.

Il Ministero dell'Ambiente è l'autorità competente [art. 4 D.lgs 190/2010] per le attività di attuazione del presente decreto il Ministero si avvale di un Comitato tecnico, previsto dall'art. 5 del d. lgs., che integra 37 membri nominati in rappresentanza di 9 amministrazioni centrali (incluso l'ambiente), del Dipartimento per gli Affari regionali della Presidenza del Consiglio dei ministri, di ciascuna Regione e provincia autonoma nonché dell'ANCI e dell'UPI e di un gruppo di esperti indicati dalle amministrazioni per la consulenza tecnico scientifica.

Esso promuove e coordina, la valutazione iniziale dello stato ambientale attuale e dell'impatto delle attività antropiche sull'ambiente marino, sulla base dei dati e delle informazioni esistenti, inclusi quelli derivanti dall'attuazione della parte terza del [*decreto legislativo 3 aprile 2006, n. 152*](#), e successive modificazioni.

Le amministrazioni dello Stato, i soggetti pubblici e privati che, nell'esercizio delle proprie attività, producono o detengono dati e informazioni utili ai fini della valutazione sono tenuti, su richiesta del Ministero dell'ambiente, a metterli a disposizione (art. 8 ,c.2, del D.lgs).

La valutazione iniziale comporta sia l'analisi delle caratteristiche fisico-chimiche, i tipi di habitat, le caratteristiche biologiche e l'idromorfologia (Tab.1. Allegato III del D.lgs 190/2010) sia l'analisi delle pressioni e degli impatti (Tab. 2. Allegato III del D.lgs 190/2010) ed un'analisi degli aspetti socio-economici dell'utilizzo dell'ambiente marino e dei costi del suo degrado.

In questa fase, il MATTM, in attesa della costituzione del Comitato Tecnico, ha chiesto ad ISPRA di effettuare uno studio di pre-fattibilità per la realizzazione della valutazione iniziale.

Le ARPA, gli Enti e gli Istituti di Ricerca producono e detengono dati e informazioni utili ai fini della valutazione iniziale e costituiscono l'"expertise" di base per arrivare a determinare il buono stato ambientale, pertanto il compito di supporto tecnico-scientifico delle ARPA, degli Enti ed Istituti di Ricerca sarà fondamentale.



La Direttiva Quadro 2008/56/CE: Strategia Ambiente Marino

Cecilia Silvestri*

*ISPRA- Istituto Superiore per la Protezione e la Ricerca Ambientale
Via Vitaliano Brancati, 48, 00144- Roma

email: cecilia.silvestri@isprambiente.it

Nella presentazione:

- ❑ **Obiettivi della Direttiva Quadro**
- ❑ **Applicazione e tempistiche della Direttiva Quadro**
- ❑ **Sviluppo e implementazione della Direttiva Quadro**
- ❑ **Il ruolo delle ARPA e della ricerca nel percorso d'implementazione della Direttiva Quadro e del suo recepimento in Italia**



Il 15 luglio 2008

è entrata in vigore la **Direttiva Quadro Europea sulla Strategia per l'ambiente marino (Direttiva 2008/56/EC)**



L'obiettivo della Direttiva :

il raggiungimento di un **buono stato ecologico** dell'ambiente marino europeo entro il 2020

Stato ecologico: stato generale dell'ambiente nelle acque marine, tenuto conto della struttura, della funzione e dei processi degli ecosistemi marini che lo compongono, nonché dei fattori fisiografici, geografici e climatici e delle condizioni fisico-chimiche, **comprese quelle risultanti dalle attività umane** all'interno o all'esterno della zona considerata



Natura transfrontaliera della Direttiva

La strategia deve essere resa operativa ed adattata a **livello regionale e sub-regionale** sulla base di principi comuni a tutti i mari Europei

Regione Mediterraneo

Subregioni

Mediterraneo Occidentale

Mar Adriatico

Mar Ionio e Mediterraneo Centrale

Mar Egeo orientale



Gli SM devono agire in cooperazione con i Paesi terzi con cui condividono le Regioni e Sub - regioni marine, in particolare nell'ambito delle convenzioni internazionali esistenti



Integrazione delle diverse politiche ambientali: normative comunitarie accordi internazionali evitando sovrapposizioni



Habitats (EC, 1992) and Birds (EC, 1979) Directives:

protect certain species and
habitats, as part of the EU
Natura 2000's network of
protected areas

Water Framework Directive (EC, 2000)

achieve a good ecological status
of all surface waters

EU policies :

Directives addressing:

- Waste Water Treatment,
- Land-Based Pollution,
- Pollution Prevention in Maritime Transport
- Environmental Impact Assessment

Common Fishery Policy (EC, 2002)

promotes conservation and sustainable
exploitation of fisheries resources

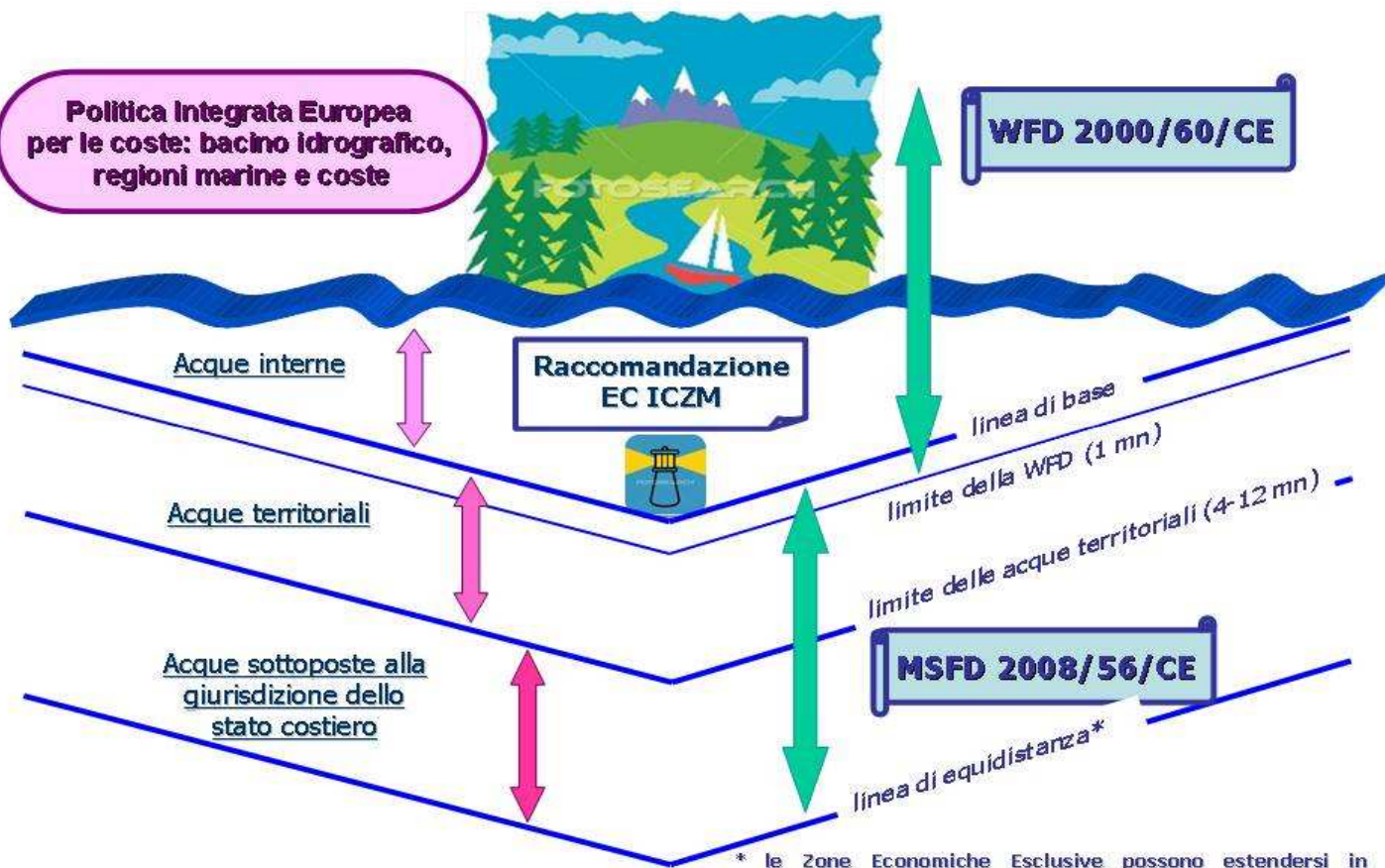
Barcelona
Convention

Campo di applicazione della Direttiva



Politica Integrata Europea
per le coste: bacino idrografico,
regioni marine e coste

WFD 2000/60/CE



Raccomandazione
EC ICZM

Acque interne

Acque territoriali

Acque sottoposte alla
giurisdizione dello
stato costiero

Alto mare

linea di base

limite della WFD (1 mn)

limite delle acque territoriali (4-12 mn)

MSFD 2008/56/CE

linea di equidistanza*

* le Zone Economiche Esclusive possono estendersi in conformità dell'UNCLOS fino a 200 nm; nel Mediterraneo tali zone non sono state ancora istituite. La ripartizione di queste è definita sul principio dell'equidistanza dalla linea di base. L'Italia si è dotata nel 2006 (Legge 61) di uno strumento per l'istituzione, uniformemente ad altri Stati rivieraschi mediterranei, di proprie zone di protezione ecologica.

Tempistiche

15 luglio 2010

Recepimento

Proporre le **suddivisioni** nelle rispettive sottoregioni (Mar Med.Occ., Mar Adriatico, Mar Ionio e Mar Med.Centr.)

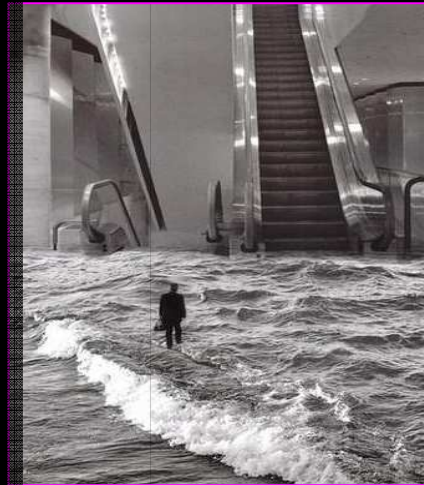
Identificare le **autorità competenti** nazionali all'applicazione della Direttiva

15 luglio 2012

-Valutazione iniziale dello stato ecologico attraverso i dati esistenti art. 8

-Determinazione del "Buono Stato Ecologico" art.9

-Determinazione di una serie di traguardi ambientali e indicatori art. 10



2020

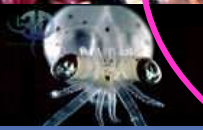
Raggiungimento del buono stato ecologico

15 luglio 2015

-Programmi di misure per conseguire o mantenere il buono stato ecologico

15 luglio 2014

-Programmi di monitoraggio per la valutazione continua dello stato ecologico art.11



Sviluppo e implementazione della Direttiva Quadro



Quali sono state le azioni della
Commissione Europea?



A che punto siamo in Italia?

A livello di Commissione Europea

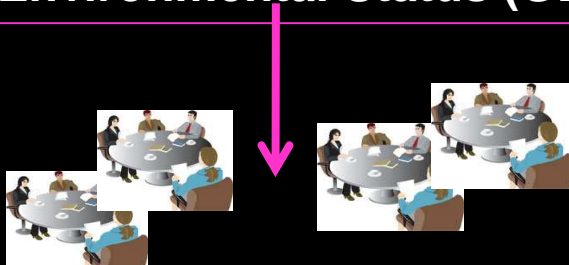
Gli Stati Membri devono determinare il buono stato ecologico sulla base dei **criteri e degli standard metodologici stabiliti dalla CE**

Come sono stati elaborati tali criteri e gli standard metodologici?



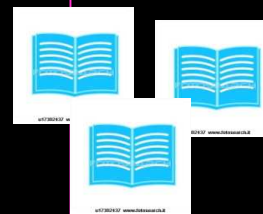


La CE ha commissionato al **JRC/ICES** di definire i criteri e gli standard metodologici per il Good Environmental Status (GES)



Il JRC/ICES ha creato 11 Task groups di esperti che hanno prodotto **11 report**

11 sono i descrittori qualitativi per la determinazione del GES, dell'**ALLEGATO I** della Direttiva su cui bisogna basarsi per la definizione di GES



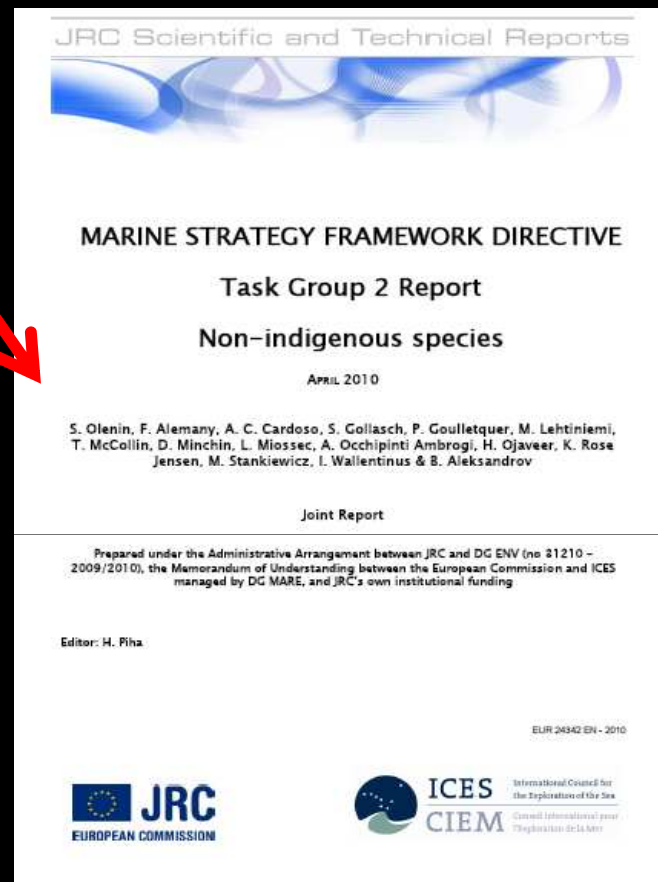
TG report

- D1-Biodiversity**
- D2-Non indigenous species**
- D3-Fisheries**
- D4-Food web**
- D5-Eutrophication**
- D6-Seafloor integrity**
- D7-Hydrographic condition**
- D8-Contaminants**
- D9-Contaminants in seafood**
- D10-Litter**
- D11-Noise**



- D1-Biodiversity
- D2-Non indigenous species
- D3-Fisheries
- D4-Food web
- D5-Eutrophication
- D6-Seafloor integrity
- D7-Hydrographic condition
- D8-Contaminants
- D9-Contaminants in seafood
- D10-Litter
- D11-Noise

<http://circa.europa.eu/Members/irc/env/marine/library>





Cosa gli esperti hanno valutato?



- **Richieste di altre Direttive e convenzioni: 2000/60/CE, 2008/105/CE, OSPAR, HELCOM, UNEP/MAP-MEDPOL**
- **Programmi di monitoraggio esistenti**
- **Standard metodologici esistenti**
- **Linee guida sulla valutazione della qualità del dato esistenti**
- **Sviluppi futuri della ricerca**



Gli **11 report** sono stati discussi all'interno del gruppo di lavoro **GES**



GES



Committee

Il **GES** è un gruppo di lavoro istituito dalla CE all'interno del quale ci sono le diverse DGs della Commissione, i rappresentanti degli SM, i rappresentanti delle Convenzioni internazionali e gli stakeholder

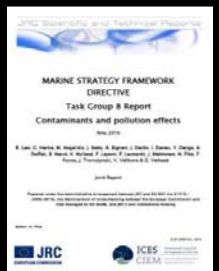
Sulla base degli input derivati dal GES un **Committee**, formato dagli SM, ha assistito la CE nello sviluppo di una **Commission decision** in cui ci sono i criteri e le metodologie standard da seguire per arrivare a definire il GES. Tale decisione è stata inoltrata al Parlamento

L' Italia con i **rappresentanti del MATIM** e i contributi degli **esperti ISPRA** ha lavorato attivamente all'interno di queste fasi per far approvare una **Commission decision applicabile a livello di Mediterraneo e di sub-regioni**

Europeo



Esperti
Report



GES /Commitee

Criteria e norme metodologiche per definire il buono stato ecologico



CE

1 Settembre 2010
pubblicazione della Decisione della Commissione



Decisione della Commissione sui criteri e gli standard metodologici relativi al buono stato ecologico delle acque marine

- D1-Biodiversity
- D2-Non indigenous species
- D3-Fisheries
- D4-Food web
- D5-Eutrophication
- D6-Seafloor integrity
- D7-Hydrographic condition
- D8-Contaminants
- D9-Contaminants in seafood
- D10-Litter
- D11-Noise

CRITERI
consentono di valutare in che misura
il buono stato ecologico è conseguito

INDICATORI
Indici o parametri che forniscono una
misura dei criteri e sono necessari per
rendere operativi i criteri

Buono Stato Ecologico delle acque
marine





Descrittore 2: Le specie non indigene introdotte dalle attività umane restano a livelli che non alterano negativamente gli ecosistemi.

Indicatore

2.1. Abbondanza e caratterizzazione dello stato delle specie non indigene, in particolare delle specie invasive **Criterio**

- Tendenze in relazione all'abbondanza, alla frequenza di ritrovamento e alla distribuzione spaziale di specie non indigene, in particolare specie non indigene invasive, soprattutto nelle zone a rischio, in relazione ai principali vettori e alle principali vie di diffusione di tali specie (2.1.1).

Indicatori

2.2. Impatto ambientale delle specie invasive non indigene **Criterio**

- Rapporto tra specie invasive non indigene e specie indigene in alcuni gruppi tassonomici oggetto di studi approfonditi (ad esempio pesci, macroalghe, molluschi) che possono fornire una misura per valutare le variazioni nella composizione delle specie (ad esempio a seguito di un insediamento a scapito delle specie native) (2.2.1)
- Impatti delle specie invasive non indigene a livello di specie, habitat ed ecosistemi, quando possibile (2.2.2).

A che punto siamo in Italia?



La **Direttiva è stata recepita** il 13 ottobre 2010 con D.lgs 190/2010

L'autorità competente è il **Ministero dell'Ambiente** (art. 4 D.lgs 190/2010)

L'**autorità competente** per le attività di attuazione del presente decreto si avvarrà di un **Comitato Tecnico** composto da rappresentanti di 10 Ministeri, di tutte le Regioni, delle province autonome, dell'ANCI e dell'UPI e di un **gruppo di esperti indicati dalle amministrazioni per la consulenza tecnico scientifica** (art. 5 D.lgs 190/2010)



15 luglio 2012



Impegno immediato dell'Italia è: la valutazione iniziale delle acque marine attraverso i **dati esistenti**

Art. 8 *Valutazione iniziale del D.lgs 190/2010*

1. Il **Ministero dell'ambiente promuove e coordina, avvalendosi del Comitato, la valutazione iniziale** dello stato ambientale attuale e dell'impatto delle attività antropiche sull'ambiente marino, **sulla base dei dati e delle informazioni esistenti**, inclusi quelli derivanti dall'attuazione della parte terza del decreto legislativo 3 aprile 2006, n. 152, e successive modificazioni.

2. Le amministrazioni dello Stato, **i soggetti pubblici e privati che, nell'esercizio delle proprie attività, producono o detengono dati e informazioni utili ai fini della valutazione di cui al comma 1 sono tenuti, su richiesta del Ministero dell'ambiente, a metterli a disposizione.** Restano ferme le vigenti disposizioni che prevedono l'invio o la messa a disposizione di tali dati e informazioni.



Come fare questa valutazione?



a) l'analisi delle **caratteristiche fisico-chimiche, i tipi di habitat, le caratteristiche biologiche e l'idromorfologia** (Tab.1. Allegato III del D.lgs 190/2010)

b) l'analisi delle **pressioni e degli impatti** (Tab. 2. Allegato III del D.lgs 190/2010)

Tabella 1, Allegato III Direttiva 2008/56/CE (Caratteristiche)



ALLEGATO III

Elenchi indicativi di caratteristiche, pressioni e impatti

(Articolo 8, paragrafo 1, articolo 9, paragrafi 1 e 3, articolo 10, paragrafo 1, articolo 11, paragrafo 1, e articolo 24)

Tabella 1
Caratteristiche

Caratteristiche fisico-chimiche	<ul style="list-style-type: none"> — Topografia e batimetria del fondo marino — Regime annuo e stagionale delle temperature e copertura di ghiaccio, velocità della corrente, risalita di acque profonde, esposizione alle onde, caratteristiche di mescolamento, torbidità, tempo di residenza — Distribuzione territoriale e temporale della salinità — Distribuzione territoriale e temporale dei nutrienti (DIN, TN, DP, TP, TOC) e dell'ossigeno — Profilo di pH e di pCO₂ o informazioni equivalenti utilizzate per misurare l'acidificazione marina
Tipi di habitat	<ul style="list-style-type: none"> — Tipi di habitat predominanti sul fondo marino e nella colonna d'acqua con descrizione delle caratteristiche fisico-chimiche tipiche, quali profondità, regime delle temperature dell'acqua, correnti e altra circolazione delle masse d'acqua, salinità, struttura e composizione dei substrati del fondo marino — Identificazione e mappatura di tipi di habitat particolari, segnatamente quelli che sono stati o identificati nell'ambito della legislazione comunitaria (direttive Habitat e Flora) o (habitat) o delle convenzioni internazionali come habitat di particolare interesse sotto il profilo scientifico o della biodiversità — Habitat in zone che, per le loro caratteristiche, ubicazione o importanza strategica, meritano una menzione particolare. Tra queste possono figurare aree soggette a pressioni intense o specifiche oppure aree che meritano un regime di protezione specifico
Caratteristiche biologiche	<ul style="list-style-type: none"> — Descrizione delle comunità biologiche associate agli habitat predominanti sul fondo marino e nella colonna d'acqua. Sono comprese informazioni sulle comunità di fitoplancton e zooplancton, comprese le specie e la variabilità stagionale e geografica — Informazioni su angiosperme, macrofite e invertebrati del fondo marino, in particolare la composizione delle specie, la biomassa e la variabilità stagionale/regionale — Informazioni sulla struttura delle popolazioni ittiche, compresa l'abbondanza, distribuzione e la struttura per età/dimensione delle popolazioni — Descrizione della dinamica delle popolazioni, dell'area di distribuzione naturale ed effettiva e dello stato delle specie di mammiferi e rettili marini presenti nella regione o sottoregione marina — Descrizione della dinamica delle popolazioni, dell'area di distribuzione naturale ed effettiva e dello stato delle specie di uccelli marini presenti nella regione o sottoregione marina — Descrizione della dinamica delle popolazioni, dell'area di distribuzione naturale ed effettiva e dello stato delle altre specie presenti nella regione o sottoregione marina e contemplate dalla legislazione comunitaria o da accordi internazionali — Inventario relativo alla presenza, all'abbondanza e alla distribuzione territoriale di specie esotiche, non indigene o, se del caso, di varietà geneticamente distinte di specie indigene, presenti nella regione o sottoregione marina
Altre caratteristiche	<ul style="list-style-type: none"> — Descrizione della situazione riguardo alle sostanze chimiche, compresi sostanze chimiche problematiche, contaminazione dei sedimenti, aree fortemente inquinate, aspetti riguardanti la salute e contaminazione dei bioti (in particolare quelli destinati al consumo umano) — Descrizione di altri aspetti o caratteristiche tipici o specifici della regione o sottoregione marina

Caratteristiche fisico-chimiche

- Topografia e batimetria del fondo marino
- Distribuzione dei nutrienti (DIN,TN,DIP,TP TOC) e dell'O₂
- Profilo di pH e di pCO₂.....

Tipi di habitat

- Tipi di habitat predominanti sul fondo marino e nella colonna d'acqua
- Identificazione e mappatura di habitat particolari

Caratteristiche biologiche

- Descrizioni delle comunità biologiche associate agli habitat : fitoplancton, zooplancton, angiosperme, macrofite, invertebrati del fondo marino
- Informazioni sulle strutture delle popolazioni ittiche
- Descrizione della dinamica delle popolazioni specie di mammiferi, rettili marini...
- Inventario specie non indigene

Tabella 2, Allegato III Direttiva 2008/56/CE (Pressioni e impatti)



Tabella 2
Pressioni e impatti

Perdita fisica	<ul style="list-style-type: none"> — Soffocamento (ad esempio con strutture antropiche o attraverso lo smaltimento di materiali di dragaggio) — Sigillatura (ad esempio con costruzioni permanenti)
Danni fisici	<ul style="list-style-type: none"> — Cambiamenti dell'interramento (ad esempio scarichi, aumento del dilavamento, dragaggio/smaltimento di materiali di dragaggio) — Abrasione (ad esempio impatto sul fondo marino causato da pesca commerciale, navigazione, attracco) — Estrazione selettiva (ad esempio esplorazione e sfruttamento delle risorse biologiche e non, sul fondo marino e sottosuolo)
Altre perturbazioni fisiche	<ul style="list-style-type: none"> — Rumore sottomarino (ad esempio causato da trasporti marittimi, attrezzatura acustica sottomarina) — Rifiuti marini
Interferenze con processi idrologici	<ul style="list-style-type: none"> — Cambiamenti importanti del regime termico (ad esempio scarichi delle centrali elettriche) — Cambiamenti importanti del regime di salinità (ad esempio costruzioni che ostacolano la circolazione dell'acqua, estrazione di acqua)
Contaminazione da sostanze pericolose	<ul style="list-style-type: none"> — Introduzione di composti sintetici (ad esempio sostanze prioritarie di cui alla direttiva 2000/60/CE che hanno pertinenza con l'ambiente marino, come pesticidi, agenti fito-vegetativi, prodotti farmaceutici, provenienti ad esempio da perdite da fonti diffuse, inquinamento provocato da navi, deposizione atmosferica e sostanze biologicamente attive) — Introduzione di sostanze e composti non sintetici (ad esempio metalli pesanti, idrocarburi, provenienti ad esempio da inquinamento provocato da navi nonché da esplorazione e sfruttamento di giacimenti di petrolio, gas e minerali, deposizione atmosferica, apporti fluviali) — Introduzione di radionuclidi
Emissione sistematica e/o intenzionale di sostanze	<ul style="list-style-type: none"> — Introduzione di altre sostanze, siano esse solide, liquide o gassose, nelle acque marine, derivante dalla loro emissione sistematica e/o intenzionale nell'ambiente marino, consentita in conformità di altra legislazione comunitaria e/o di convenzioni internazionali.
Arricchimento di nutrienti e sostanze organiche	<ul style="list-style-type: none"> — Apporti di fertilizzanti e altre sostanze ricche di azoto e fosforo (ad esempio provenienti da fonti puntuali e diffuse anche di origine agricola, acquacoltiva, deposizione atmosferica) — Apporti di materiale organico (ad esempio fognature, macinatura, apporti industriali)
Perturbazioni biologiche	<ul style="list-style-type: none"> — Introduzione di patogeni microbici — Introduzione di specie non indigene e traslocazioni — Estrazione selettiva di specie comprese le catture accidentali non bersaglio (ad esempio attività di pesca a scopi commerciali e ricreativi)

Danni fisici

- Cambiamenti dell'interramento (scarichi, dragaggi ...)
- Abrasione (impatto sul fondo causato da pesca commerciale, navigazione...)

Altre perturbazioni fisiche

- Rumore sottomarino
- Rifiuti marini

Contaminazione da sostanze pericolose

- Introduzione di composti sintetici
- Introduzione di sostanze e composti non sintetici

Perturbazioni biologiche

- Introduzione di patogeni microbici
- Introduzione di specie non indigene e traslocazioni

Quali azioni sono prioritarie per l'attuazione della valutazione iniziale?

In questa fase, il MATTM, in attesa della costituzione del Comitato Tecnico, ha chiesto ad ISPRA di effettuare uno studio di pre-fattibilità per la realizzazione della valutazione iniziale.

Tale studio deve individuare le opzioni disponibili, le criticità prevedibili i soggetti coinvolti e le possibili interrelazioni per la realizzazione della valutazione iniziale, segnalando percorsi e risultanze attese nonché stabilendo anche un collegamento con le risorse necessarie.

Lo studio di pre-fattibilità deve costituire la base per realizzare una mappatura dei detentori di dati e informazioni e dei profili problematici di una raccolta ed aggregazione dei dati esistenti nonché del loro aggiornamento e diffusione.



Conclusioni

Visto il ruolo che avrà il **Comitato Tecnico** ai fini dell'applicazione del D.lgs 190/2010 il compito di supporto tecnico-scientifico delle **ARPA, degli Enti ed Istituti di Ricerca** è fondamentale

La linea di attività "**Fioriture algali *Ostreopsis ovata* lungo le coste italiane**" rappresenta uno strumento importantissimo per rispondere alle richieste del D. lgs. 190/2010

Le ARPA *gli Enti e gli Istituti di Ricerca* **producono e detengono dati e informazioni utili ai fini della valutazione** iniziale e costituiscono l'"**expertise**" di base per arrivare a determinare il buono stato ambientale





Grazie per la vostra
attenzione!!



CONCLUSIONI

di Patrizia Borrello e Emanuela Spada, ISPRA

La giornata si è conclusa con la discussione sulle proposte per il proseguimento della Linea di attività ISPRA: "Fioriture algali di *Ostreopsis ovata* lungo le coste italiane". Tale iniziativa, essendo a livello nazionale, offre una base dati fondamentale per le richieste europee e da un quadro ambientale molto importante visto che ormai il monitoraggio si effettua da anni e la banca dati è già abbastanza estesa. Quasi tutte le ARPA presenti hanno confermato il loro impegno a proseguire il monitoraggio di *O. ovata* e dei parametri chimico fisici nonostante la mancanza di risorse economiche garantite in passato dalla L. 979/82 e altre cercheranno di attivare un monitoraggio di sorveglianza in accordo con la propria dirigenza. Per tale motivo molte ARPA effettueranno i campionamenti solo nei punti della balneazione. E' stato ribadito il fatto che attraverso il progetto Reno di ISPRA e la Direttiva Marine Strategy la collaborazione ISPRA ARPA/MATTM dovrà continuare con la speranza di ottenere finanziamenti *ad hoc*. Si è poi discusso se mantenere la metodologia scelta ed adottata fino ad oggi (protocolli operativi APAT/ARPA, 2007 e/o metodo della sedimentazione o di Utermohl) da quasi tutte le ARPA. La decisione è quella di mantenere il metodo classico cercando di individuare almeno una stazione su cui applicare uno dei metodi speditivi. Questi ultimi, al fine di poterli utilizzare in futuro a livello nazionale, devono essere sperimentati maggiormente con la collaborazione degli enti di ricerca che possono mettere a punto i protocolli, standardizzarli e trasmetterli successivamente alle ARPA. E' stato deciso infine di ampliare la finestra temporale dei campionamenti visto che dall'elaborazione dei dati si è riscontrata una netta differenza temporale nelle fioriture tra il mar Tirreno e l'Adriatico.

ATTI

**SINTESI
E CONTRIBUTI**

