

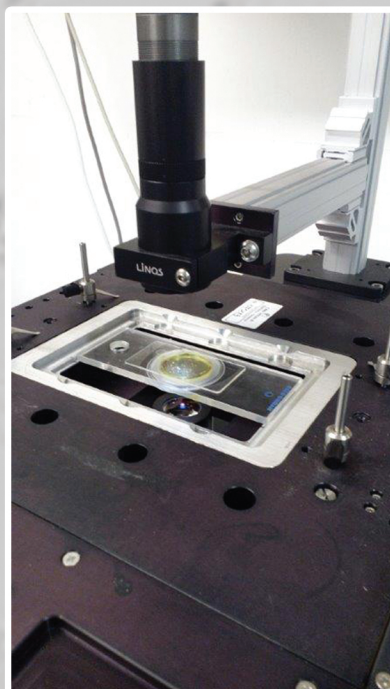
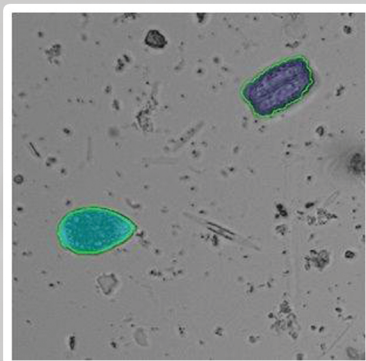
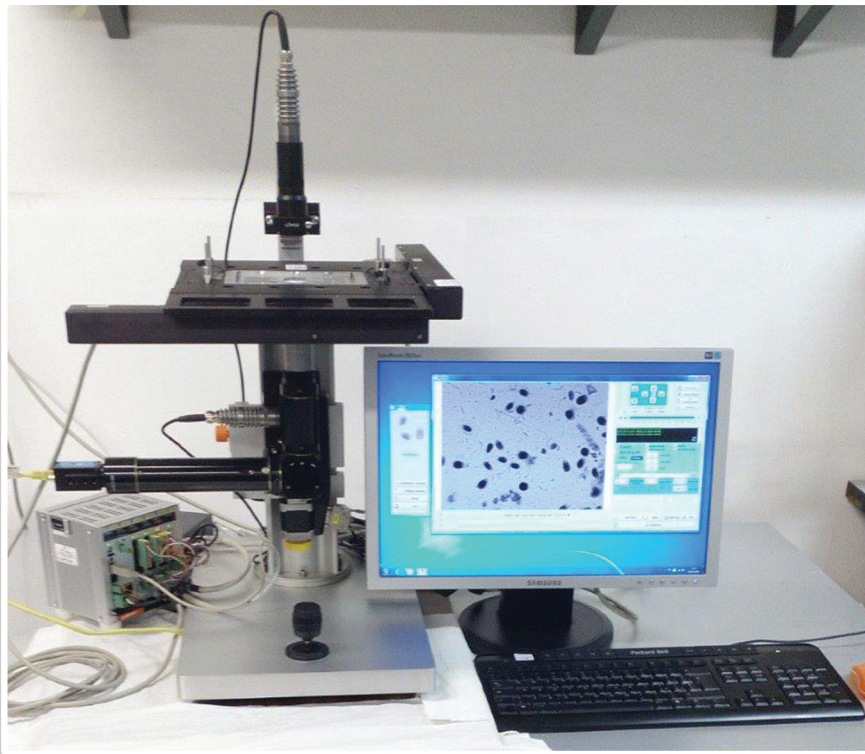


ISPRA

Istituto Superiore per la Protezione
e la Ricerca Ambientale

Valutazione del sistema automatico di identificazione e conteggio di cellule di *Ostreopsis ovata*

Attività di interconfronto del gruppo di lavoro





ISPRA

Istituto Superiore per la Protezione
e la Ricerca Ambientale

Valutazione del sistema automatico di identificazione e conteggio di cellule di *Ostreopsis ovata*

Attività di interconfronto del gruppo di lavoro

Informazioni legali

L'Istituto Superiore per la Protezione e la Ricerca Ambientale (ISPRA), le Agenzie Regionali per la Protezione dell'Ambiente (ARPA), le Agenzie Provinciali per la Protezione dell'Ambiente (APPA) e le persone che agiscono per loro conto non sono responsabili per l'uso che può essere fatto delle informazioni contenute in questo rapporto.

ISPRA - Istituto Superiore per la Protezione e la Ricerca Ambientale
Via Vitaliano Brancati, 48 – 00144 Roma
www.isprambiente.gov.it

ISPRA, Rapporti 263/2017
ISBN 978-88-448-0824-2

Riproduzione autorizzata citando la fonte

Elaborazione grafica

ISPRA

Grafica di copertina: Alessia Marinelli

Foto di copertina: CNR-IBF, Genova

Coordinamento editoriale:

Daria Mazzella

ISPRA – Area Comunicazione

Maggio 2017

A cura di

Patrizia Borrello, Emanuela Spada

ISPRA, Centro Nazionale per la caratterizzazione ambientale e la protezione della fascia costiera e l'oceanografia operativa.

Autori

Patrizia Borrello, Emanuela Spada – ISPRA; Valentina Asnaghi, Mariachiara Chiantore - UNI-GE DISTAV; Massimo Vassalli, Francesca Sbrana - CNR-IBF; Ennio Ottaviani – OnAIR; Valentina Giussani, ARPA Liguria.

Ringraziamenti

Si ringraziano tutti i colleghi delle ARPA costiere che hanno partecipato alle attività del GdL:

Teresa Trabace, Achille Palma, ARPA Basilicata

Marco Lombardo, Maria Grazia Aloi, Melania Dragone, Ottavia Varcasia, ARPA Calabria:

Maria Grazia Aquila, Anna Montanino, Silvestro Lubrano Lavadera, Salvatore De Filippo, ARPA Campania

Maria Venuti, Bruno Zanolin, ARPA Friuli Venezia Giulia

Laura Aguzzi, Ilen Bianco, Gaia Foti, Maurizio Giganti, ARPA Lazio

Rosella Bertolotto, Paolo Moretto, Nunzia Melchiorre, ARPA Liguria

Marina Moroni, Gianluca De Grandis, Sara De Pasqualis, Fabio Principi, ARPA Marche

Concetta Tamburro, ARPA Molise

Nicola Ungaro, Annamaria Pastorelli, Tiziana Di Festa, Emanuela Longo, ARPA Puglia

Antonio Furesi, Valeria Manca, Cristina Russu, ARPA Sardegna

Benedetto Sirchia, Elena Nasta, ARPA Sicilia

Monica Casotti, Simona Scandurra, Vincenza Talesco, Arcangela Pavia, Ornella Bresciani, Gioia Benedettini, ARPA Toscana

Giuliana Sanavio, Giuseppe Sartori, Barbara Dallara, Cristina Masiero, Monica Lionello, ARPA Veneto

Si ringrazia la Schaefer SEE "per aver supportato l'acquisto della piattaforma hardware utilizzata per l'esecuzione delle misure presso ARPAL" e in particolare Paolo Bariani

INDICE

PREMESSA	5
1. IL GDL “VALUTAZIONE DEL SISTEMA AUTOMATICO DI IDENTIFICAZIONE E CONTEGGIO DI CELLULE DI <i>OSTREOPSIS OVATA</i>” (Patrizia Borrello, Emanuela Spada)	6
1.1 Linea di attività ISPRA/ARPA: “Fioriture algali di <i>Ostreopsis ovata</i> lungo le coste italiane”	6
1.2 Il Gruppo di Lavoro	6
1.3 Obiettivi e attività del GdL	7
2. IL PROGETTO ENPI – M3HABS “RISK MONITORING, MODELING AND MITIGATION OF BENTHIC HARMFUL ALGAL BLOOMS ALONG MEDITERRANEAN COASTS” (Mariachiara Chiantore, Valentina Asnaghi)	8
2.1 Alghe tossiche: una minaccia per i bagnanti, una sfida per un progetto europeo	8
Approfondimento: Modello previsionale per le fioriture di <i>Ostreopsis ovata</i>	11
Approfondimento: Il BEDI, Benthic Dinoflagellates Integrator, un nuovo metodo di campionamento	13
3. IL SISTEMA OPTO-ELETTRONICO PER L’IDENTIFICAZIONE E IL CONTEGGIO DI CELLULE DI <i>OSTREOPSIS OVATA</i> (Massimo Vassalli, Ennio Ottaviani)	14
3.1 Il Sistema e le sue parti funzionali	14
3.2 Algoritmo di riconoscimento e sue prestazioni	16
3.3 Il Test Operatore Esperto (TOE) per valutare la variabilità nei conteggi di cellule di <i>Ostreopsis ovata</i>	22
4. IL PROTOCOLLO OPERATIVO (Patrizia Borrello, Emanuela Spada)	27
4.1 Campionamento	27
4.2 Lettura dei campioni	28
5. RISULTATI DELLE LETTURE MANUALI E AUTOMATIZZATE (Francesca Sbrana, Valentina Giussani)	29
5.1 Campioni ARPA costiere	29
5.2 Campioni ARPA Liguria	41
6. CONCLUSIONI (Patrizia Borrello, Emanuela Spada, Mariachiara Chiantore, Valentina Asnaghi, Massimo Vassalli, Francesca Sbrana, Valentina Giussani, Ennio Ottaviani)	44
7. BIBLIOGRAFIA	45

PREMESSA

Il 12 e 13 dicembre 2016 sono stati presentati i risultati ottenuti dall'attività di interconfronto del Gruppo di Lavoro del Sistema Nazionale per la Protezione dell'Ambiente (SNPA), coordinato da ISPRA, con la collaborazione dell'Università di Genova - Dipartimento di Scienze della Terra dell'Ambiente e della Vita (DISTAV) e l'Istituto di Biofisica del Consiglio Nazionale delle Ricerche di Genova (CNR-IBF).

Il GdL in linea con gli obiettivi della L.132/2016 istitutiva del SNPA, è stato costituito a giugno 2016 e alle attività hanno partecipato 14 Agenzie costiere con 45 operatori esperti.

Le attività per la "Valutazione del sistema automatico di identificazione e conteggio di cellule di *Ostreopsis ovata*" sono state programmate nell'ambito del monitoraggio nazionale di *Ostreopsis ovata* nella stagione estiva 2016.

Le Agenzie hanno applicato, nel periodo di monitoraggio giugno-settembre 2016, un Protocollo di interconfronto per la raccolta, trattamento ed analisi di campioni di acqua e macroalga per la ricerca di cellule di *Ostreopsis ovata*.

I campioni sono stati sottoposti a lettura manuale presso ogni Agenzia e a lettura automatizzata con il sistema opto-elettronico presso il CNR-IBF di Genova.

Questo Rapporto è il prodotto finale dell'attività e dei risultati ottenuti.

1. IL GDL “VALUTAZIONE DEL SISTEMA AUTOMATICO DI IDENTIFICAZIONE E CONTEGGIO DI CELLULE DI *OSTREOPSIS OVATA*”

1.1 Linea di attività ISPRA/ARPA: “Fioriture algali di *Ostreopsis ovata* lungo le coste italiane”

L’attività di ISPRA su *Ostreopsis ovata* ha avuto origine nel 2006, dopo il verificarsi dei numerosi casi di intossicazione umana (225) sul litorale genovese (luglio 2005) in concomitanza della presenza massiccia nelle acque costiere di *Ostreopsis ovata*, rilevata dall’Agenzia Regionale per la Protezione dell’Ambiente Ligure (ARPAL) a seguito di un monitoraggio specifico. Le successive segnalazioni di quest’alga in altre regioni italiane e le sue implicazioni in ambito sanitario e ambientale hanno ben presto evidenziato la necessità di una strategia nazionale per affrontare l’emergenza sanitaria e per caratterizzare questo nuovo fenomeno ambientale. Da qui l’istituzione del tavolo tecnico presso il Ministero della Salute che ha portato all’elaborazione delle “Linee guida per la gestione del rischio associato alle fioriture di *O. ovata*” e alla emanazione della Direttiva “Programma alghe tossiche” del Ministero dell’Ambiente (n. GAB/2006/6741/B01) che ha dato inizio alla linea di lavoro ISPRA/Agenzie ambientali (ARPA): “Fioriture algali di *Ostreopsis ovata* lungo le coste italiane”, per “individuare elementi per una strategia comune nazionale di campionamento, analisi, monitoraggio, sorveglianza, informazione, comunicazione e gestione del fenomeno alghe tossiche”.

L’attività è iniziata con la formazione degli operatori ARPA al monitoraggio della microalga e alla gestione del fenomeno, con l’elaborazione e la condivisione dei piani di monitoraggio, di informazione/comunicazione e di gestione riportati nei “Protocolli operativi” (ISPRA, 2007; ISPRA, Quaderni Ricerca Marina n. 5/2012). Tali metodi sono stati adottati nelle attività di monitoraggio dapprima ad integrazione del monitoraggio marino costiero già esistente (D.Lgs 152/99, D.P.R. 470/82, L. 979/82) e poi dal 2010, in ottemperanza all’Art. 3 del DM 30 marzo 2010 (Ministero della Salute) per la gestione della qualità delle acque di balneazione. A tal fine nel DM citato è stato assunto come valore di riferimento la concentrazione di 10000 cell/l e il suo superamento, ancora oggi, determina l’adozione di una serie di misure di gestione a tutela dei bagnanti e dei cittadini che comprende anche il divieto di balneazione.

I dati del monitoraggio delle Agenzie ambientali hanno evidenziato ad oggi la presenza di *Ostreopsis ovata* in tutte le regioni costiere eccetto che in Emilia Romagna, Molise e Veneto (in Abruzzo solo nel 2007 e 2013); tali dati vengono diffusi attraverso Rapporti annuali ISPRA/ARPA (ISPRA, 127/2010, 148/2011, 173/2012, 188/2013, 211/2014, 232/2015, 253/2016), sul sito dell’Istituto, ove è presente anche una pagina di lavoro dedicata e nell’Annuario dei dati ambientali come specifico indicatore.

Con il Programma di Ricerca ISPRA (finanziato dal MATTM), “*Ostreopsis ovata* e *Ostreopsis* spp.: nuovi rischi di tossicità microalgale nei mari italiani” (2008-2010), sono stati approfonditi gli aspetti relativi in particolare alla biologia, ecologia, ecofisiologia e genetica di tali microalghe, oltre alla caratterizzazione delle tossine prodotte. Il progetto ha coinvolto Università, Enti di Ricerca nazionali ed alcune ARPA.

Le informazioni scaturite dal monitoraggio e dagli studi scientifici, sono state e sono utilizzate per altre attività istituzionali (es. Strategia Marina 2008/56/CE; Accordo RAMOGE; Protocolli operativi; Linee guida (Rapporto ISTISAN 14/19)).

1.2 Il Gruppo di Lavoro

Nell’ambito del Progetto M3-HABs “Risk Monitoring, Modeling and Mitigation of Harmful Algal Blooms along Benthic Mediterranean Coasts” (Cap.2), finanziato nell’ambito del programma ENPI-CBCMED, a cui ISPRA ha partecipato come Partner associato, e specificamente del Work-package 4 “Optoelectronic system and algorithm for cell identification and counting”, è stato sviluppato un apposito software capace di identificare immagini 2D e 3D di *Ostreopsis ovata*, integrato con un sistema di conteggio automatico delle cellule.

Tale sistema, descritto nel Cap. 3, potrebbe rappresentare un valido supporto alle attività di monitoraggio delle ARPA nel semplificare e velocizzare le operazioni di conteggio ed identificazione delle cellule di *Ostreopsis ovata*. Ciò considerato, ISPRA, coinvolto dal Coordinatore del Progetto M3-HABs (CONISMA - Università di Genova) in collaborazione con l’Università di Genova (DISTAV) e il CNR di Genova (Istituto di Biofisica), ha istituito un GdL “Valutazione del sistema automatico di identificazione e conteggio di cellule di *Ostreopsis ovata*” con le ARPA costiere,

progetto teso a realizzare un interconfronto per la valutazione della performance del sistema opto-elettronico. Tale sistema qualora non presentasse evidenti criticità metodologiche potrebbe essere esteso ad altre specie microalgali diverse da *O. ovata* ed infine essere inserito nei Protocolli ISPRA come ulteriore metodo di analisi quali-quantitativa.

1.3 Obiettivi e attività del GdL

Il GdL in linea con gli obiettivi della L.132/2016 istitutiva del SNPA, è stato costituito a giugno 2016 e alle attività, descritte in dettaglio nelle varie sezioni di questo rapporto, hanno partecipato 14 Agenzie costiere con i loro maggiori esperti sulla tematica “*Ostreopsis*”.

ISPRA è stata supportata nel coordinamento dal DISTAV e dal CNR-IBF.

A tutte le ARPA che hanno partecipato è stato chiesto di raccogliere, durante il monitoraggio 2016, previsto per la sorveglianza nazionale delle fioriture algali, alcuni campioni di acqua, macroalghe o altro substrato, nei punti scelti tra quelli della rete di monitoraggio regionale, che negli anni sono stati interessati da fioriture di *O. ovata*.

Prima dell’inizio delle attività è stato condiviso un protocollo operativo tratto e modificato dall’“Intercalibration counting protocol” sviluppato nell’ambito del Progetto M3-HABs per il prelievo, il trattamento e la preparazione dei campioni alle successive fasi analitiche.

Ciascuna Agenzia coinvolta ha poi effettuato la lettura dei preparati al microscopio ottico come di routine, mentre aliquote degli stessi campioni sono state separate e inviate al CNR per essere contate in modo automatico dal sistema opto-elettronico. Il Protocollo operativo è descritto in dettaglio nel Cap. 4 di questo documento.

I risultati del progetto sono poi stati presentati e discussi a dicembre 2016 in un workshop dedicato che si è tenuto nella sede ISPRA di Roma e al quale hanno partecipato tutti i soggetti coinvolti nell’attività. Il workshop ha previsto anche una dimostrazione del funzionamento dello strumento con sessione “provami” per sperimentare direttamente il dispositivo.

2. IL PROGETTO ENPI M3-HABS “RISK MONITORING, MODELING AND MITIGATION OF BENTHIC HARMFUL ALGAL BLOOMS ALONG MEDITERRANEAN COASTS

2.1 Alghe tossiche: una minaccia per i bagnanti, una sfida per un progetto europeo

2.1.1 Le finalità del progetto

Università, istituti di ricerca, agenzie regionali per l’ambiente e imprese tecnologiche dislocate lungo le coste del Mediterraneo (Fig. 2.1) si sono riunite, sotto il cappello di un progetto finanziato dall’Unione Europea (programma ENPI-CBCMED), con lo scopo di ridurre i rischi causati da microalghe bentoniche tossiche, ed in particolare *Ostreopsis*. Il programma europeo ENPI-CBCMED è mirato a consolidare la collaborazione tra i Paesi dell’Unione Europea e Paesi partner che si trovano sulle sponde Sud del Mediterraneo

Il progetto M3-HABS ha avuto inizio nel gennaio 2014 e fine nel dicembre 2015, con lo scopo di accrescere il livello di consapevolezza e implementare le misure atte a gestire le fioriture di microalghe bentoniche tossiche nel bacino mediterraneo, attraverso lo sviluppo di procedure di monitoraggio comuni, metodi di conteggio automatizzati e modelli predittivi.

M3-HABS è un progetto che ha previsto il coordinamento da parte del CoNISMa (ULR di Genova, Ancona ed Urbino), il coinvolgimento del CNR e di ARPAL, nonché di due imprese italiane (OnAIR e DHI Italia), di partner francesi, Laboratoire d’Océanographie de Villefranche (LOV), Université de Nice Sophia-Antipolis (UNS), tunisini, National Institute of Marine Sciences and Technologies (INSTM) e libanesi, National Council for Scientific Research (CNRS).

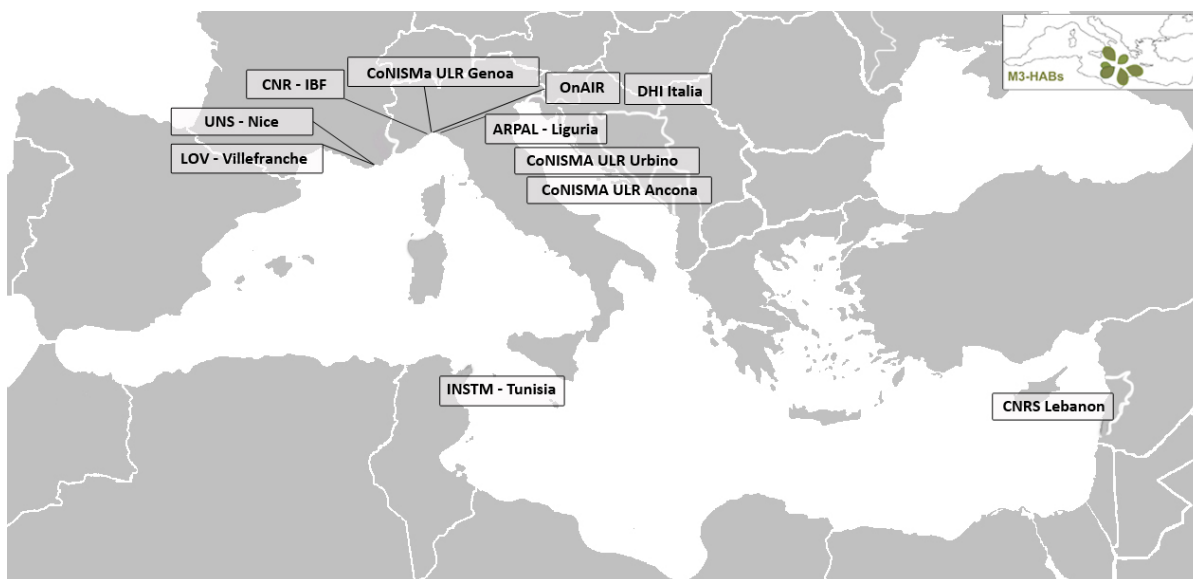


Figura 2.1 – Distribuzione dei partner del progetto M3-HABS

2.1.2 L’implementazione del progetto

Le iniziative che sono state messe in atto hanno riguardato:

1. Sviluppare nuove tecnologie per l’identificazione ed il conteggio automatizzato delle cellule microalgali
2. Elaborare protocolli comuni e ottimizzati per il monitoraggio di *Ostreopsis* e delle variabili ambientali correlate
3. Formulare modelli previsionali basati su variabili ambientali facilmente misurabili
4. Produrre una maggiore consapevolezza dei rischi associati alle fioriture di *Ostreopsis* spp. e diffondere adeguate misure di cautela

Il progetto si è avvalso di numerosi Partner associati, tra cui ISPRA, Agenzie regionali per l’ambiente, municipalità e istituti di ricerca, che hanno potuto usufruire degli strumenti messi a punto mediante il progetto per effettuare monitoraggi ed indagini più efficaci e per fornire eventuali allerte in maniera più tempestiva ed affidabile.

Il progetto si è articolato in 7 Work-packages:

WP1: Coordinamento e Gestione (CoNISMa, Italia)

WP2: Comunicazione (CNRS, Libano)

WP3: Capitalizzazione (INSTM, Tunisia)

WP4: Sistema opto-elettronico e algoritmo per identificazione e conteggio automatico delle cellule (CNR-IBF, Italia)

WP5: Strumento predittivo delle fioriture di *Ostreopsis* (CoNISMa, Italia)

WP6: Strategie di campionamento intercalibrate e protocolli comuni (LOV, Francia)

WP7: Strategie comuni per la valutazione e gestione del rischio (ARPAL, Italia)

2.1.3 Principali risultati

Nel corso del progetto sono state messe a punto due differenti metodologie di identificazione e conteggio automatizzato di *Ostreopsis ovata*: un metodo bio-molecolare innovativo (qPCR based assay, Casabianca *et al.*, 2016) e lo strumento opto-elettronico automatico, oggetto del presente Quaderno. Queste metodologie sono state intercalibrate, confrontandole anche con il conteggio tradizionale effettuato dall'operatore esperto al microscopio ottico, al fine di valutarne l'affidabilità in termini di identificazione e conteggio (Vassalli *et al.*, *submitted*), producendo risultati incoraggianti.

Un ulteriore prodotto del progetto M3-HABs sono i protocolli comuni, resi disponibili on-line sul sito web del progetto (www.m3-habs.net), che riportano tutte le buone pratiche di raccolta dei campioni, trattamento degli stessi in laboratorio e preparazione dei vetrini per il conteggio. I protocolli comuni sono stati discussi durante due sessioni di intercalibrazione tra i partner del progetto, aperte anche ad esperti esterni (*Open Groups*), e le metodologie proposte sono state insegnate a ricercatori, studenti e operatori del settore durante la prima *Summer School*, tenutasi a Batroun, Libano, nel giugno 2014.

Tra le tecniche di raccolta, oltre all'ottimizzazione delle tecniche tradizionalmente utilizzate per il campionamento di microalghe bentoniche, sono state proposte, testate e validate due metodologie alternative: i) l'utilizzo di substrati artificiali, per i quali sono stati messi a punto la tipologia e dimensione del materiale e il tempo di immersione ottimale, e ii) lo strumento BEDI, *Benthic Dinoflagellates Integrator*, in grado di raccogliere un campione "integrato" di microalghe presenti sul substrato ed in colonna d'acqua (vedi box di approfondimento).

Attraverso l'utilizzo di protocolli comuni e intercalibrati, il progetto M3-HABs ha garantito campionamenti comparabili nello spazio e nel tempo in diverse aree del Mar Mediterraneo interessate dal fenomeno della proliferazione di *Ostreopsis* spp., che sono stati organizzati in dataset omogenei e permetteranno di mettere in luce le differenze nelle dinamiche delle fioriture a scala di bacino Mediterraneo (Fig. 2.2).

Lo strumento previsionale per i bloom di *Ostreopsis ovata*, sviluppato per la zona pilota del progetto (Genova), permette di prevedere il numero di cellule attese in mare e la probabilità di superare la soglia di rischio, in funzione di variabili ambientali facilmente misurabili o prevedibili tramite modellistica meteo-marina (vedi box di approfondimento). L'esperienza acquisita nel corso del progetto relativamente alla zona pilota sarà la base per consentire ai Paesi partner di sviluppare un simile strumento previsionale basato sui dati raccolti in maniera omogenea grazie ai protocolli comuni e variabili meteo-marine facilmente reperibili. L'obiettivo della seconda *Summer School* del progetto, svoltasi a Tunisi nel maggio 2015, è stato proprio quello di istruire ricercatori, studenti e operatori provenienti da tutti i Paesi partner sulle tecniche di modellizzazione e investigazione di dataset meteo-marini.

La gestione del rischio associato agli eventi di fioritura di *O. ovata* è stata affrontata mediante la produzione di specifiche linee guida, pubblicate e messe a disposizione su sito web del progetto (www.m3-habs.net), e la produzione e distribuzione di materiale informativo, come flyer e brochure distribuite ad ogni evento di disseminazione, pannelli esplicativi posizionati lungo le coste e all'interno di strutture di ricerca e turistiche.

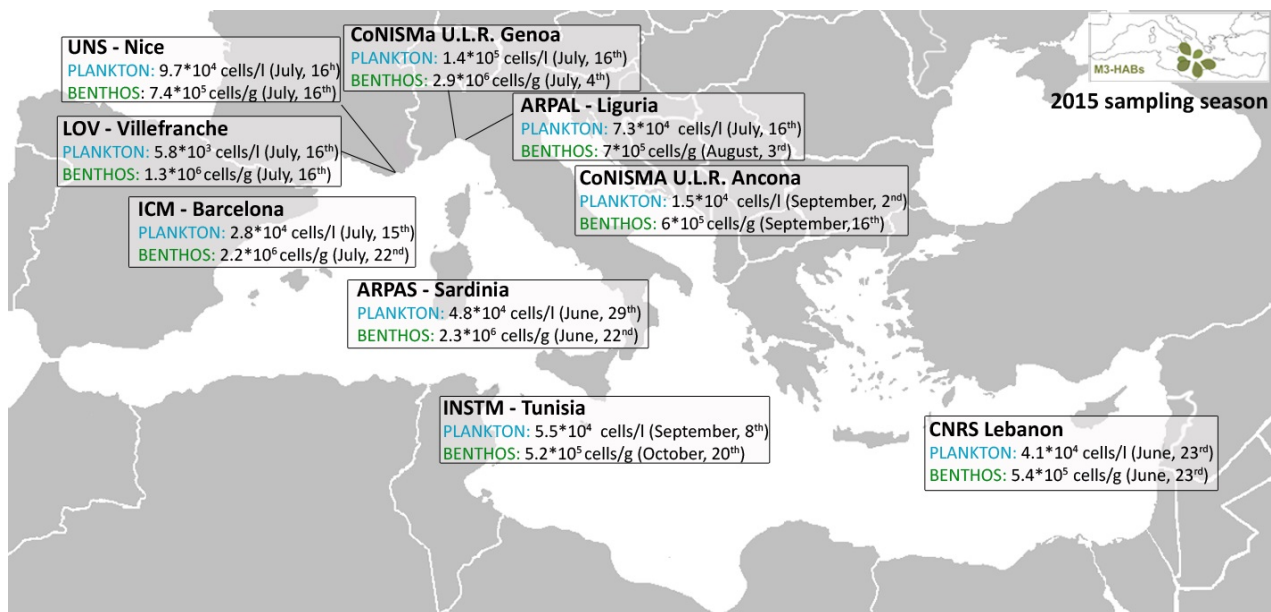
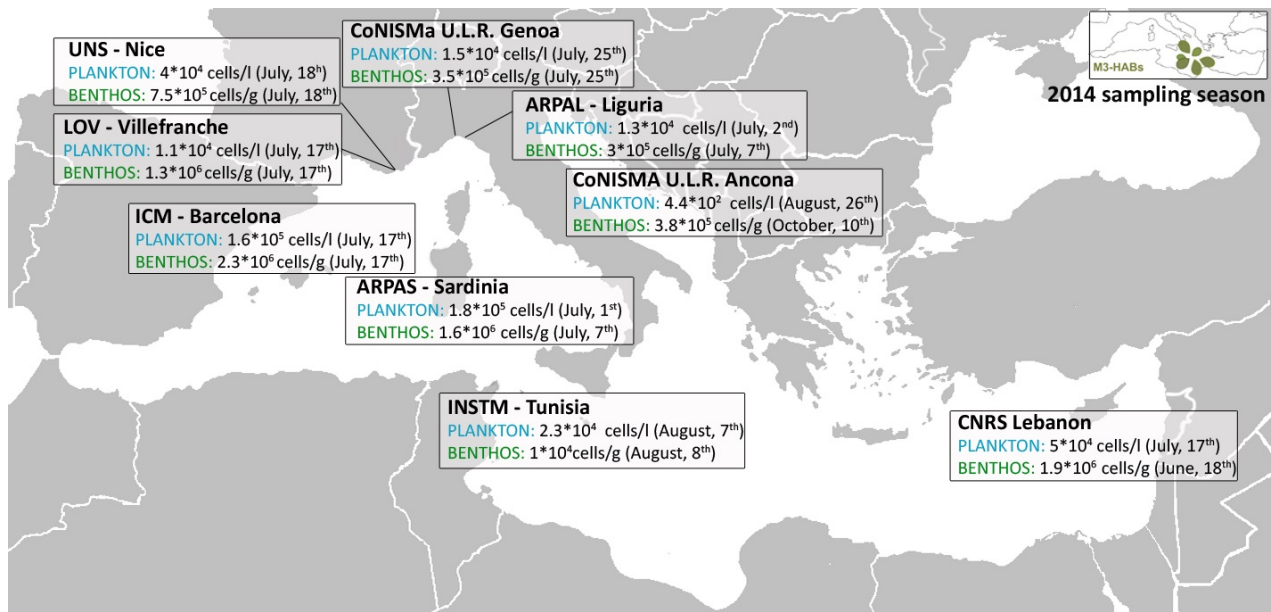


Figura 2.2 – Concentrazioni massime di *Ostreopsis* spp. nell'acqua (Plankton) e sulle macroalghe (Benthos) rilevate durante le stagioni estive 2014 e 2015 nell'ambito del progetto M3-HABs

APPROFONDIMENTO: MODELLO PREVISIONALE PER LE FIORITURE DI *OSTREOPSIS*

Le dinamiche di fioritura di *Ostreopsis* a diverse scale spaziali e temporali ed il ruolo dei driver ambientali sono complicate e contraddittorie, con differenze rilevanti a scala di bacino (Mangialajo *et al.*, 2011). Per quanto riguarda il Mediterraneo nord-occidentale, un modello descrittivo degli eventi di fioritura di *O. ovata* era già stato prodotto per il Mar Ligure (Asnaghi *et al.*, 2012), evidenziando in particolare un ruolo rilevante della temperatura dell'acqua di mare e dell'idrodinamismo. In tale studio, la percentuale di variabilità spiegata da un numero di driver ambientali relativamente piccolo risultava cospicua (circa l'80%), mettendo in evidenza la potenzialità dell'approccio modellistico per l'implementazione di uno strumento previsionale degli eventi di fioritura a partire da un limitato numero di variabili meteorologiche, facilmente disponibili e reperibili.

Questi risultati preliminari hanno aperto la strada per la costruzione di un modello predittivo affidabile, elaborato nell'ambito del progetto M3-HABs mediante una collaborazione tra Università di Genova, OnAIR e DHI Italia, che potrebbe essere utilizzato dagli enti gestori per una più mirata pianificazione dei monitoraggi e per fornire allerte tempestive, in un'ottica di prevenzione del rischio per la salute pubblica, per l'ambiente e per le attività economiche (Asnaghi *et al.*, 2017).

A partire dal 2006, anno in cui lungo le coste liguri furono registrate concentrazioni di *Ostreopsis ovata* molto elevate, che portarono anche alla chiusura della balneazione in alcune spiagge cittadine, ARPA Liguria e DiSTAV - Università di Genova - effettuano un monitoraggio regolare in diversi siti di campionamento lungo la costa, raccogliendo dati di abbondanza della microalga in acqua e sulle macroalghe, insieme alle variabili ambientali di contorno. Un esteso dataset, dal 2006 al 2014, era quindi a disposizione per la costruzione del modello previsionale per la provincia di Genova, scelta come zona pilota del progetto M3-HABs.

Nonostante *O. ovata* sia una dinoflagellata bentonica che prolifera sul substrato, e preferenzialmente sulle macroalghe, come variabile di risposta del modello è stata utilizzata la concentrazione in acqua di mare (cell/l), in quanto questa matrice è quella che maggiormente convoglia gli effetti tossici per la salute umana, tramite ingestione, contatto con la pelle o inalazione di goccioline presenti nell'aerosol. Inoltre, le soglie di allerta attualmente previste dalle linee guida dell'Istituto Superiore di Sanità (Rapporti ISTISAN 14/19) e dal decreto legislativo sulla gestione della qualità delle acque di balneazione (D.Lgs 116/2008, D.M. 30 marzo 2010) fanno riferimento solo alle concentrazioni in acqua.

Volendo costruire un modello previsionale totalmente indipendente dalla raccolta di campioni o misurazione diretta di variabili ambientali, si è deciso di utilizzare come input del modello delle variabili ambientali facilmente ottenibili da modelli previsionali meteo-marini. Sono state utilizzate le seguenti variabili predittive:

- Temperatura dell'acqua (°C)
- Temperatura dell'aria (°C)
- Salinità
- Pressione atmosferica
- Velocità e direzione del vento

Inoltre, tra le variabili predittive, sono stati tenuti in considerazione anche il giorno dell'anno, il numero di giorni precedenti la data di campionamento in cui la temperatura dell'acqua aveva superato i 24°C (essendo nota per il Mar Ligure una soglia intorno ai 24-26°C al di sopra della quale i bloom sono stimolati; Mangialajo *et al.*, 2008; Asnaghi *et al.*, 2012) e il numero di giorni precedenti in cui la temperatura dell'aria aveva superato i 25°C.

Sono stati testati diversi approcci modellistici, ed il più promettente, soprattutto nell'ottica di produrre uno strumento di tipo gestionale, è risultato essere il Quantile Random Forests (QRF; Meinshausen, 2006). Questo approccio è basato sul metodo Random Forests (Breiman, 2001) che produce un insieme di alberi tramite osservazioni indipendenti; per la formazione di ogni albero viene utilizzato solo un sotto-campione dei dati ("out-of-bag"). Inoltre, solo un sottoinsieme casuale di variabili predittive è considerato per la selezione del punto di divisione ad ogni nodo. Il QRF consente una intera distribuzione dei valori previsti generata per ogni combinazione di variabili predittive. Questo tipo di approccio è particolarmente utile per modellare relazioni complesse tra le variabili predittive e la variabile di risposta, senza effettuare alcuna assunzione sulla loro distribuzione di probabilità e sul tipo di rapporto che le lega.

Il modello così ottenuto è risultato essere in grado di predire accuratamente il numero di cellule attese in acqua in funzione delle variabili ambientali utilizzate (coefficiente di Pearson = 0.66, p-value <0.001) ed ha messo in evidenza, in particolare, l'importanza del giorno dell'anno e della

temperatura dell'acqua, seguite dalla salinità, nel determinare le concentrazioni di *O. ovata*. Il modello è stato quindi validato con i dati di abbondanza di *O. ovata* in acqua di mare raccolti sul campo nell'estate del 2015 e risultati soddisfacenti sono stati ottenuti per il quantile 0.83 (in colore viola in Fig. 2.3), che è stato in grado di fornire un'allerta (*real bloom alert*) in tutti e tre i casi in cui era stato superato il valore soglia nel periodo considerato, produrre un numero limitato di falsi allarmi (*false bloom alert*, solo in 5 casi) e non trascurare alcun superamento della soglia (*undetected bloom*).

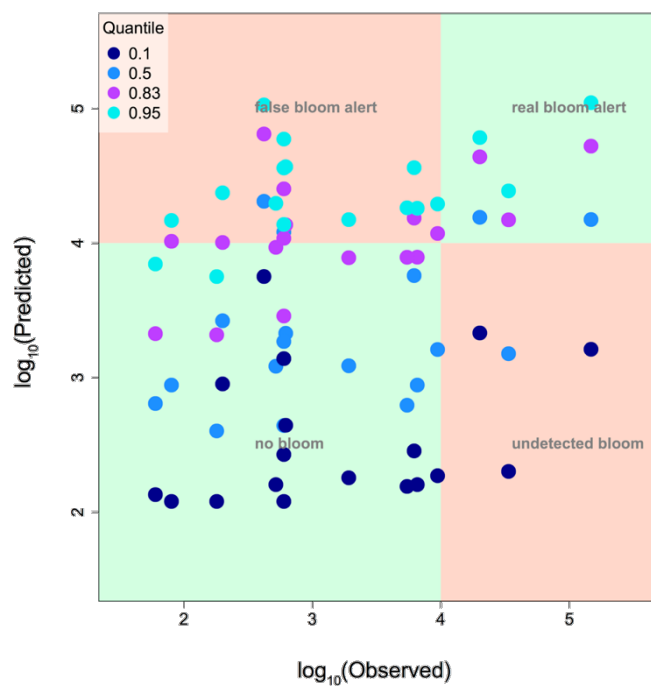


Figura 2.3 – Scatterplot delle concentrazioni di *Ostreopsis ovata* osservate durante l'estate 2015 e predette ai quantili 0.1, 0.5, 0.83 e 0.95 (dati log-trasformati). Le due zone rosse si riferiscono a previsioni errate (falsi allarmi e fioriture non rilevate)

L'approccio proposto, permettendo di scegliere il quantile al quale effettuare le previsioni, presenta una grande flessibilità ed è particolarmente adatto in un'ottica gestionale, in quanto permette di scegliere il livello di rischio che ci si vuole assumere in termini di trascurare un evento di bloom o, al contrario, fornire un falso allarme. Infatti, come si può notare dalla figura 2.3, i quantili più bassi (e.g. quantile 0.1) tendono a sottostimare le concentrazioni e quindi a trascurare gli eventi di bloom, ma allo stesso tempo generalmente non forniscono falsi allarmi. Al contrario, quantili più alti (e.g. quantile 0.95) sono in grado di identificare sempre i bloom, ma forniscono anche molti falsi allarmi. Lo strumento previsionale prodotto nell'ambito del progetto M3-HABs risulta quindi essere particolarmente utile per gli enti gestori, come le ARPA costiere incaricate del monitoraggio delle acque di balneazione e di prendere decisioni per la tutela della salute pubblica, per pianificare e ottimizzare, nello spazio e nel tempo, i campionamenti e per fornire allerte tempestive in caso di reale rischio.

APPROFONDIMENTO: IL BEDI, *BENTHIC DINOFLAGELLATES INTEGRATOR*, UN NUOVO METODO DI CAMPIONAMENTO

Uno degli aspetti più controversi relativi alle metodologie di campionamento di microalghe bentoniche, come la dinoflagellata *O. ovata*, è la scelta della matrice da prendere in considerazione per quantificarne le abbondanze. Generalmente si seguono i protocolli previsti per il fitoplancton, che prevedono la raccolta di campioni di acqua di mare, che tuttavia nel caso delle microalghe bentoniche sono spesso affiancati dalla raccolta di substrati, come macroalghe, sassi e conchiglie, su cui esse in effetti proliferano. La matrice più opportuna da campionare sarebbe pertanto il substrato, rappresentando la sorgente di microalghe che poi si troveranno sospese in acqua, laddove andranno a porre maggiormente a rischio la salute umana, in quanto possono veicolare la tossina per contatto diretto con la pelle, per ingestione o inalazione degli aerosol. In quest'ottica è evidente l'importanza di raccogliere un campione che rappresenti l'effettiva potenzialità che un substrato ha di produrre e mettere in sospensione microalghe bentoniche.

Lo strumento BEDI, *Benthic Dinoflagellates Integrator* (Mangialajo *et al.*, in press; Fig. 2.4), ideato nell'ambito del progetto M3-HABs, permette la raccolta di questa tipologia di campione in maniera non distruttiva su una superficie ed un volume noti.

Lo strumento ideato e testato nel corso del progetto è costituito da un cilindro cavo di alluminio aperto sui due estremi, alto 70 cm e con diametro di 25 cm, con alla base un bordo di gomma che consente di aderire al substrato.

Lo strumento deve essere posizionato sul fondale roccioso, ad una profondità di circa 50 cm. Si procede quindi prendendo nota dell'altezza dell'acqua all'interno del cilindro e mescolando vigorosamente per 5 secondi il volume d'acqua contenuto nel cilindro, in modo da creare una turbolenza tale da favorire il distacco delle microalghe epifite. Si raccoglie quindi il campione "integrato" (in quanto contenente le cellule che erano già in sospensione più quelle di cui si è favorito il distacco dal substrato) in un barattolo da 250 ml ad una profondità di circa 20 cm all'interno del cilindro.

Oltre alla possibilità di raccogliere un campione integrato, questo metodo ha il vantaggio di essere non distruttivo (in quanto non comporta il prelievo di talli di macroalghe) e indipendente dalla specificità della macroalga campionata, rendendo confrontabili anche siti molto diversi tra loro in termini di habitat. Inoltre è un metodo più conservativo, che riduce la variabilità spaziale generalmente osservata anche tra stazioni a breve distanza tra loro.

Una volta raccolto, senza la necessità di alcun risciacquo, il campione viene fissato per l'identificazione ed il conteggio delle microalghe, che viene eseguito con supporti Sedgewick-Rafter, con un normale microscopio ottico. I campioni raccolti sono molto puliti e consentono una buona lettura anche tramite lo strumento opto-elettronico.

Per queste ragioni, il BEDI rappresenta un ottimo strumento di campionamento particolarmente nell'ottica di monitoraggi su larga scala, come quelli svolti dalle agenzie regionali per l'ambiente.

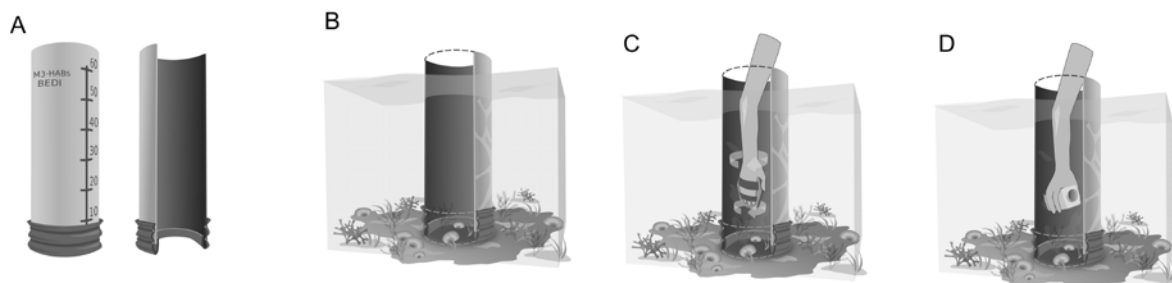


Figura 2.4 – Schema del *Benthic Dinoflagellates Integrator* (BEDI) e sua applicazione su un basso fondale (circa 50 cm di profondità); a) BEDI (70 cm in altezza; 25 cm di diametro); b) posizionamento sul fondale per il campionamento; c) risospensione ed omogeneizzazione delle cellule del biofilm nella colonna d'acqua attraverso rimescolamento; d) raccolta del campione d'acqua con un barattolo di plastica da 250 ml (da Mangialajo *et al.*, in press)

3. IL SISTEMA OPTO-ELETTRONICO PER L'IDENTIFICAZIONE E IL CONTEGGIO DI CELLULE DI *OSTREOPSIS OVATA*

Il sistema di riconoscimento ha come scopo la determinazione automatica della concentrazione di *O. ovata* nel campione di acqua di mare in esame (Sbrana *et al.*, 2017). Il campionamento, trattamento e sedimentazione del campione vengono eseguiti sulla base dei protocolli standard di riferimento e la procedura automatica si sviluppa a valle di ciò. In particolare, il processo di utilizzo della macchina prevede due fasi distinte che riguardano l'acquisizione automatica (Par. 3.1) e l'analisi delle immagini tramite algoritmo addestrato di riconoscimento (Par. 3.2). La validazione del sistema è stata effettuata sia confrontando i risultati finali dello strumento con quelli di un operatore esperto a partire da due aliquote di acqua ottenute dallo stesso campione, sia andando a confrontare direttamente l'efficienza di riconoscimento tramite un test sulle immagini digitali selezionate, denominato Test Operatore Esperto (TOE), descritto nel paragrafo 3.3.

Per la validazione è stato utilizzato il dispositivo OVMeter (Ostreopsis oVata Meter), che implementa tali strategie ed è stato sviluppato in via prototipale nell'ambito del progetto M3-HABs e del progetto regionale "Sistema automatico di conteggio cellulare per il Mar Ligure ed analisi statistica della correlazione con le variabili ambientali" (Programma attuativo regionale FAS 2007-2013 "Programma triennale per la ricerca e l'innovazione: progetti integrati ad alta tecnologia")

3.1 Il Sistema e le sue parti funzionali

Il sistema di acquisizione si basa su una piattaforma di microscopia ottica in luce trasmessa e prevede le seguenti componenti:

1. Obiettivo
2. Telecamera
3. Asse motorizzato Z
4. Tavola di movimentazione XY con portacampioni
5. Illuminatore
6. Controller di posizionamento
7. Software di gestione

Di seguito vengono descritti in dettaglio i singoli componenti. Di principio, un qualunque sistema di microscopia che soddisfi i requisiti tecnici elencati e dettagliati è idoneo all'implementazione del processo di conta automatica oggetto della sperimentazione; in Fig. 3.1 è riportata una foto di uno dei dispositivi hardware utilizzati durante le misure dell'estate 2016, basato su componenti personalizzati e integrati presso il laboratorio IBF-CNR. Nella foto sono evidenziati i principali componenti di cui al precedente elenco.

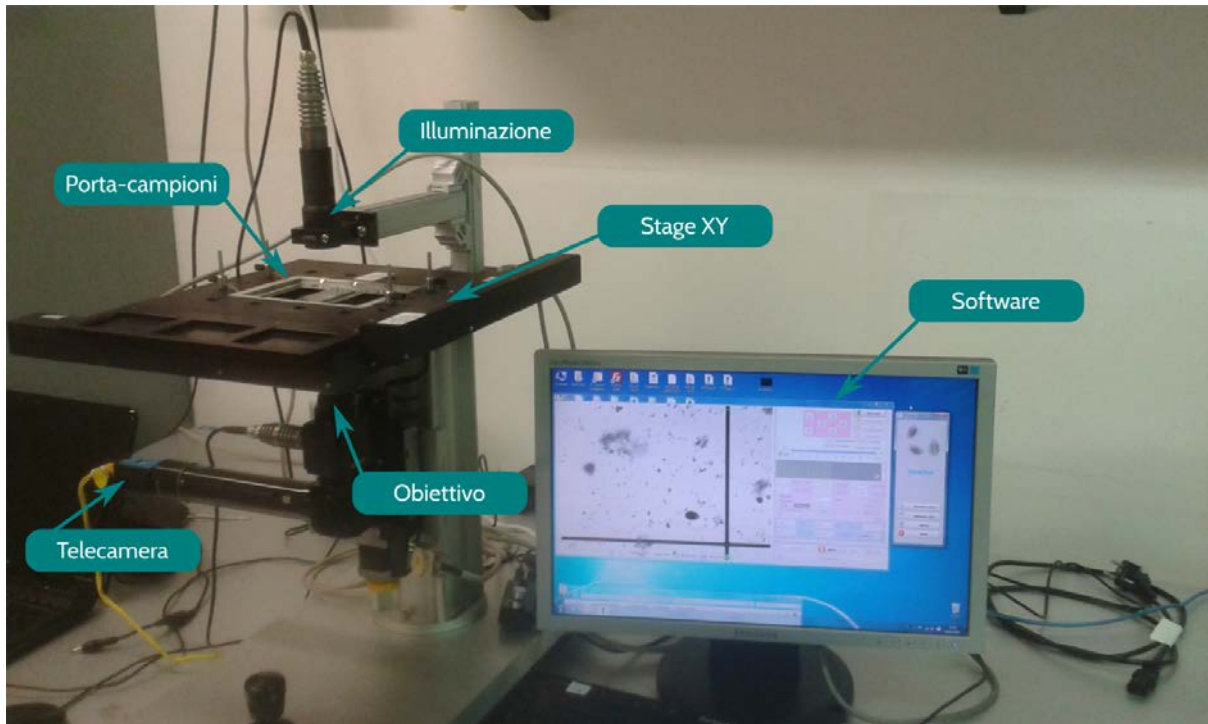


Figura 3.1 – Principali componenti del Sistema Opto-elettronico di riconoscimento e conteggio di cellule di *Ostreopsis ovata* utilizzato durante le misure dell'estate 2016.

3.1.1 Obiettivo

Il sistema è stato progettato per alloggiare un solo obiettivo in quanto la procedura di acquisizione delle immagini, completamente automatica, non prevede il cambio ingrandimento. L'obiettivo deve essere scelto tenendo conto della risoluzione richiesta per ottenere una buona descrizione delle microalge in esame. La risoluzione fisica del sistema (che non può essere migliorata digitalmente) è data dalle caratteristiche dell'obiettivo e, in particolare, dalla sua apertura numerica (N.A.), secondo una relazione tale per cui la risoluzione spaziale D è data da:

$$D = 0.61 \lambda / \text{N.A.}$$

in cui λ è la lunghezza d'onda della luce. Utilizzando come riferimento una luce verde sui 600nm di lunghezza d'onda, per ottenere una risoluzione dell'ordine del micrometro, è necessaria una apertura numerica di almeno 0.4. L'altro parametro di cui tenere conto nella scelta dell'obiettivo è l'ingrandimento che va scelto il più piccolo possibile, allo scopo di massimizzare il campo di vista. Nell'ambito del progetto è stato scelto uno speciale obiettivo 10x della Optem ad alta risoluzione con apertura numerica 0.45.

3.1.2 Telecamera

Il dispositivo è dotato di una telecamera digitale per l'acquisizione delle immagini. L'obiettivo scelto dà luogo, su un sensore da circa mezzo pollice, a un campo di vista di poco meno di un millimetro. Per garantire di non ridurre digitalmente la risoluzione, è necessario avere un sensore da almeno 1M pixel, meglio se almeno circa 2M pixels. Nell'ambito del progetto è stata scelta una camera con sensore monocromatico da 1.8M pixels e velocità di scaricamento superiore a 10fps collegata direttamente al PC di pilotaggio tramite interfaccia GigE (modello DMK 23G274 della The Imaging Source).

3.1.3 Asse motorizzato Z e Tavola di movimentazione XY con porta campioni

Il sistema deve permettere di effettuare l'acquisizione automatica di tutta la cella di sedimentazione. E' quindi necessaria la presenza di un movimentatore automatico XY per spostare il campione rispetto all'obiettivo e di un motore Z per effettuare il rifoceggiamento in ogni posizione. La precisione e la ripetibilità della movimentazione devono essere sufficienti a supportare un'operatività di almeno un'ora senza dover richiedere l'intervento dell'operatore per il riallineamento. Nell'ambito del progetto è stata utilizzata una tavola XY motorizzata con motori passo-passo di precisione e prodotta dall'azienda VacuumFAB srl. Per l'asse Z è invece stato utilizzato un motore passo-passo della Micos-PI GmbH.

3.1.4 *Illuminatore*

L'illuminazione in trasmissione del campione non richiede particolari accorgimenti. L'unico aspetto rilevante riguarda la possibilità di ottenere la stessa intensità luminosa in due successive misure, in maniera da fornire in ingresso al software di riconoscimento immagini con la stessa luminosità. Tale funzionalità è stata ottenuta nell'ambito dell'attività di validazione usando una lampada LED configurabile via USB direttamente dal PC.

3.1.5 *Controller di posizionamento*

Tutte le operazioni di spostamento degli assi e di acquisizione dell'immagine devono essere controllate e sincronizzate (ad esempio per acquisire l'immagine solo a campione fermo e far ripartire il movimento dopo aver finito di acquisire). È stato utilizzato un controller phyMOTION™ (Phytron, Gröbenzell, Germany) per pilotare i tre motori e generare un segnale di trigger hardware.

3.1.6 *Software di gestione*

Il software di gestione del dispositivo è stato sviluppato in maniera da implementare le funzionalità necessarie alla conta automatica, sia a livello di pilotaggio, sia a livello di interfaccia utente.

Per quanto riguarda il pilotaggio di basso livello, il software si fa carico di muovere il campione su un percorso predefinito in maniera da non perdere il fuoco durante l'acquisizione. Il percorso dipende dalla scelta dell'operatore e offre l'opzione di effettuare una scansione completa della cella oppure limitarsi a due transetti ortogonali. Allo scopo di mantenere il fuoco durante la scansione, è implementata nel sistema una procedura di pre-allineamento parzialmente manuale, in cui il dispositivo si sposta in 3 o più punti e l'operatore, per ognuno di essi, rimette a fuoco manualmente l'immagine. In questo modo il software calcola la superficie corrispondente al vetrino (un piano o una calotta sferica, a seconda della scelta effettuata dall'operatore) e poi procede automaticamente a implementare il moto richiesto.

Il software, per ogni acquisizione eseguita, trasferisce l'immagine all'algoritmo di riconoscimento (vedi par. 3.2) per una conta in tempo reale del numero di cellule di *Ostreopsis ovata*; le cellule individuate possono essere indicate a video e viene visualizzato un grafico che proietta la conta parziale all'intera cella di misura e permette di avere un'idea dell'andamento della conta, in maniera da, eventualmente, interrompere manualmente il processo se il numero si è sufficientemente stabilizzato prima di aver campionato l'intera area prevista. Tutte le immagini acquisite vengono salvate su disco sia per consentire un'archiviazione digitale del campione sia per garantire la possibilità di eseguire una procedura aggiornata di riconoscimento in una fase successiva.

3.2 **Algoritmo di riconoscimento e sue prestazioni**

3.2.1 *Introduzione*

L'algoritmo di riconoscimento automatico di cellule di *Ostreopsis ovata* impiegato nel sistema qui descritto è una tipica applicazione delle tecniche di Pattern Recognition in ambito microscopico. Dal punto di vista scientifico, il Pattern Recognition è un'area di studio a carattere spiccatamente interdisciplinare che si colloca tra la Computer Vision (analisi di immagini), il Machine Learning (apprendimento automatico) e la Statistica Matematica (tecniche di decisione ottimale), con l'obiettivo di replicare la capacità umana di svolgere compiti in cui occorra "riconoscere" forme interessanti all'interno di strutture dati (tipicamente immagini). Esistono oggi numerosi metodi che affrontano il problema del riconoscimento in vari contesti ma ogni caso applicativo richiede di norma uno studio indipendente.

In senso generale, contare il numero di oggetti di un certo tipo presenti in una immagine implica due attività di base:

- estrarre dallo sfondo tutti gli oggetti potenzialmente interessanti (segmentazione);
- valutare quanti /quali oggetti hanno caratteristiche compatibili con le specifiche applicative (classificazione).

Al fine di svolgere al meglio queste attività, l'aspetto chiave da affrontare è la definizione precisa della tipologia di oggetti da rilevare. Questo viene fatto, se possibile, tramite la definizione di uno o più prototipi, cioè forme di base selezionate in fase di progetto (templates) oppure, più frequentemente, mediante la raccolta di una vasta casistica di esempi, sia positivi (cioè oggetti appartenente alla classe di interesse) sia negativi (cioè oggetti potenzialmente confondibili e quindi da scartare), condotta sotto la supervisione di un esperto che stabilisce in modo univoco l'attribuzione di ogni oggetto selezionato ad una delle due categorie. In questo modo si crea il cosiddetto training set, cioè l'insieme dei dati in

base ai quali viene sviluppato l'algoritmo di riconoscimento. A partire dal training set viene quindi "addestrato" un algoritmo matematico che svolge in maniera ottimale, in senso statistico, il compito ad esso richiesto, cioè individuare in una immagine generica a contenuto sconosciuto, quanti e quali siano gli oggetti che corrispondono alla descrizione appresa in base al training set.

La Fig. 3.2 mostra alcuni esempi di organismi di tipo positivo, cioè veri campioni di *Ostreopsis ovata* e quindi dotati di caratteristiche simili, ed altri di tipo negativo, di tipo invece molto diverso fra loro.

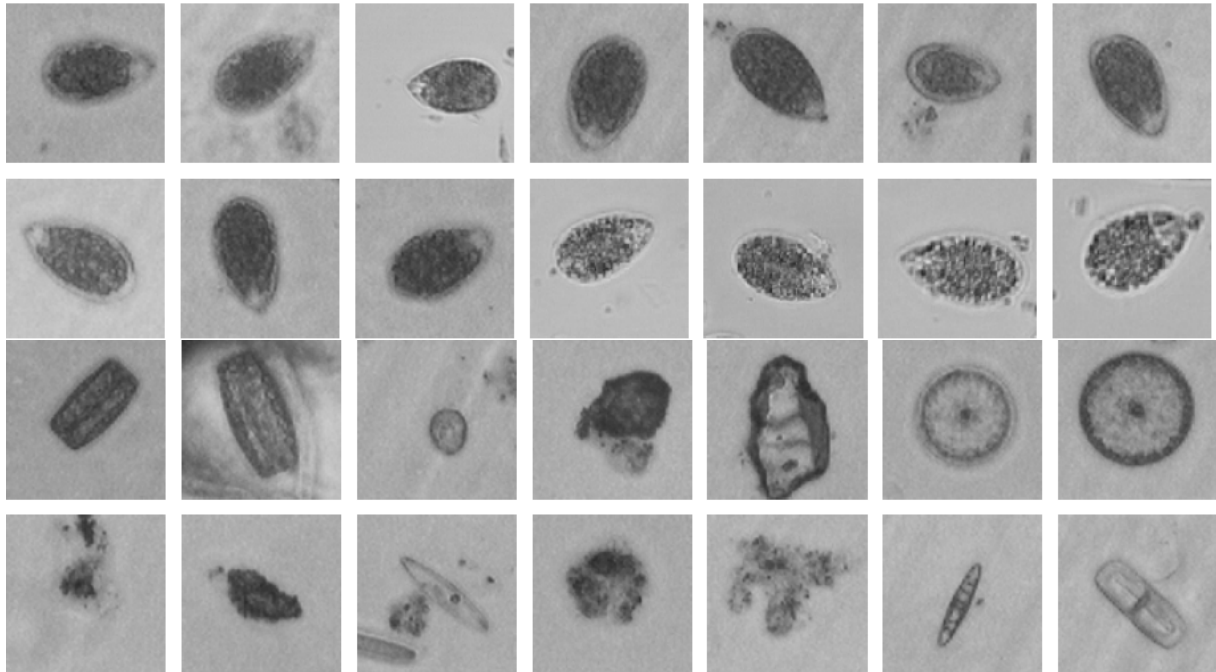


Figura 3.2 - Alcuni esemplari contenuti nel training set

La catena di elaborazione che realizza la funzione descritta può essere suddivisa in due fasi come segue:

- **Fase di ricerca:** vengono localizzati tutti i possibili candidati, cioè gli oggetti che si distinguono in maniera più o meno netta dalla sfondo e, per ciascuno di essi, viene definito con precisione il contorno.
- **Fase di analisi:** per ogni oggetto candidato vengono calcolate alcune caratteristiche di tipo geometrico, cioè legate alla forma del contorno, e di tipo pittorico, cioè legate alla distribuzione dei valori dell'immagine sull'oggetto stesso (*texture*), con i quali viene effettuata la classificazione, intesa come l'attribuzione di ogni oggetto alla classe dei positivi o dei negativi.

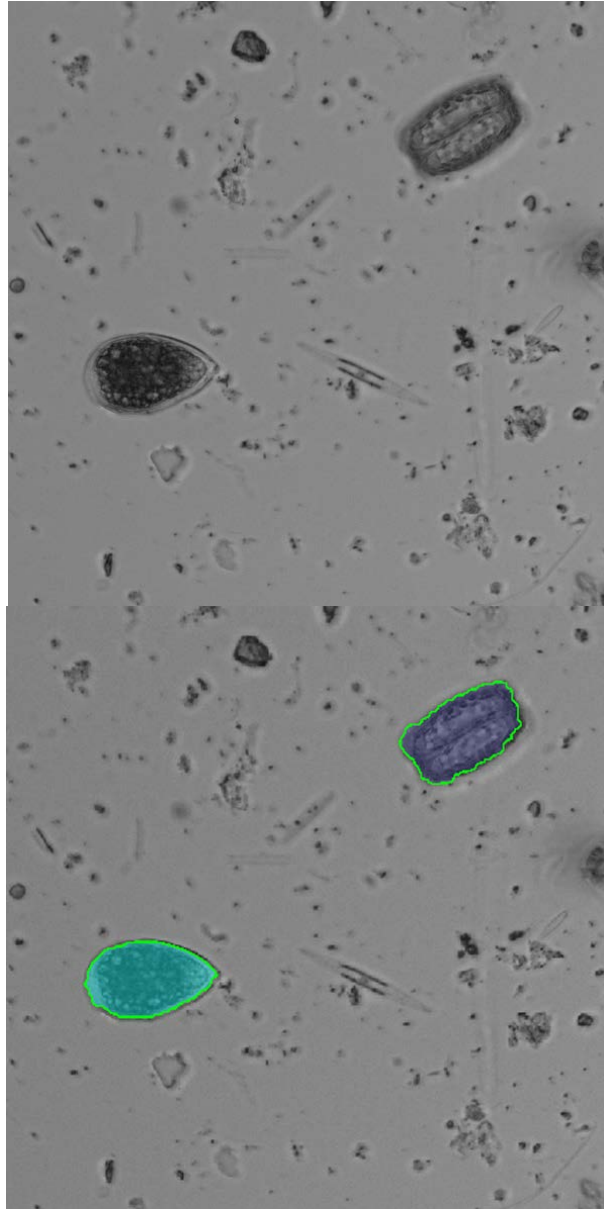


Figura 3.3 - Esempio di elaborazione

In Figura 3. viene mostrato un tipico esempio di elaborazione, in cui si osserva la segmentazione di due candidati, descritti in base al contorno, e la classificazione positiva di uno solo di questi.

3.2.2 Valutazione delle prestazioni

Un sistema di riconoscimento viene valutato in base al confronto dei risultati ottenuti su un campione di dati, detto test set, che deve essere diverso da quello usato per il training. Questo a garanzia del fatto che il sistema abbia effettivamente "imparato" a svolgere il suo compito e sia quindi in grado di gestire nuovi dati.

Non potendo essere il training set esaustivo di tutta la possibile variabilità osservabile nelle immagini reali, ne segue che l'algoritmo deve saper generalizzare a partire dai casi analizzati a casi simili ma non esattamente analoghi. La vera differenza tra le prestazioni di riconoscimento dell'esperto umano e quelle di un sistema automatico sta quindi nella capacità di generalizzare, che è di solito molto elevata nell'uomo e forzosamente inferiore nei sistemi automatici.

I problemi di riconoscimento in ambito biologico enfatizzano marcatamente questo aspetto a causa della:

- elevata variabilità morfologica degli organismi analizzati;
- necessità di eseguire trattamenti complessi prima di acquisire le immagini;
- incertezza degli stessi esperti nel classificare correttamente i casi di esempio.

Tali fattori rendono non banale realizzare riconoscitori in campo biologico che possano risultare competitivi nei confronti di osservatori umani, almeno su compiti specifici dove l'impatto della conoscenza tassonomica non sia troppo rilevante.

Nella fase di sviluppo del software di riconoscimento, questo aspetto è stato ampiamente considerato e sono state condotte numerose valutazioni comparate tra i risultati ottenuti in modo automatico e quelli degli esperti che si sono resi disponibili per fornire la propria competenza (Università di Genova e Istituto di Biofisica del CNR).

La valutazione è stata condotta su campioni di immagini con concentrazioni cellulari molto diverse, proprio perché la capacità di riconoscere dipende fortemente dalla complessità dell'immagine analizzata, e perché si voleva stabilire la correttezza dei conteggi in un intervallo di concentrazioni il più ampio possibile.

A titolo di esempio, in Figura 3.3 sono riportate due coppie di immagini che rappresentano casi limite da bassa ed alta concentrazione, in modo da evidenziare le differenze ed il diverso grado di difficoltà della problematica, non solo per il conteggio automatico ma anche per quello visivo.

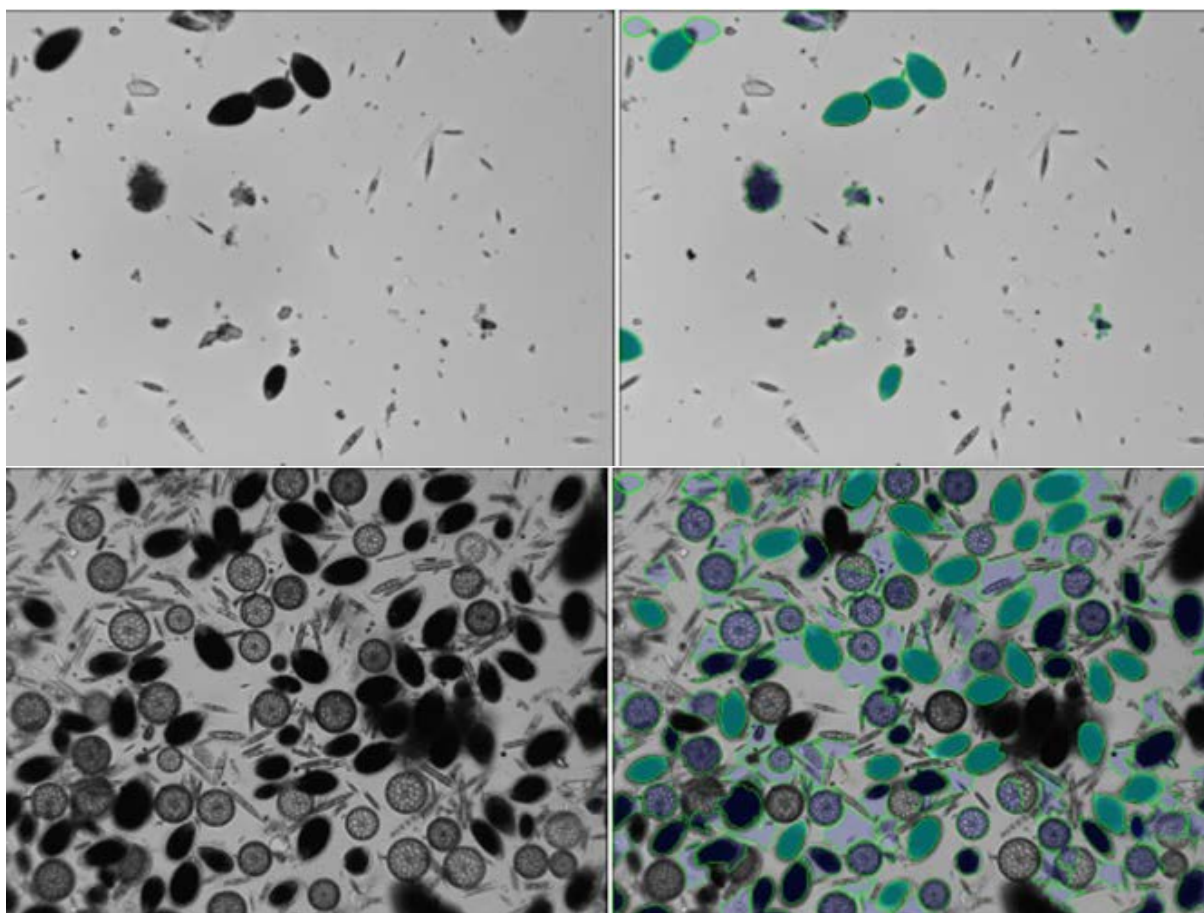


Figura 3.3 - Esempi di immagini a diversa concentrazione

Sono state acquisite circa 1000 immagini digitali, provenienti da diversi siti di analisi, per ciascuno dei 7 campioni indipendenti utilizzati per il test; dalla comparazione delle immagini è stato possibile effettuare un confronto quantitativo.

Per ogni campione, utilizzando le stesse immagini, un osservatore esperto ha effettuato un conteggio visivo e prodotto analoghe stime di conteggio, e quindi di concentrazione algale. I dati sono disponibili sia a livello di singola immagine, sia a livello aggregato per ognuno dei 7 campioni utilizzati.

Nella tabella seguente (3.1) è riportata la matrice di confusione ottenuta incrociando i riconoscimenti ottenuti su tutte le immagini disponibili. Vengono quindi accumulati tutti i casi possibili di oggetti identificati dall'osservatore umano e dal metodo automatico, formando 4 classi di conteggio:

- VP: oggetti veri (cellule *Ostreopsis*) identificati anche automaticamente
- VN: oggetti falsi (altri organismi) non identificati automaticamente
- FN: oggetti veri (cellule *Ostreopsis*) non identificati automaticamente

- FP: oggetti falsi (altri organismi) identificati automaticamente come *Ostreopsis*.

Tabella 3.1 – Matrice di confusione nel confronto con un operatore esperto

	Non identificato	Identificato	Totale
Altro organismo	17992	307	18299
<i>Ostreopsis ovata</i>	407	4335	4742
Totale	18399	4642	

L'osservatore umano ha quindi identificato 4742 cellule, mentre il riconoscitore ne ha contate complessivamente 4642. Il confronto statisticamente corretto non deve però basarsi solo sul totale, ma sulla verifica che le cellule contate siano effettivamente le stesse e la coincidenza dei totali non sia frutto del caso. Diversi indici statistici sono utilizzati a questo scopo, e tra questi ne riportiamo due ampiamente utilizzati in ambito statistico, detti precision e recall, che vanno a conteggiare i casi di tipo VP in rapporto al totale dei casi positivi (recall) oppure al totale dei casi identificati come tali. Con i dati in tabella risulta:

$$\text{Precision} = \text{VP}/(\text{VP}+\text{FP}) = 4335/4642 = 93.4\%$$

$$\text{Recall} = \text{VP}/(\text{VP}+\text{FN}) = 4335/4742 = 91.4\%$$

Utilizzando tale doppia valutazione è possibile individuare situazioni in cui il riconoscitore risulti valido in termini di incidenza di falsi positivi oppure di falsi negativi, ma non necessariamente per entrambi, come invece sarebbe necessario. Il riconoscitore qui proposto si è dimostrato invece molto robusto sotto entrambi gli aspetti.

Un confronto diverso è stato invece impostato andando a suddividere i conteggi per campione (Tab. 3.2), utilizzando il fatto che i diversi campioni avevano concentrazione molto diversa fra loro.

Tabella 3.2 – Conteggi su diversi campioni

Campione	Conteggi effettuati da operatore	Conteggio automatico	Errore %
1	62	57	-8.0
2	74	69	-6.7
3	99	86	-13.1
4	567	523	-7.7
5	835	810	-3.0
6	1083	1052	-2.8
7	2022	2045	+1.1

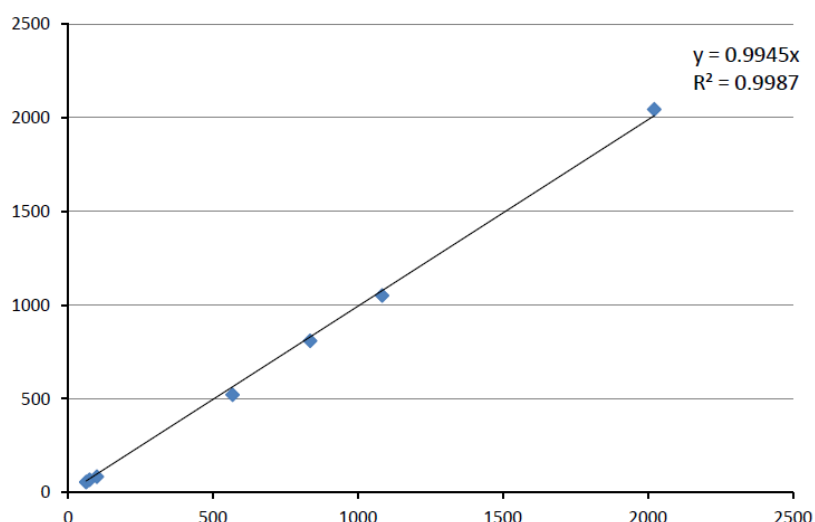


Figura 3.4 - Comparazione conteggi su diversi campioni

In Figura 3.4 sono riportati sia i dati di conteggio sui 7 campioni, sia la retta di regressione tra conteggi da operatore e conteggi effettuati attraverso il metodo automatico, che produce un coefficiente di determinazione R^2 pari a 0.99, cioè molto vicino all'unità e quindi indice di ottimo accordo. L'impatto percentuale degli errori è chiaramente più evidente nei casi a bassa concentrazione, anche se in termini assoluti questo è meno importante. In questo caso, evidenziato nella coppia di immagini di Figura 3.5 il numero di cellule effettive (basso) può essere pesantemente alterato dal fatto che lo sfondo, molto complesso in termini di contenuto, può portare alla generazione di una quota non trascurabile di falsi positivi.

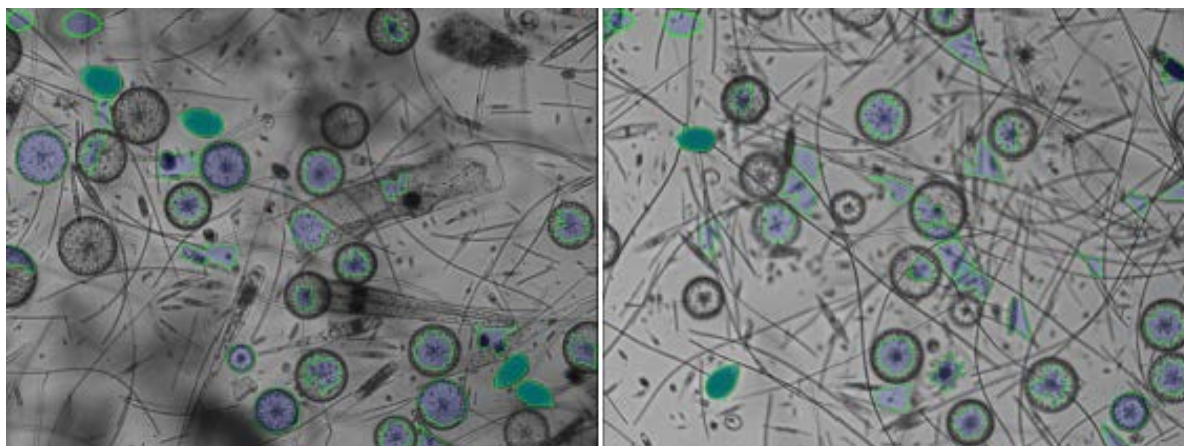


Figura 3.5 - Immagini con sfondo complesso e rischio di falsi positivi

Nella valutazione finale di un dispositivo di conteggio automatico va quindi tenuto ben presente questo aspetto statisticamente inevitabile, legato al fatto che a basse concentrazioni l'impatto dei falsi positivi tende a fornire conteggi maggiori del valore effettivo, mentre ad alte concentrazioni risulta importante l'effetto dei falsi negativi, cioè delle cellule non identificate, che portano ad un conteggio inferiore al vero. Dato questo effetto sistematico (bias) nella distribuzione degli errori, ne segue l'importanza di identificare un intervallo di valori di concentrazione interessanti per l'applicazione, in modo da regolare la parametrizzazione del riconoscitore e minimizzare l'errore in tale intervallo.

3.2.3 Configurazione e caratteristiche del software di riconoscimento

Il software di riconoscimento cellulare viene inserito in modo trasparente all'interno dell'applicativo di gestione del sistema di controllo del microscopio.

La conoscenza estratta attraverso l'analisi del training set viene inserita in un file di configurazione, in formato XML, che contiene tutte le informazioni necessarie per operare sulle immagini acquisite. E' quindi possibile sia utilizzare un file di configurazione standard fornito con il sistema, sia adattare tale configurazione a specifiche necessità o caratteristiche della particolare installazione. Tale possibilità risulta importante qualora la tipologia delle immagini ottenute non sia riconducibile a quella base

utilizzata nel training qui descritto ma siano necessari interventi di affinamento. Questo può ad esempio avvenire per differenze nel trattamento del campione biologico.

Tali interventi possono arrivare ad una ripetizione del processo di addestramento su un training set modificato mediante l'integrazione di nuove immagini e l'indicazione delle cellule di *Ostreopsis ovata* realmente presenti. In questo caso verrà prodotto un nuovo file di configurazione che andrà a rimpiazzare quello iniziale.

Il software sviluppato risulta molto robusto rispetto a diverse caratteristiche del processo, ed in particolare alla messa a fuoco, che può anche non essere perfetta in tutte le posizioni analizzate, a causa di piccole alterazioni nella forma del contenitore. E' comunque essenziale che il contorno cellulare sia visibile, almeno in massima parte, e la trama dell'immagine all'interno della cellula non sia completamente cancellata.

Il conteggio automatico risulta molto efficace se le cellule sono tutte ben depositate ed inserite su uno sfondo non troppo ricco, ma il software è stato progettato per gestire in modo soddisfacente anche casi di contorni non del tutto visibili a causa di occlusioni o di deposito non perfetto.

La limitatezza delle immagini digitali obbliga infine a gestire il fatto che l'ampiezza della superficie analizzata impone di acquisire un numero elevato di immagini con effetti non trascurabili ai bordi delle immagini. Una singola cellula può difatti essere contata due volte o non contata affatto se risulta molto prossima al bordo di acquisizioni limitrofe. Questo effetto è di difficile gestione a livello software ma può essere limitato tramite un'accurata calibrazione del dispositivo.

Tutte le sperimentazioni condotte finora hanno comunque confermato la validità statistica del metodo automatico di conteggio, che è in grado di produrre conteggi accettabili in un ampio intervallo di valori di concentrazione. Il costo computazionale è accettabile, essendo dell'ordine di 2 secondi/immagine, che porta ad un tempo medio di 20-25 minuti/campione, utilizzando PC di normali caratteristiche in termini di CPU e memoria disponibile. Tale tempo è già oggi riducibile utilizzando strategie di sottocampionamento della superficie da analizzare. L'evoluzione delle metodologie di Pattern Recognition consentirà comunque a breve riduzioni significative di tale tempo attraverso l'impiego delle schede GPU (processori grafici) già presenti ed utilizzabili nei comuni PC e con ulteriori ottimizzazioni del software.

Infine, vale la pena di sottolineare il fatto che lo schema di elaborazione qui presentato può essere in linea di principio replicato per altre specie di organismi biologici che risultassero importanti. La stessa macchina potrebbe quindi effettuare diversi tipi di conteggio senza modifiche alla sua struttura ma con la semplice sostituzione del file di configurazione, previo addestramento su un nuovo training set di immagine della specie di interesse.

3.3 Il Test Operatore Esperto (TOE) per valutare la variabilità nei conteggi di cellule di *Ostreopsis ovata*

Nel processo che dal campionamento porta alla determinazione della concentrazione di cellule di *Ostreopsis ovata* in acqua di mare, vi sono numerosi passi che implicano una calibrazione che si ripercuote sul risultato finale nei termini di un fattore moltiplicativo che, inevitabilmente, porta con sé un errore. Ad esempio, la concentrazione finale dipende dal volume della colonna di sedimentazione, dal volume realmente osservato, dalla diluizione e da numerosi altri fattori, alcuni dei quali anche di difficile gestione e verifica. Allo scopo di validare l'efficienza dell'algoritmo di riconoscimento, indipendentemente da tutti questi fattori, è stato messo a punto un test denominato Test Operatore Esperto (TOE), che permettesse un confronto diretto della macchina con gli esperti tassonomi coinvolti nell'intercalibrazione.

Il TOE ha consistito nel selezionare 270 immagini di campioni sedimentati, selezionate in maniera da coprire il più ampio spettro di casistiche possibile: da immagini semplici a immagini complesse, da alta a bassa concentrazione, fondo chiaro o rumoroso. Tali immagini sono poi state proposte a tutti i valutatori che, utilizzando un software sviluppato *ad hoc*, hanno potuto cliccare sulle cellule riconosciute come *O. ovata*. Il programma ha quindi registrato i risultati in un file di descrittori che è stato raccolto e confrontato con tutti gli altri e con quanto ottenuto dall'algoritmo automatico.

3.3.1 Quante alghe sono state riconosciute in media sulle 270 immagini?

Al TOE hanno partecipato 20 riconoscitori, di cui 17 esperti ARPA, 2 esterni (1 UNIGE e 1 CNR) e il sistema automatico OPR sulla base dell'algoritmo descritto al par. 2. La prima informazione estratta

dal lavoro ha riguardato la media dei conteggi sulle 270 immagini e la distribuzione statistica: sono state contate in media 941 cellule con una deviazione standard di 155 cellule, ottenendo un errore statistico all'interno dei 20 riconoscitori di circa il 16.5%.

3.3.2 Come si sono distribuiti i conteggi intorno alla media?

Il grafico di Fig. 3.6 riporta la distribuzione delle conte in relazione alla media. Il grafico grande presenta il valor medio (riga rossa continua) in funzione dell'immagine, avendo ordinato le immagini per valor medio crescente. La banda arancione scuro rappresenta la deviazione standard intorno alla media mentre la banda arancione chiaro comprende tutti i valori (scarto massimo). Nell'inserto è riportata la regione significativa del grafico grande (tutte le immagini per cui il numero di cellule medio contato è stato maggiore di 2, corrispondente a circa 100 immagini) rappresentato in maniera relativa (ovvero mettendo a 1 il valor medio).

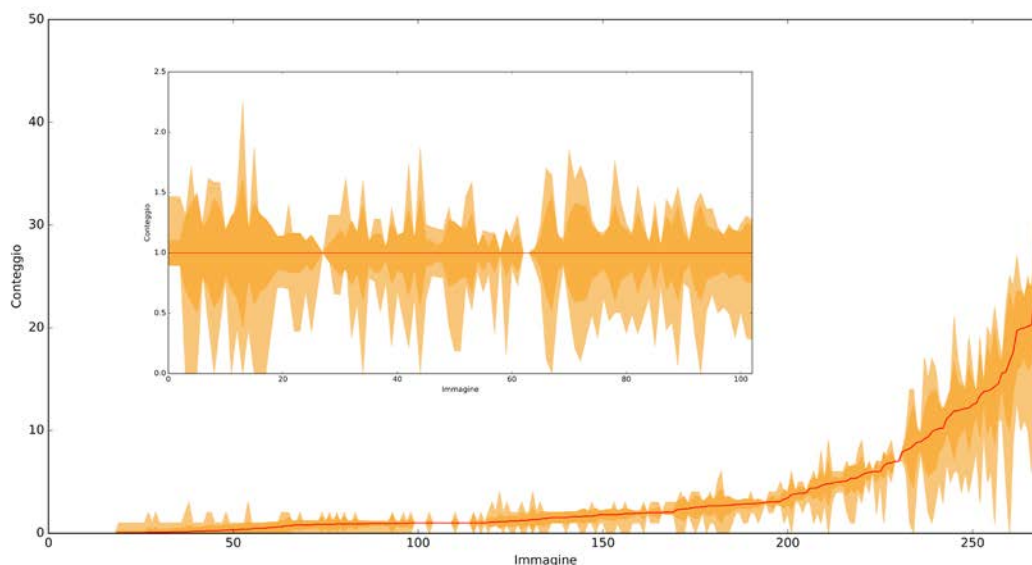


Figura 3.6 - Risultati del TOE rispetto alla media (in rosso)

Il grafico di Fig. 3.6 mostra come la banda di errore cresca all'aumentare del numero di cellule per immagine, in maniera proporzionale al numero di cellule presenti nell'immagine, come si può osservare anche dal secondo grafico espresso in unità relative in cui la banda di errore è in sostanza omogenea su tutto l'intervallo.

La Fig. 3.7 riporta i risultati relativi sulle circa 100 immagini significative per tutti e 20 i partecipanti al TOE. La linea rossa rappresenta sempre la media, le bande arancioni danno informazione sull'errore e la linea verde è il conteggio effettivo dell'operatore anonimo. Il sistema automatico è rappresentato dal partecipante 13.

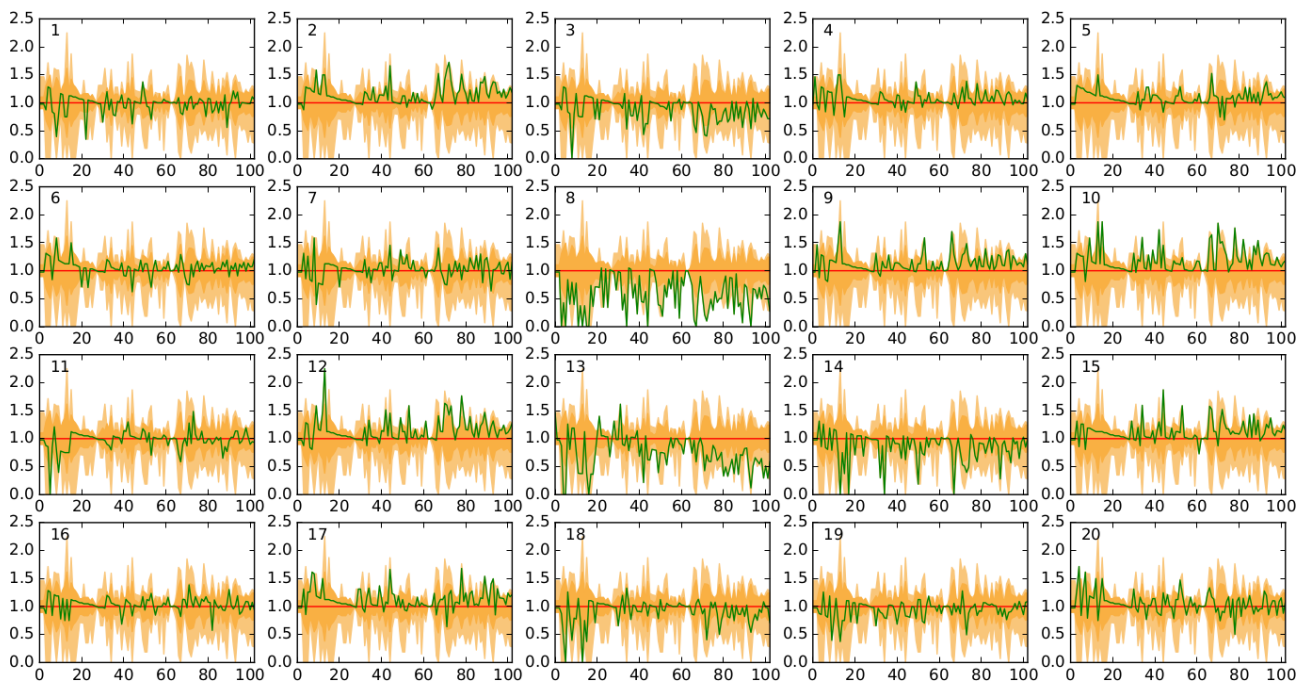


Figura 3.7 - Andamento delle conte per i 20 partecipanti al TOE

3.3.3 Che livello di consenso è stato raggiunto sui singoli riconoscimenti?

Una questione interessante concerne il livello di consenso che è stato raggiunto sul riconoscimento dei singoli individui, che comporta una comparazione di maggiore dettaglio tra i partecipanti al TOE. A questo scopo si è valutato, per ogni individuo contato dal almeno 1 esperto, quanti altri esperti sono andati a contare lo stesso individuo.

E' quindi possibile valutare, dato un massimo di 19 voti possibili, quanti individui hanno ottenuto un numero $N \leq 19$ di voti, cioè stabilire appunto un livello di confidenza sul fatto che tale individuo sia o meno classificabile come *Ostreopsis*. La Fig. 3.8 mostra sinteticamente il risultato ottenuto.

Un accordo perfetto (19 voti) si ottiene su 404 individui, che rappresentano quindi il totale dei casi su cui l'accordo è unanime. Ammettendo un accordo comunque elevato (ad esempio 17 su 19, pari a circa il 90%) il totale dei casi coperti sale a 719. Questo rappresenta un livello di conteggio "prudenziale" che include tutti gli individui contati dalla quasi totalità degli esperti.

Non deve stupire il fatto che siano presenti molti individui con indice di confidenza basso, selezionati quindi da una minoranza di esperti. Questo riflette la difficoltà del test, che include numerose immagini assai complesse da analizzare senza l'ausilio di altra strumentazione. Di fronte a casi difficili, se non addirittura indecibili in modo certo, ad esempio nel caso di individui non completamente visibili, il comportamento degli esperti può quindi essere molto diverso.

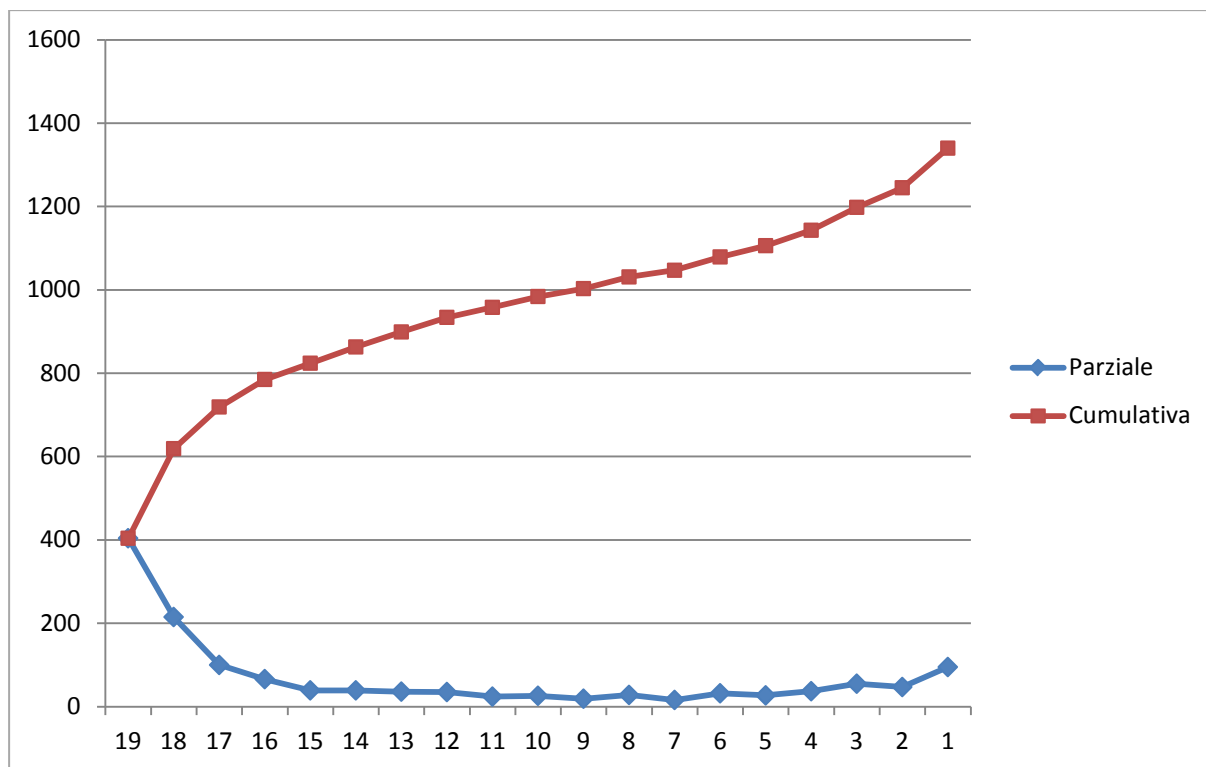


Figura 3.8 - *Indici di confidenza del singolo riconoscimento*

Disponendo dei singoli conteggi è infine possibile verificare se gli individui contati dal sistema OPR sono o meno confermati dagli esperti. La Fig. 3.9 mostra appunto il grado di conferma fornito dai singoli esperti ai riconoscimenti effettuati da OPR.

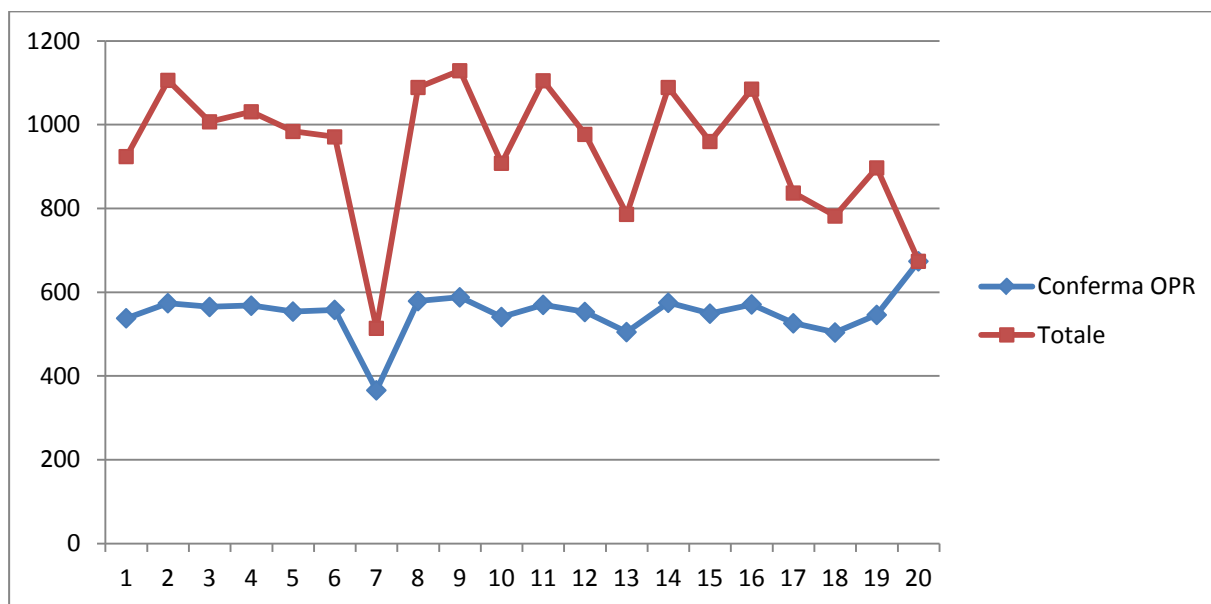


Figura 3.9 - *Grado di conferma dei conteggi OPR da parte degli esperti*

Dalla figura si vede come i 674 individui contati da OPR (visibili in posizione 20 nel grafico) sono in larga misura (circa 600) sempre confermati dagli esperti. Gli individui contati da OPR sono quindi in linea di massima quelli comuni a tutti, cioè quelli a maggiore confidenza.

3.3.4 Conclusioni

Valutando il numero complessivo di conteggi degli operatori esperti sul dataset proposto, si ottiene un conteggio medio di 941 individui con una deviazione di ± 155 pari a circa 16-17%. Il sistema OPR non si distingue in maniera chiara dagli operatori esperti e presenta in generale una tendenza "prudenziale", che porta a sottostimare leggermente i conteggi, ma in maniera sistematica che, volendo, potrebbe essere corretta con un coefficiente di calibrazione aggiuntivo (non inserito nel TOE). In aggiunta, si nota che esiste una base di consenso comune tra tutti gli esperti che coinvolge circa il 43% dei conteggi medi (404/941), mentre il 90% degli esperti (17 su 19) concorda sul 75% dei conteggi (719/941). Il sistema OPR è in ottimo accordo sia sui 404 individui comuni a tutti, sia sui 719 comuni al 75% (90% di conferme).

4. IL PROTOCOLLO OPERATIVO

Le ARPA costiere hanno applicato nel periodo di monitoraggio 2016 previsto per la sorveglianza nazionale delle fioriture algali, un protocollo operativo condiviso dal gruppo di lavoro tratto e modificato dall'“Intercalibration counting protocol” sviluppato nell'ambito del Progetto M3-HABs.

Ciascuna Agenzia coinvolta ha raccolto, trattato e preparato campioni di acqua e macroalga o substrato duro per la ricerca e l'identificazione di cellule di *Ostreopsis ovata*. La fase di analisi ha previsto la lettura di aliquote dello stesso campione sia mediante operatore esperto presso le singole ARPA (lettura manuale con microscopio ottico), sia mediante sistema opto-elettronico (lettura automatizzata) presso il IBF-CNR di Genova.

Le procedure condivise descritte di seguito prevedono la medesima strategia di campionamento descritta nei protocolli operativi ISPRA (Quaderni 5/2012) a cui si rimanda per maggiori dettagli.

4.1 Campionamento

4.1.1 *Periodo e frequenza di campionamento*

Il campionamento della microalga *Ostreopsis ovata* è stato effettuato in concomitanza del monitoraggio nazionale previsto per la sorveglianza delle fioriture algali ovvero tra i mesi di giugno e settembre o inizio di ottobre con una frequenza mensile, quindicinale, oppure ogni 2-3 giorni nei periodi di intensa fioritura.

4.1.2 *Punti di campionamento*

Ciascuna Agenzia ha identificato n. 1 punto di campionamento (max 2 per Regione) scelto tra quelli della rete di monitoraggio regionale che negli anni è stato interessato da presenza/fioriture o che risulta potenzialmente idoneo allo sviluppo della microalga.

Sono stati prelevati campioni di acqua e macroalga o substrato duro durante tutto il periodo di monitoraggio in modo tale da assicurare almeno un campione mensile (anche 2 nel periodo di più intensa fioritura):

- 500 ml acqua totali
- 5-10 g di macroalga

Ciascun campione è stato prelevato e trattato seguendo i protocolli comuni condivisi ISPRA (Protocolli ISPRA 5/2012) e fissato (indicativamente 1% Lugol acido come concentrazione finale nel campione: 1 ml su 100 ml di campione o utilizzando concentrazioni minori sui campioni di acqua).

4.1.3 *Sub-campionamento e invio campioni al laboratorio IBF-CNR di Genova*

Ogni Agenzia ha separato sub-campioni di 100 ml per l'acqua e 10 ml per la macroalga/substrato duro del campione iniziale fissato da inviare per il conteggio automatico.

Prima di procedere alla preparazione del sub-campione, si è raccomandato di agitare più volte i campioni in modo da garantire una distribuzione il più possibile omogenea delle microalge.

Tutti i sub-campioni preparati per il conteggio automatico sono stati mantenuti +4°C e inviati entro pochi giorni dal prelievo al CNR-IBF per la lettura automatica, tramite un servizio di posta celere, cercando di scaglionare l'invio nel corso della stagione di prelievo a gruppi di non più di 2 per volta.

Ogni sub-campione è stato etichettato e corredato da informazioni sull'operatore ARPA eventualmente da contattare e da informazioni riguardanti il prelievo e i risultati ottenuti dalle Agenzie riportati nella Tabella seguente (4.1)

Tabella 4.1 – Informazioni sul sub-campione inviato

ARPA Lab.								
Acronimo campione*	Data (gg/mm/aa)	Sito di campionamento	Volume campionato (ml)	Volume sedimentato (ml)	Area totale camera conteggio (mm ²)	Area di lettura (mm ²)	Cellule contate n.	cell/l o cell/g fw

* OSTR-A-n (1, 2 ...) campione d'acqua; * OSTR-B-n (1, 2 ...) campione bentonico.

4.2 Lettura dei campioni

4.2.1 Lettura manuale presso le Agenzie ambientali (ARPA)

Ogni Agenzia ambientale ha effettuato il conteggio delle cellule di *Ostreopsis ovata* identificate nei campioni di acqua e macroalga o substrato duro previa sedimentazione Utermöhl delle seguenti aliquote:

Acqua - Aliquote di 50 ml del campione iniziale.

Macroalga/substrato duro - Aliquote di 3 ml (o altro volume specificato) derivanti dal volume complessivo di acqua di raccolta e di lavaggio della macroalga/substrato duro.

Le letture sono state effettuate secondo le procedure manuali standard in uso presso ogni Agenzia esaminando l'intero vetrino oppure con lettura parziale del vetrino, per campi casuali (contando non meno di 200 cellule) o per transetti.

I risultati sono stati espressi come di consueto in cell/l per i campioni d'acqua o cell/g di peso fresco per quelli bentonici.

4.2.2 Lettura con Sistema automatico presso IBF-CNR di Genova

Le indagini tramite lo strumento automatizzato sono state condotte adottando i procedimenti di deposizione (metodo Utermöhl) e tempistiche indicati nei protocolli ISPRA.

Analogamente alle ARPA sono state processate le seguenti aliquote:

Acqua - Aliquote da 50 ml (del sub-campione inviato) derivanti dal campione iniziale fissato.

Macroalga/substrato duro - Aliquote di 3 ml (del sub-campione inviato) derivanti dal volume finale (acqua di raccolta e lavaggio) fissato.

Il fondo della camera di sedimentazione è stato letto dallo strumento nella sua interezza tramite l'acquisizione di immagini in successione seguendo un percorso regolare predefinito con una scansione a serpentina. Ogni immagine acquisita è elaborata ed analizzata dal modulo software di riconoscimento ed il dato della conta di cellule *Ostreopsis ovata* è registrato ed archiviato.

Il modulo software di riconoscimento elabora ed estrae il dato di conta di *Ostreopsis ovata* per ogni immagine acquisita in tempo reale. Alla conclusione della scansione ed elaborazione delle singole immagini, lo strumento ha restituisce il dato complessivo della conta ed in base alla modalità di deposizione ed ai dati inseriti dall'utente restituisce la stima della concentrazione per unità di volume o di peso fresco.

5 RISULTATI DELLE LETTURE MANUALI E AUTOMATIZZATE

5.1 Campioni ARPA costiere

L'attività di inter-confronto con le ARPA costiere per la valutazione del sistema automatico di identificazione e conteggio di cellule di *Ostreopsis ovata* si è svolta nella campagna estiva di sorveglianza attuata dalle agenzie costiere nel periodo da giugno a ottobre. La scelta del miglior sito da analizzare con il sistema automatizzato è stata affidata alle competenze delle singole ARPA.

Sub-campioni dei prelievi, sia da macroalga che da colonna d'acqua, sono stati fatti pervenire presso IBF-CNR sede di Genova per l'analisi al sistema motorizzato di riconoscimento e conta della microalga tossica. Il numero dei campioni inviati ed analizzati per ogni ARPA costiera è riportato nella tabella 5.1.

Tabella 5.1 - Elenco dei campioni analizzati con il sistema automatizzato inviati dalle ARPA costiere partecipanti all'attività di interconfronto.

ARPA	Numero Campioni da colonna d'acqua	Numero Campioni da Macroalga
Sicilia	6	6
Sardegna	6	6
Toscana-Pisa	6	-
Toscana -Massa	6	-
Lazio-Roma	3	3
Lazio-Latina	3	-
Campania	2	3
Calabria	5	5
Basilicata	6	-
Puglia	5	5
Molise	2	3
Marche	3	3
Veneto	4	4
Friuli Venezia Giulia	5	5

Il sistema automatizzato per l'identificazione e riconoscimento di cellule di *Ostreopsis ovata* utilizza un classificatore che è stato ottimizzato su immagini, come quelle mostrate in Fig. 5.1, in cui le microalge appaiono senza tessitura interna e con contorni ben definiti, risultato di un completo assorbimento del preservante acido Lugol. Nella maggior parte dei casi il sistema è stato in grado di localizzare e riconoscere e quindi contare gli individui in modo corretto e con un accordo soddisfacente entro il 20% rispetto alla lettura manuale da operatore. Tuttavia nei casi in cui le cellule avevano assorbito in modo parziale il fissativo, risultando chiare e mostrando i dettagli fini della struttura interna, o nei casi in cui le cellule risultavano degenerate o prive di teca e altresì nei casi in cui erano presenti con molti detriti di piccole dimensioni o frammenti con dimensioni e forme paragonabili alle cellule d'interesse, il sistema ha avuto difficoltà nell'elaborare correttamente il dato. Immagini rappresentative delle varie situazioni per cui il sistema non ha fornito una stima corretta della concentrazione sono riportate in Fig. 5.2. In queste situazioni, per ottimizzare la lettura è consigliabile procedere ad alcuni trattamenti del campione come ad esempio l'aggiunta di fissativo, diluizione oculata del campione, l'uso di filtri in cascata.

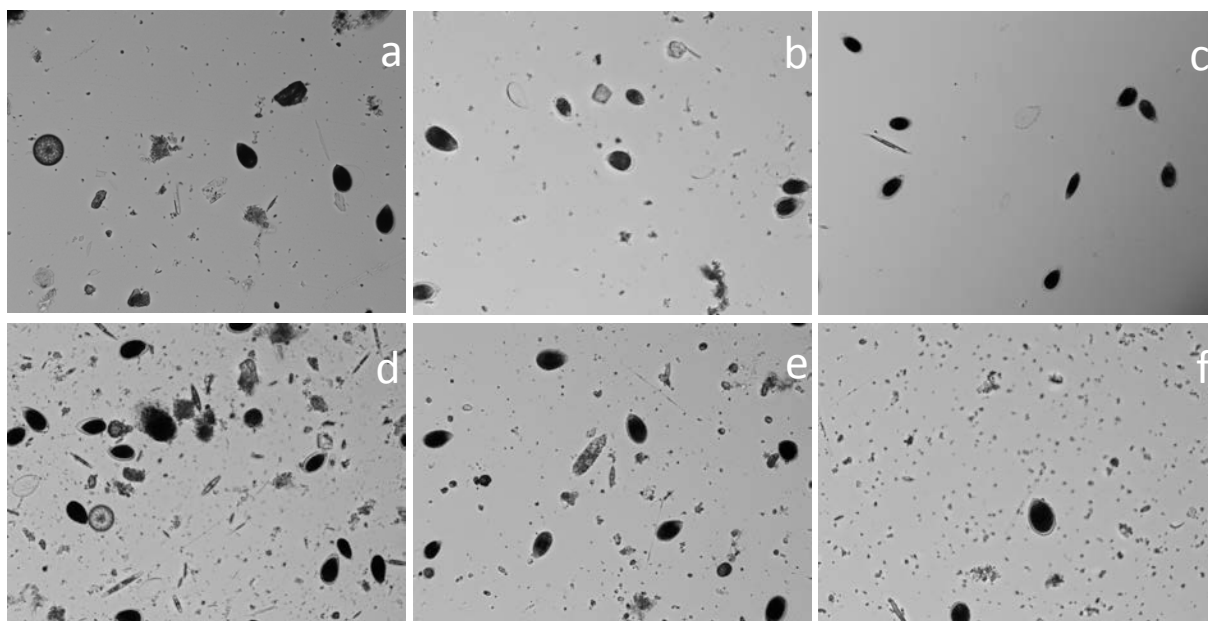


Figura 5.1 - Immagini acquisite dal sistema Optoelettronico rappresentative dei campioni (a, b, c) da colonna d'acqua e (d, e, f) da macroalga inviati dalle ARPA costiere.

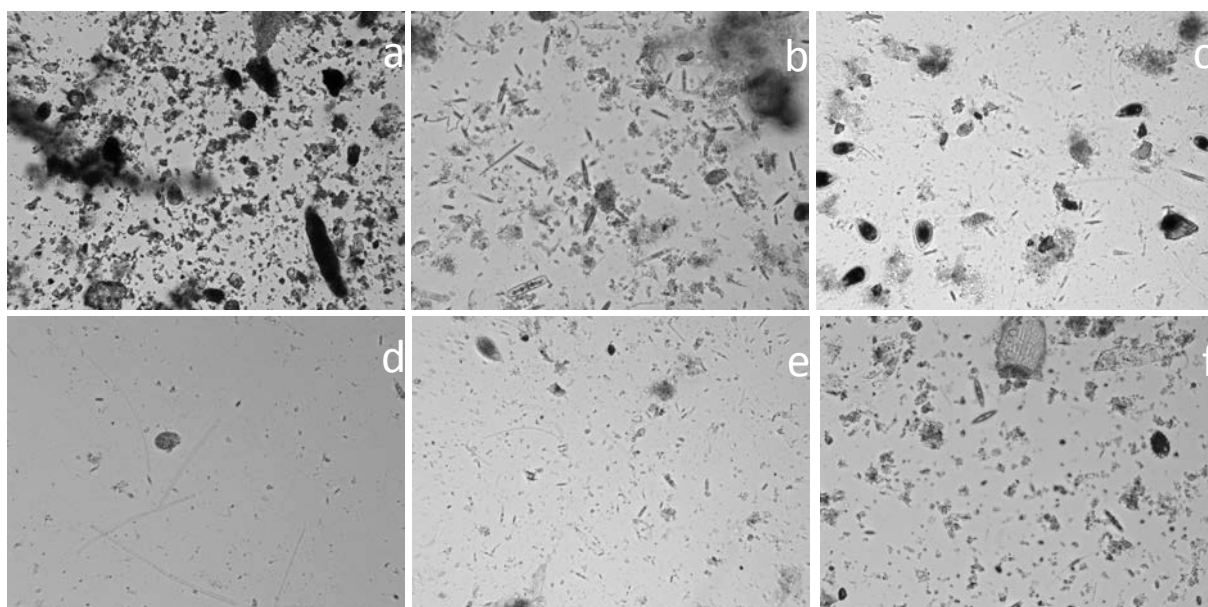


Figura 5.2 - Immagini acquisite dal sistema Optoelettronico rappresentative dei campioni (a, b, c) ricchi di materiale organico, (a, e, f) detriti o sabbia, (a, f) con frammenti, che ostacolano la lettura corretta delle cellule d'interesse; (d, e) esempi di casi di parziale assorbimento del fissativo da parte delle cellule di *Ostreopsis ovata*.

Nei grafici di Fig. 5.3 sono riportati i confronti delle stime delle concentrazioni per i campioni (a) da colonna d'acqua e (b) da macroalga ottenute con la lettura manuale condotta da operatore ARPA e con la lettura automatizzata. Nella regione d'interesse compresa 10^3 e 10^5 cell/l (o cell/g fw), zona che include il valore della soglia di allerta, stabilito in 10^4 cell/l (DM 30 marzo 2010), l'andamento dei dati risulta lineare con un valore di correlazione pari a 0.802 e a 0.929 rispettivamente per i campioni da colonna di acqua e per i campioni da macroalga. Questi valori fanno ritenere che la lettura automatizzata sia affidabile ed in buon accordo con la lettura manuale.

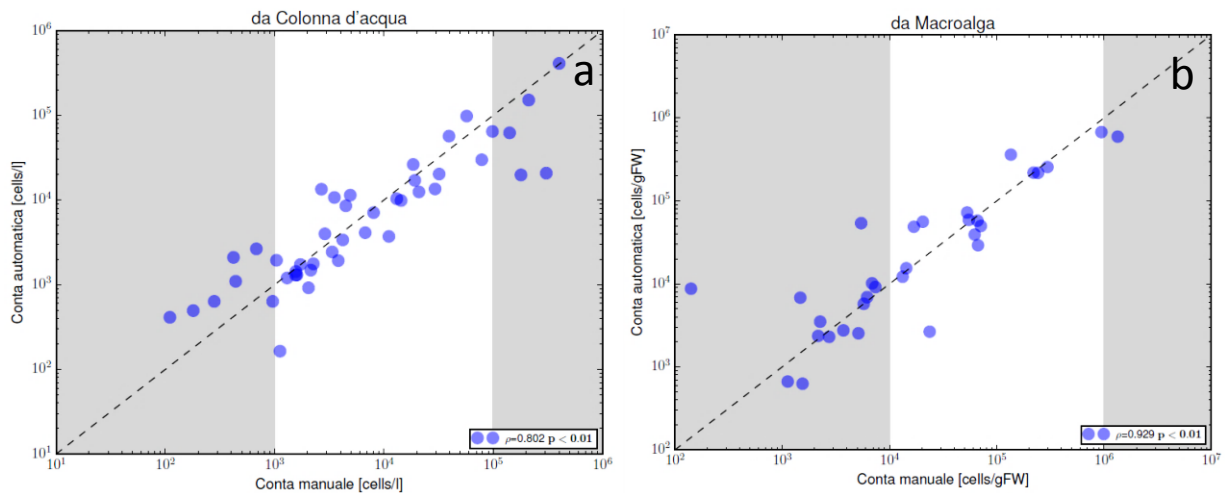


Figura 5.3 - Confronto delle stime delle concentrazioni per i campioni d'acqua e macroalga.

Nelle tabelle che seguono (da Tab.5.2 a Tab. 5.25) sono riportati i valori della lettura manuale da operatore ARPA, automatizzata con lo strumento Optoelettronico, manuale di controllo sulle immagini acquisite da parte di operatore esperto non ARPA, per i campioni da macroalga e da colonna d'acqua inviati dalle ARPA costiere partecipanti alle attività di interconfronto. I relativi istogrammi delle letture manuali da operatore ARPA e automatizzata con strumento Optoelettronico per i campioni da macroalga (a) e d'acqua (b) sono riportati nelle Figg. 5.4 - 5.17.

Nelle tabelle sono indicati in rosso i casi in cui l'accordo tra le letture manuali ed automatizzate è entro il 20%; mentre in grassetto sono messi in evidenza i casi in cui le stime della concentrazione sono in disaccordo. Le discrepanze che hanno origini e motivazioni differenti sono illustrate di seguito. Nei casi in cui il controllo della lettura automatizzata effettuato sulle immagini acquisite con una lettura manuale fornisce una lettura in accordo con la lettura automatizzata, la discrepanza tra le letture manuali da operatore ARPA e automatizzata è ascrivibile ad un problema di deposizione del campione. In questi casi le deposizioni per la lettura automatizzata sono state ripetute e le nuove letture automatizzate hanno confermato i valori delle stime delle concentrazioni trovate dal dispositivo. Nei casi in cui i campioni contenessero poche cellule di *O. ovata*, la sovrastima da parte dello strumento è ascrivibile al contributo dei falsi negativi che influenza la valutazione corretta della concentrazione. Come la densità cellulare aumenta, il numero dei falsi positivi diminuisce portando a ridurre l'errore invertendo di fatto l'andamento. In altri casi l'elevato numero di organismi degenerati ed informi; e/o di detriti e/o sabbia hanno reso la lettura molto complessa per tanto il contributo dei falsi negativi è andato ad incidere nella stima della concentrazione da parte del sistema automatizzato. In alcuni casi la presenza di un organismo (appartenente al gruppo dei Tinninidae) con dimensioni e forme simili a quelle di *Ostreopsis ovata*, che non era stato preso in considerazione nella fase di apprendimento dell'algoritmo di riconoscimento (training set), ha influenzato la misura fornendo un valore sovrastimato per la concentrazione.

Tabella 5.2 – Dati ARPA Sardegna: *Ostreopsis ovata* in campioni di macroalga (lettura manuale e automatizzata).

Codice Campione	Operatore ARPA (cell/g fw)	Strumento Optoelettronico (cell/g fw)	Manuale su immagini (cell/g fw)
Ostr_1 B	5128	2536	2692
Ostr_2 B	65989	57866	69976
Ostr_3 B	1340146	594390	712039
Ostr_4 B	943554	675481	751209
Ostr_5 B	242424	217264	242224
Ostr_6 B	296649	255464	297966

In rosso accordo tra le letture entro il 20 %; in grassetto stime della concentrazione in disaccordo

Tabella 5.3 - ARPA Sardegna: concentrazione di *Ostreopsis ovata* in colonna d'acqua (lettura manuale e automatizzata).

Codice Campione	Operatore ARPA (cell/l)	Strumento Optoelettronico (cell/l)	Manuale su immagini (cell/l)
Ostr_1 A	110	412	242
Ostr_2 A	6740	4114	3846
Ostr_3 A	11100	3712	3846
Ostr_4 A	29350	13506	14915
Ostr_5 A	1300	1200	1130
Ostr_6 A	2140	1483	1271

In rosso accordo tra le letture entro il 20 %; in grassetto stime della concentrazione in disaccordo

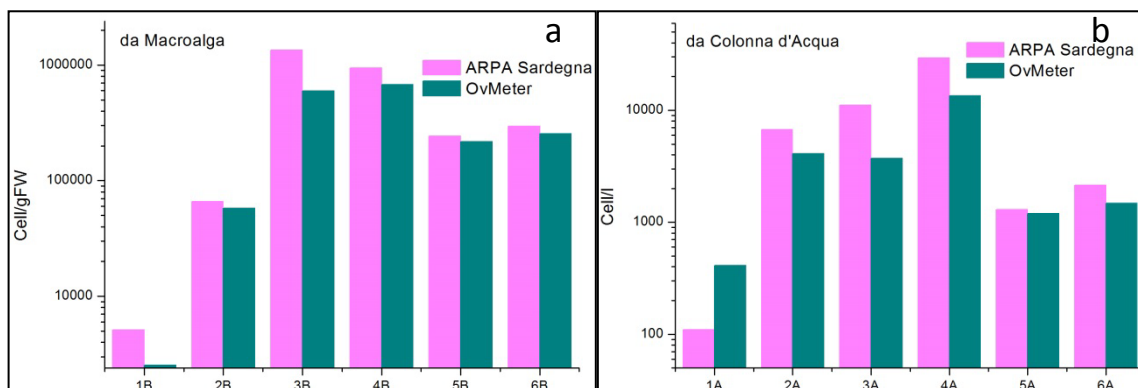


Figura 5.4 - ARPA Sardegna: confronto tra lettura manuale standard (operatore ARPA) e automatizzata (Optoelettronico) per i campioni di macroalga e colonna d'acqua.

Tabella 5.4 – Dati ARPA Sicilia: *Ostreopsis ovata* in campioni di macroalga (letture manuale e automatizzata).

Codice Campione	Operatore ARPA (cell/l)	Strumento Optoelettronico (cell/l)	Manuale su immagini (cell/l)
Ostr_1 B	6178	6923	5743
Ostr_2 B	62151	39285	40990
Ostr_3 B	2736	2298	1996
Ostr_4 B	141	8740	1249
Ostr_5 B	66782	29183	32785
Ostr_6 B	71092	49794	61461

In rosso accordo tra le letture entro il 20 %; in grassetto stime della concentrazione in disaccordo

Tabella 5.5 - Dati ARPA Sicilia: *Ostreopsis ovata* in colonna d'acqua (lettura manuale e automatizzata)

Codice Campione	Operatore ARPA (cell/l)	Strumento Optoelettronico (cell/l)	Manuale su immagini (cell/l)
Ostr_1 A	1560	1429	1366
Ostr_2 A	4920	11404	4025
Ostr_3 A	180	494	106
Ostr_4 A	680	2648	318
Ostr_5 A	2040	918	833

In rosso accordo tra le letture entro il 20 %; in grassetto stime della concentrazione in disaccordo

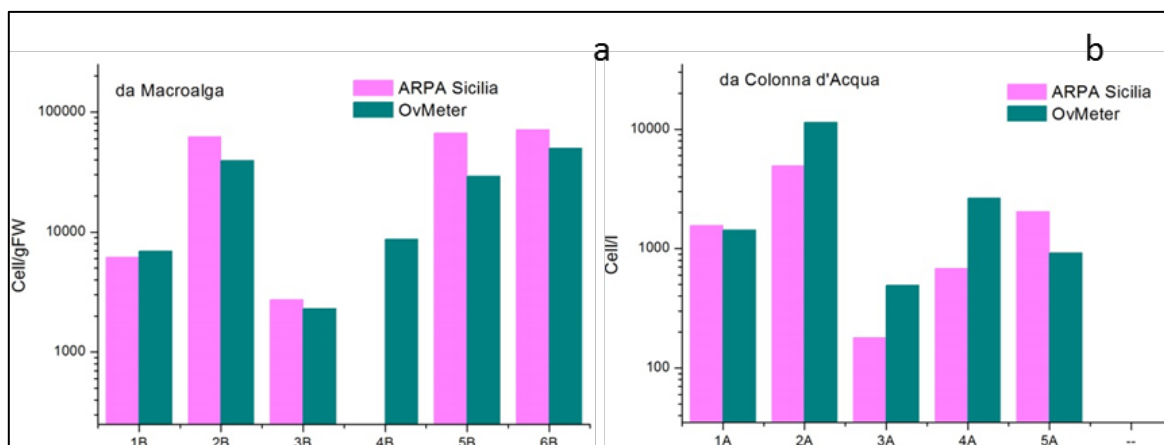


Figura 5.5 – ARPA Sicilia: confronto tra lettura manuale standard (operatore ARPA) e automatizzata (Optoelettronico) per i campioni di macroalga e colonna d'acqua.

Tabella 5.6 - Dati ARPA Toscana – Sezione di Pisa: *Ostreopsis ovata* in colonna d'acqua (lettura manuale e automatizzata)

Codice Campione	Operatore ARPA (cell/l)	Strumento Optoelettronico (cell/l)	Manuale su immagini (cell/l)
Ostr_1 A	4480	8536	5391
Ostr_2 A	440	1096	425
Ostr_3 A	14360	9861	12254
Ostr_4 A	4200	3376	2616
Ostr_5 A	1560	1297	1476
Ostr_6 A	960	635	247

In grassetto stime della concentrazione in disaccordo

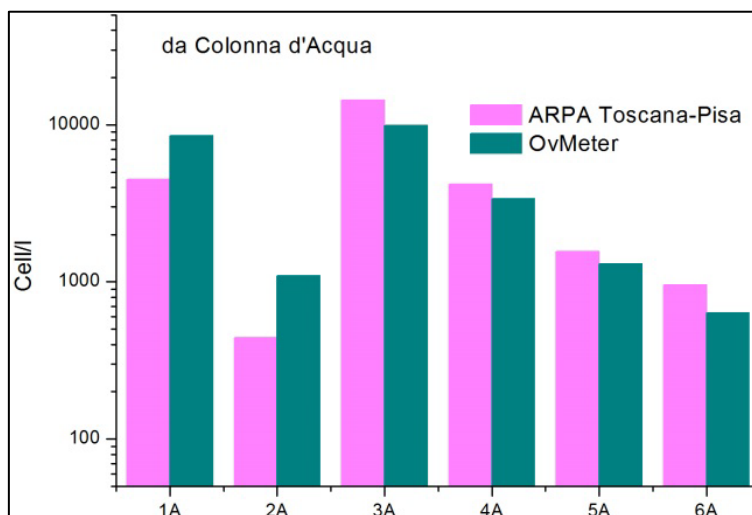


Figura 5.6 - ARPA Toscana – Sezione di Pisa: confronto tra lettura manuale standard (operatore ARPA) e automatizzata (Optoelettronico) per i campioni d'acqua.

Tabella 5.7 - Dati ARPA Toscana – Sezione di Massa: *Ostreopsis ovata* in colonna d'acqua (lettura manuale e automatizzata)

Codice Campione	Operatore ARPA (cell/l)	Strumento Optoelettronico (cell/l)	Manuale su immagini (cell/l)
Ostr_1 A	2760	39098	
Ostr_2 A	401040	409998	
Ostr_3 A	211200	151439	
Ostr_4 A	179520	19768	23086
Ostr_5 A	305760	20757	27887
Ostr_6A	98300	64529	

In rosso accordo tra le letture entro il 20 %; in grassetto stime della concentrazione in disaccordo

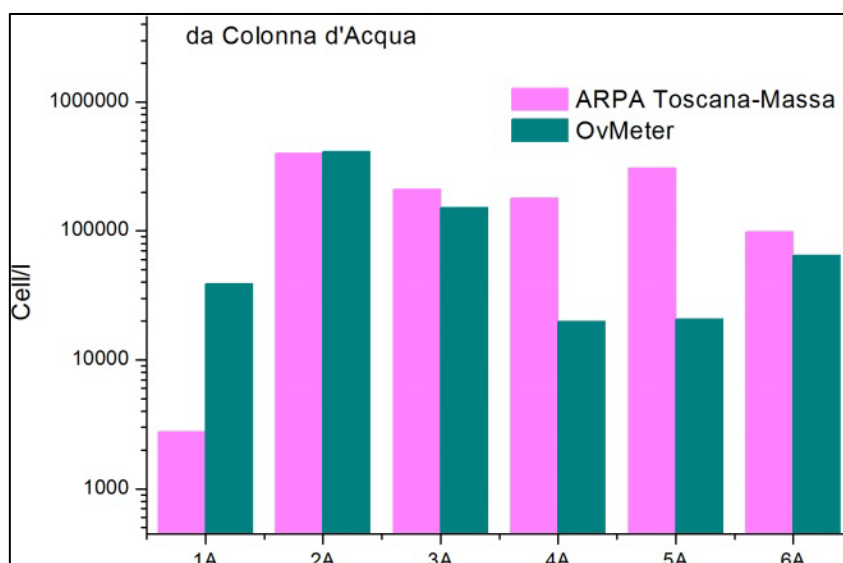


Figura 5.7 - ARPA Toscana – Sezione di Massa: confronto tra lettura manuale standard (operatore ARPA) e automatizzata (Optoelettronico) per i campioni d'acqua.

Tabella 5.8 - Dati ARPA Lazio – Sezione di Roma: *Ostreopsis ovata* in campioni di macroalga (lettura manuale e automatizzata).

Codice Campione	Operatore ARPA (cell/g fw)	Strumento Optoelettronico (cell/g fw)	Manuale su immagini (cell/g fw)
Ostr_1 B	219970	218610	225418
Ostr_2 B	52889	72478	96734
Ostr_3 B	135323	360690	370495

In rosso accordo tra le letture entro il 20 %; in grassetto stime della concentrazione in disaccordo

Tabella 5.9 - Dati ARPA Lazio – Sezione di Roma: *Ostreopsis ovata* in campioni d'acqua (lettura manuale e automatizzata).

Codice Campione	Operatore ARPA (cell/l)	Strumento Optoelettronico (cell/l)	Manuale su immagini (cell/l)
Ostr_1 A	32000	20259	20460
Ostr_2 A	13080	10353	11247
Ostr_3 A	8040	7088	6977

In rosso accordo tra le letture entro il 20 %

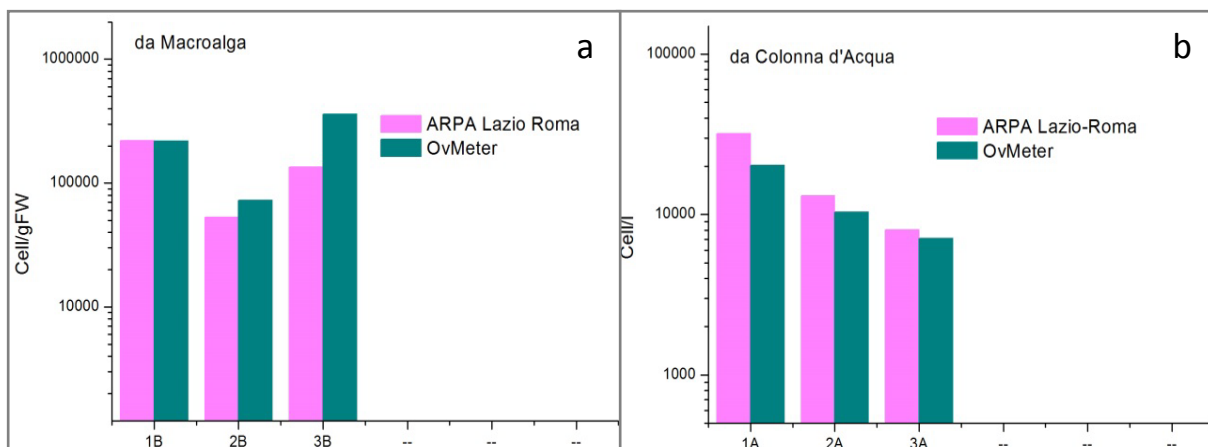


Figura 5.8 - ARPA Lazio – Sezione di Roma: confronto tra lettura manuale standard (operatore ARPA) e automatizzata (Optoelettronico) per i campioni di macroalga e colonna d'acqua.

Tabella 5.10 - Dati ARPA Lazio – Sezione di Latina: *Ostreopsis ovata* in campioni d'acqua (lettura manuale e automatizzata).

Codice Campione	Operatore ARPA (cell/l)	Strumento Optoelettronico (cell/l)	Manuale su immagini (cell/l)
Ostr_1 A	141140	62118	69340
Ostr_2 A	20900	12462	14071
Ostr_3 A	3820	1923	1945

In grassetto stime della concentrazione in disaccordo

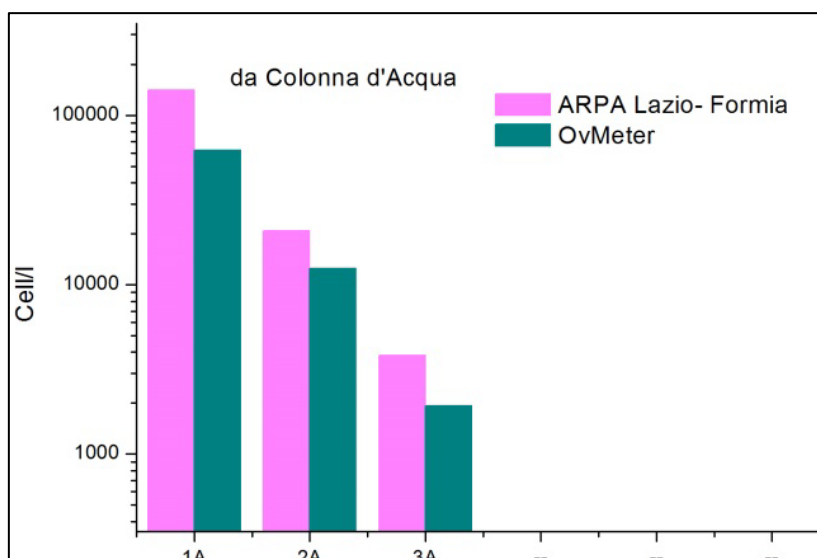


Figura 5.9 - ARPA Lazio – Sezione di Latina: confronto tra lettura manuale standard (operatore ARPA) e automatizzata (Optoelettronico) per i campioni di macroalga e colonna d'acqua.

Tabella 5.11 - Dati ARPA Campania: *Ostreopsis ovata* in campioni di macroalga (lettura manuale e automatizzata)

Codice Campione	Operatore ARPA (cell/g fw)	Strumento Optoelettronico (cell/g fw)	Manuale su immagini (cell/g fw)
Ostr_1 B	54795	58982	78554
Ostr_2 B	23665	2654	11333
Ostr_3 B	3715	2750	2243

In rosso accordo tra le letture entro il 20 %; in grassetto stime della concentrazione in disaccordo

Tabella 5.12 - Dati ARPA Campania: *Ostreopsis ovata* in campioni d'acqua (lettura manuale e automatizzata)

Codice Campione	Operatore ARPA (cell/l)	Strumento Optoelettronico (cell/l)	Manuale su immagini (cell/l)
Ostr_1 A	39362	56774	66076
Ostr_2 A	280	635	353

In rosso accordo tra le letture entro il 20 %; in grassetto stime della concentrazione in disaccordo

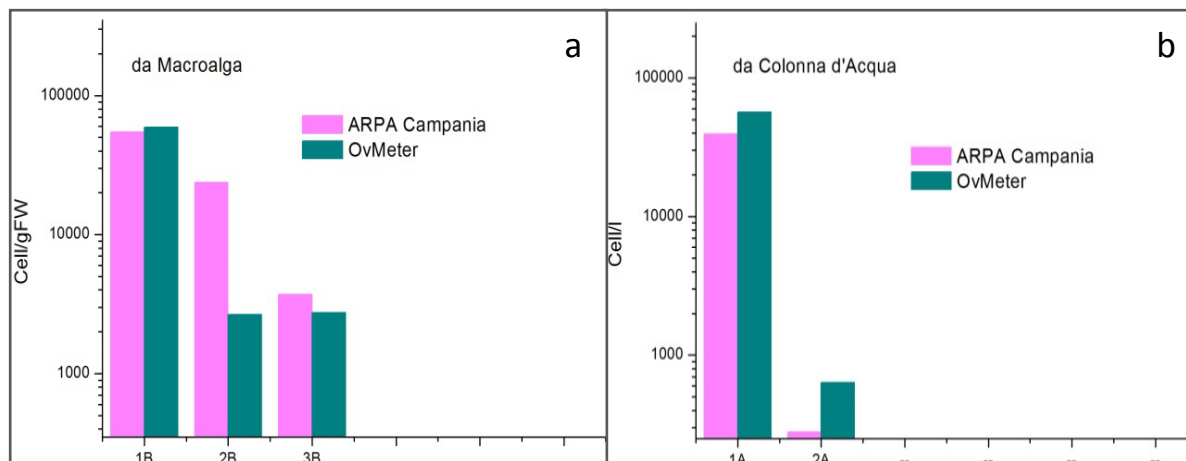


Figura 5.10 - ARPA Campania: confronto tra lettura manuale standard (operatore ARPA) e automatizzata (Optoelettronico) per i campioni di macroalga e colonna d'acqua

Tabella 5.13 - Dati ARPA Calabria: *Ostreopsis ovata* in campioni di macroalga (lettura manuale e automatizzata)

Codice Campione	Operatore ARPA (cell/g fw)	Strumento Optoelettronico (cell/g fw)	Manuale su immagini (cell/g fw)
Ostr_1 B	107	37	56
Ostr_2 B	1473	6810	9291
Ostr_3 B	6878	10159	12442
Ostr_4 B	1545	626	356
Ostr_5 B	1124	665	125

In grassetto stime della concentrazione in disaccordo

Tabella 5.14 - Dati ARPA Calabria: *Ostreopsis ovata* in campioni d'acqua (lettura manuale e automatizzata)

Codice Campione	Operatore ARPA (cell/l)	Strumento Optoelettronico (cell/l)	Manuale su immagini (cell/l)
Ostr_1 A	1120	164	97
Ostr_2 A	3360	2437	2281
Ostr_3 A	3520	10711	8743
Ostr_4 A	2680	13394	3913
Ostr_5 A	1720	1730	1689

In rosso accordo tra le letture entro il 20 %; in grassetto stime della concentrazione in disaccordo

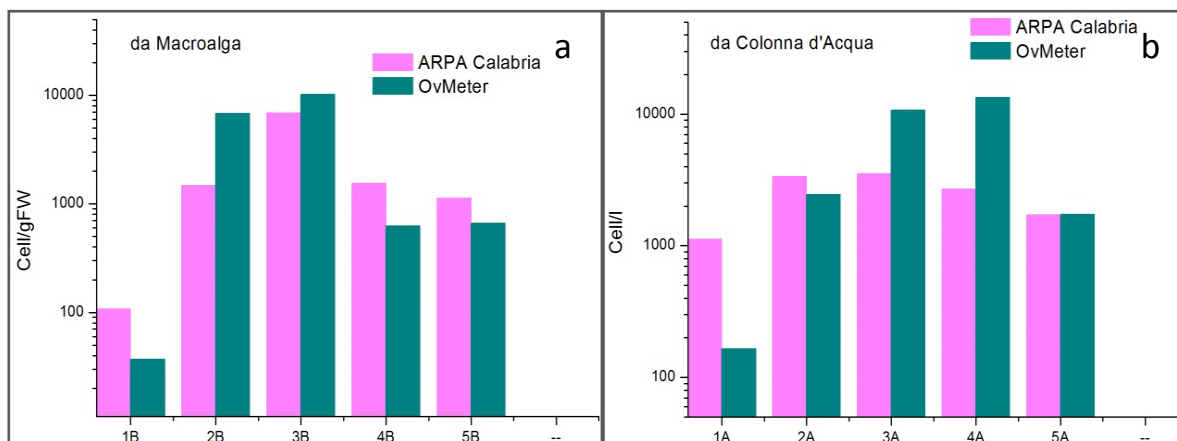


Figura 5.11 - ARPA Calabria: confronto tra lettura manuale standard (operatore ARPA) e automatizzata (Optoelettronico) per i campioni di macroalga e colonna d'acqua.

Tabella 5.15 - Dati ARPA Basilicata: *Ostreopsis ovata* in campioni d'acqua (lettura manuale e automatizzata)

Codice Campione	Operatore ARPA (cell/l)	Strumento Optoelettronico (cell/l)	Manuale su immagini (cell/l)
Ostr_1 A	0	741	0
Ostr_2 A	0	565	0
Ostr_3 A	0	494	0
Ostr_4 A	0	424	0
Ostr_5 A	0	212	0
Ostr_6A	0	353	0

In grassetto stime della concentrazione in disaccordo

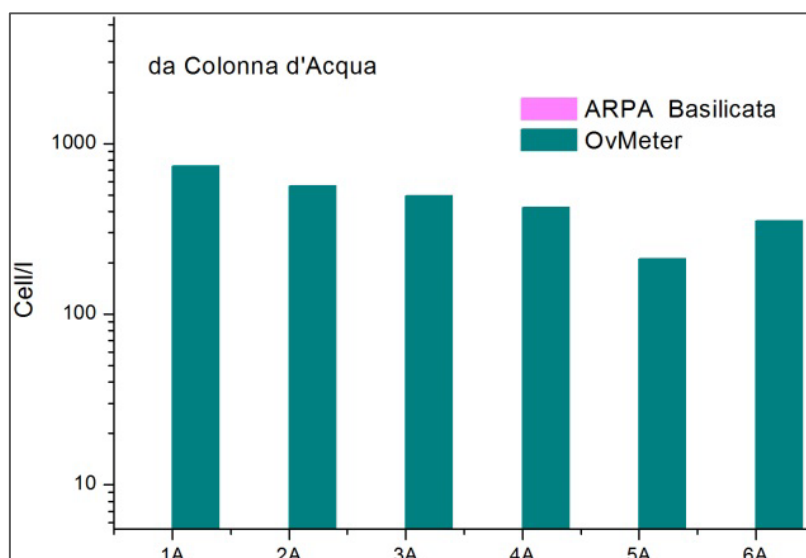


Figura 5.12 - ARPA Basilicata: confronto tra lettura manuale standard (operatore ARPA) e automatizzata (Optoelettronico) per i campioni d'acqua.

Tabella 5.16 - Dati ARPA Puglia: *Ostreopsis ovata* in campioni di macroalga (lettura manuale e automatizzata)

Codice Campione	Operatore ARPA (cell/g fw)	Strumento Optoelettronico (cell/g fw)	Manuale su immagini (cell/g fw)
Ostr_1 B	4839	280	-
Ostr_2 B	20435	56091	64763
Ostr_3 B	2255	3504	3904
Ostr_4 B	2162	2360	2524
Ostr_5 B	7391	9139	9209

In rosso accordo tra le letture entro il 20 %; in grassetto stime della concentrazione in disaccordo

Tabella 5.17 - Dati ARPA Puglia: *Ostreopsis ovata* in campioni d'acqua (lettura manuale e automatizzata)

Codice Campione	Operatore ARPA (cell/l)	Strumento Optoelettronico (cell/l)	Manuale su immagini (cell/l)
Ostr_1 A	57120	97942	101200
Ostr_2 A	18520	26283	21004
Ostr_3 A	78502	29864	35195
Ostr_4 A	1040	1942	1165
Ostr_5 A	19160	17050	17085

In grassetto stime della concentrazione in disaccordo

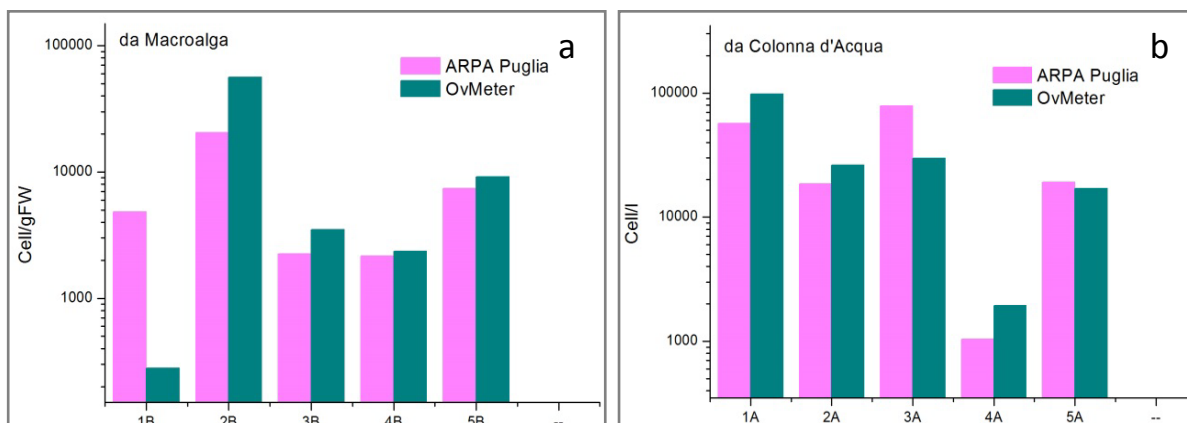


Figura 5.13 - ARPA Puglia: confronto tra lettura manuale standard (operatore ARPA) e automatizzata (Optoelettronico) per i campioni di macroalga e colonna d'acqua.

Tabella 5.18 - Dati ARPA Molise: *Ostreopsis ovata* in campioni di macroalga (lettura manuale e automatizzata)

Codice Campione	Operatore ARPA (cell/g fw)	Strumento Optoelettronico (cell/g fw)	Manuale su immagini (cell/g fw)
Ostr_1 B	0	325	0
Ostr_2 B	0	0	0
Ostr_3 B	0	414	0

In grassetto stime della concentrazione in disaccordo

Tabella 5.19 - Dati ARPA Molise: *Ostreopsis ovata* in campioni d'acqua (lettura manuale e automatizzata)

Codice Campione	Operatore ARPA (cell/l)	Strumento Optoelettronico (cell/l)	Manuale su immagini (cell/l)
Ostr_1 A	0	1236	0
Ostr_2 A	0	424	0

In grassetto stime della concentrazione in disaccordo

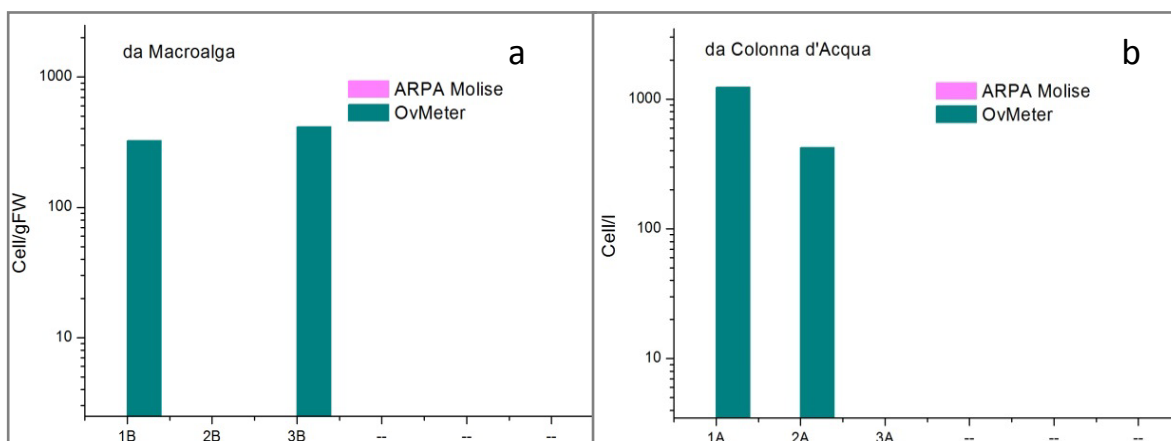


Figura 5.14 - ARPA Molise: confronto tra lettura manuale standard (operatore ARPA) e automatizzata (Optoelettronico) per i campioni di macroalga e colonna d'acqua.

Tabella 5.20 - Dati ARPA Marche: *Ostreopsis ovata* in campioni di macroalga (lettura manuale e automatizzata)

Codice Campione	Operatore ARPA (cell/g fw)	Strumento Optoelettronico (cell/g fw)	Manuale su immagini (cell/g fw)
Ostr_1 B	17	206	13
Ostr_2 B	16841	48776	58854
Ostr_3 B	5438	53907	72390

In grassetto stime della concentrazione in disaccordo

Tabella 5.21 - Dati ARPA Marche: *Ostreopsis ovata* in campioni d'acqua (lettura manuale e automatizzata)

Codice Campione	Operatore ARPA (cell/l)	Strumento Optoelettronico (cell/l)	Manuale su immagini (cell/l)
Ostr_1 A	420	2102	470
Ostr_2 A	6129000	2478891	2679259
Ostr_3 A	6860000	3656275	5269860

In grassetto stime della concentrazione in disaccordo

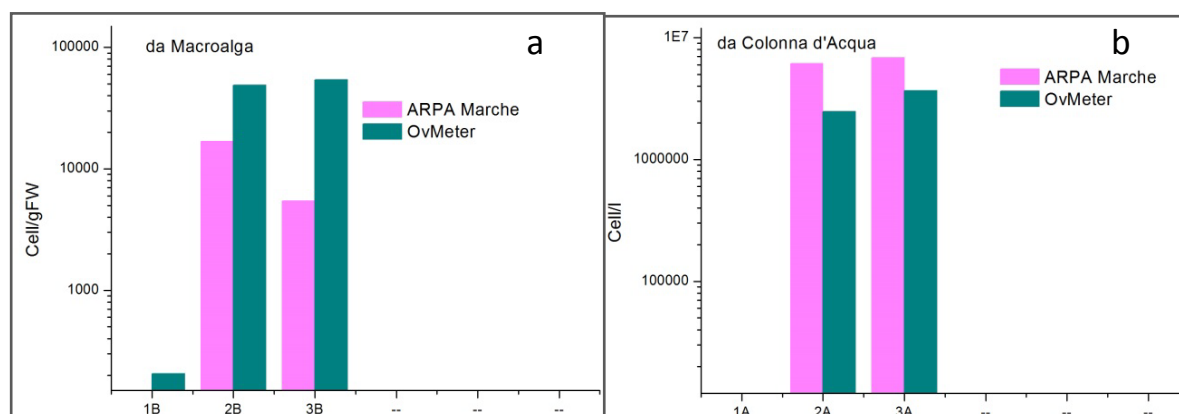


Figura 5.15 - ARPA Marche: confronto tra lettura manuale standard (operatore ARPA) e automatizzata (Optoelettronico) per i campioni di macroalga e colonna d'acqua.

Tabella 5.22 - Dati ARPA Veneto: *Ostreopsis ovata* in campioni di macroalga (lettura manuale e automatizzata)

Codice Campione	Operatore ARPA (cell/g fw)	Strumento Optoelettronico (cell/g fw)	Manuale su immagini (cell/g fw)
Ostr_1 B	0	0	0
Ostr_2 B	0	268	0
Ostr_3 B	0	296	0
Ostr_4 B	0	0	0

In grassetto stime della concentrazione in disaccordo

Tabella 5.23 - Dati ARPA Veneto: *Ostreopsis ovata* in campioni d'acqua (lettura manuale e automatizzata)

Codice Campione	Operatore ARPA (cell/l)	Strumento Optoelettronico (cell/l)	Manuale su immagini (cell/l)
Ostr_1 A	0	424	106
Ostr_2 A	0	424	0
Ostr_3 A	0	212	0
Ostr_4 A	0	1377	1341

In grassetto stime della concentrazione in disaccordo

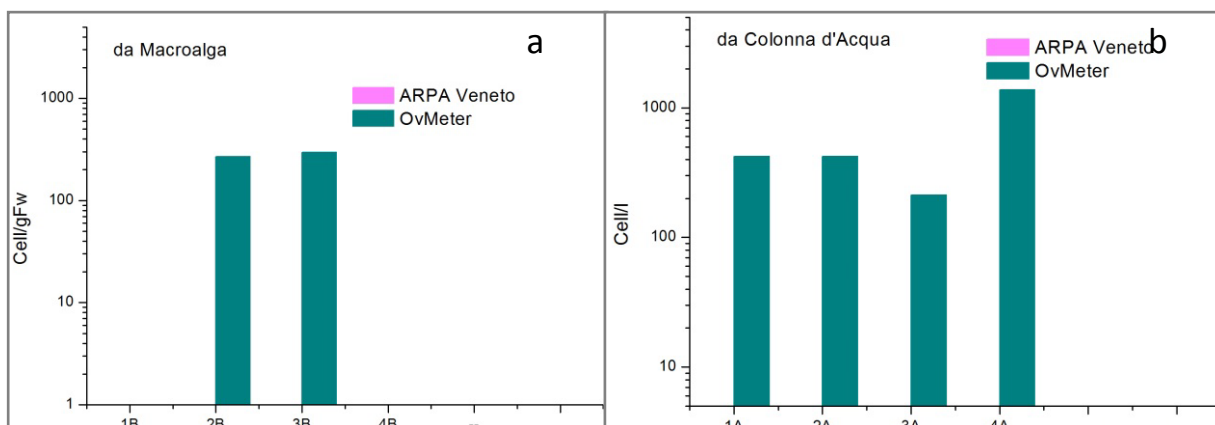


Figura 5.16 - ARPA Veneto: confronto tra lettura manuale standard (operatore ARPA) e automatizzata (Optoelettronico) per i campioni di macroalga e colonna d'acqua.

Tabella 5.24 - Dati ARPA Friuli Venezia Giulia: *Ostreopsis ovata* in campioni di macroalga (lettura manuale e automatizzata)

Codice Campione	Operatore ARPA (cell/g fw)	Strumento Optoelettronico (cell/g fw)	Manuale su immagini (cell/g fw)
Ostr_1 B	0	4036	190
Ostr_2 B	0	8646	0
Ostr_3 B	14326	15437	13400
Ostr_4 B	13241	12152	12427
Ostr_5 B	5752	5745	7288

In rosso accordo tra le letture entro il 20 %; in grassetto stime della concentrazione in disaccordo

Tabella 5.25 - Dati ARPA Friuli Venezia Giulia: *Ostreopsis ovata* in campioni d'acqua (lettura manuale e automatizzata)

Codice Campione	Operatore ARPA (cell/l)	Strumento Optoelettronico (cell/l)	Manuale su immagini (cell/l)
Ostr_1 A	0	648	22
Ostr_2 A	0	850	0
Ostr_3 A	1600	1306	1239
Ostr_4 A	2260	1765	1483
Ostr_5 A	2880	3989	2224

In rosso accordo tra le letture entro il 20 %; in grassetto stime della concentrazione in disaccordo

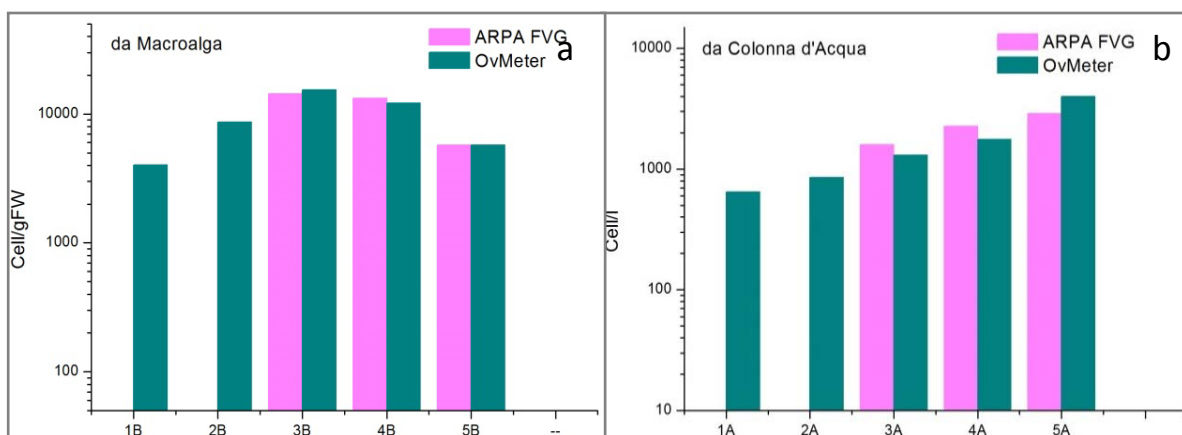


Figura 5.17 - ARPA Friuli Venezia Giulia: confronto tra lettura manuale standard (operatore ARPA) e automatizzata (Optoelettronico) per i campioni di macroalga e colonna d'acqua.

5.2 Campioni ARPA Liguria

Durante il monitoraggio delle fioriture di *O. ovata* per la stagione estiva 2016 (giugno – settembre), il dipartimento ARPA Liguria di La Spezia ha ospitato un prototipo del suo sistema ottico motorizzato (Optoelettronico) con lo scopo di confrontare il suo sistema di identificazione e conteggio automatico con il metodo standard svolto da un operatore esperto. Per lo svolgimento di questa attività sperimentale sono stati scelti tre siti, tra i 13 previsti dal piano di monitoraggio, rappresentativi della costa ligure, in particolare:

- S. Stefano (Imperia): sito molto frequentato per la balneazione, caratterizzato da fondale sabbioso che facilmente si risospinge nell'acqua) e dalla presenza di barriere frangiflutti;
- Chiavari (Genova): sito molto frequentato per la balneazione, caratterizzato da fondale con sabbia grossolana e ciottoli e dalla presenza di barriere frangiflutti. Negli anni passati sono state riscontrate fioriture algali abbondanti.
- Fiascherino (La Spezia): sito frequentato per la balneazione, caratterizzato da insenature con fondale misto (sabbia, roccia e macrofite).

I campioni sia di acqua di mare che di lavaggio da macroalga, raccolti nei siti sopra indicati e processati secondo il protocollo previsto dalle Linee Guida del 2007 (aggiornate nel 2014; Funari *et al.*, 2014), sono stati depositati su camere di sedimentazione Utermöhl; gli stessi vetrini, quindi, sono stati conteggiati prima mediante il microscopio ottico invertito da un operatore e, successivamente, attraverso il sistema automatico Optoelettronico.

In generale, i conteggi ottenuti dai due metodi relativi ai campioni di acqua di mare per i siti di Fiascherino (Tab 5.26 e Fig 5.18) e Chiavari (Tab. 5.27 e Fig. 5.19) hanno evidenziato lo stesso andamento della fioritura algale; tale risultato, riscontrabile soprattutto nel range di concentrazione d'interesse (1000 cell/l – 100 000 cell/l), può essere considerato positivo, riportando un valore di correlazione pari a 0.91 (Fig. 5.20).

Per quanto riguarda i campioni derivanti dal lavaggio da macroalghe, caratterizzati spesso da una maggiore presenza di sedimento e biodiversità di organismi, il sistema automatizzato ha riscontrato diverse difficoltà nel riconoscimento della specie target. In particolare, per quanto riguarda i siti di Chiavari e S. Stefano, spesso non è stato possibile analizzare il campione con Optoelettronico, per tanto tali dati non sono stati riportati.

Tabella 5.26 - Dati ARPA Liguria - Sito Fiascherino: *Ostreopsis ovata* in campioni d'acqua (lettura manuale e automatizzata)

Sito	Data	ARPAL (cell/l)	Optoelettronico (cell/l)	ARPAL (cell/g fw)	Optoelettronico (cell/g fw)
Fiascherino (La Spezia)	23-giu	20	242	27	463
	07-lug	220	896	2696	2444
	22-lug	17080	9558	18834	11070
	05-ago	840	1332	424	434
	19-ago	360	1361	n.d.	n.d.
	02-set	460	993	20693	8523

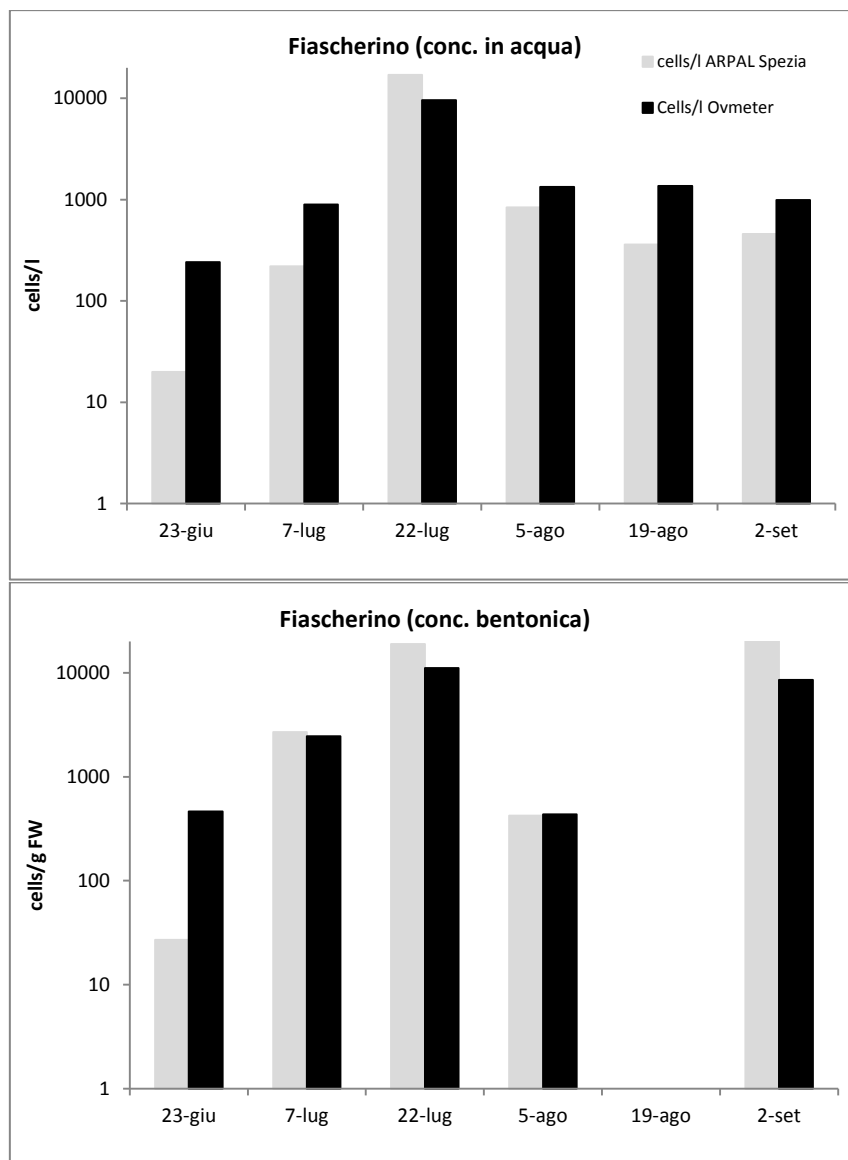


Figura 5.18 - ARPA Liguria: confronto tra lettura manuale standard (operatore ARPA in grigio) e automatizzata (Optoelettronico in nero) per i campioni di macroalga e colonna d'acqua.

Tabella 5.27 - Dati ARPA Liguria - Sito Chiavari: *Ostreopsis ovata* in campioni d'acqua (lettura manuale e automatizzata)

Sito	Data	ARPAL (cell/l)	Optoelettronico (cell/l)
Chiavari (Genova)	15-giu	60	630
	29-giu	580	630
	07-lug	19320	12984
	21-lug	2820	2982
	01-ago	5440	7582
	06-set	180	775

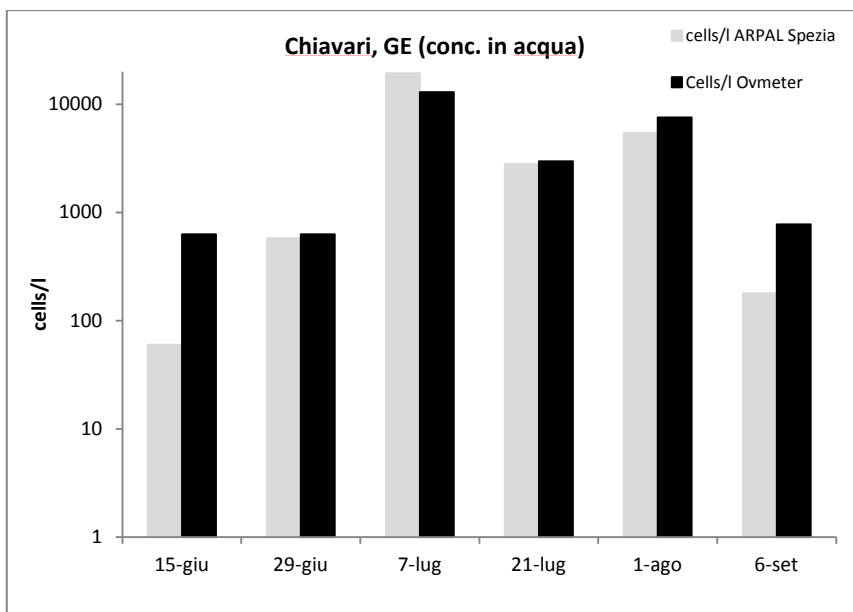


Figura 5.19 - ARPA Liguria - Sito Chiavari: confronto tra lettura manuale standard (operatore ARPA in grigio) e automatizzata (Optoelettronico in nero) per i campioni d'acqua.

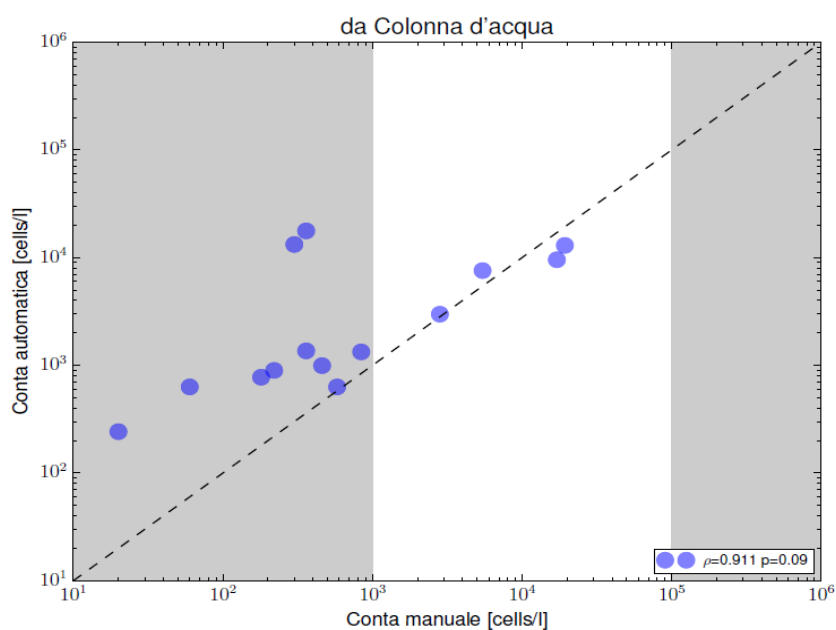


Figura 5.20 - Correlazione tra i valori di concentrazione di *Ostreopsis ovata* ottenuti con il metodo di conteggio standard "Conta manuale" e il sistema Optoelettronico "Conta automatica". In bianco viene evidenziato il range di interesse (1000 cell/l – 100 000 cell/l); ρ : coefficiente di correlazione di Pearson.

6. CONCLUSIONI

Sulla base dei risultati ottenuti e della loro discussione e valutazione, il GdL “Valutazione del sistema automatico di identificazione e conteggio di cellule di *Ostreopsis ovata*” ha tratto le seguenti conclusioni.

Considerato che:

- ❖ in generale, a basse concentrazioni lo strumento sovrastima le densità cellulari, mentre ad alte concentrazioni le sottostima;
- ❖ i risultati correlano bene nell’intervallo $10^3 - 10^5$, ovvero nell’intervallo di concentrazioni definite di bloom, ovvero di rilevanza per mettere in atto misure di allerta;
- ❖ lo strumento non conta le cellule di piccole dimensioni, quelle che non sono perfettamente colorate, le cellule che si trovano ai bordi del campo di lettura, le cellule non integre e le cellule aggregate o sovrapposte. L’operatore esperto invece riconosce e conta anche queste tipologie di cellule (causa di sottostima da parte di OPR);
- ❖ lo strumento riconosce come *O. ovata* materiale che simula la forma della microalga (causa di sovrastima da parte di OPR);
- ❖ sia lo strumento che l’operatore hanno difficoltà in caso di campioni molto “sporchi” che possono però essere diluiti dall’operatore;
- ❖ il tempo che intercorre tra il campionamento e la lettura automatizzata sembra non influenzare il risultato, come dimostrato dall’attività parallela presso l’ARPA Liguria, le cui analisi (manuale e automatica) venivano effettuate a breve distanza di tempo dal campionamento;
- ❖ per quanto riguarda il test TOE, si è concordato, piuttosto che ripetere l’esercizio, di escludere dall’elaborazione dei dati le immagini sui bordi, riconosciute dall’operatore esperto ma non dalla macchina per verificare se i risultati concordano;
- ❖ esiste la possibilità di estendere l’analisi automatizzata ad altre specie d’interesse fornendo una libreria di immagini adeguata per l’addestramento dello strumento;

si può concludere che i risultati derivanti dall’attività del GdL abbiano efficacemente consentito di effettuare la valutazione del sistema opto-elettronico applicato al monitoraggio nazionale. La macchina può supportare l’operatore nelle attività di monitoraggio consentendogli un risparmio di tempo a fronte di un numero maggiore di campioni da analizzare. Le criticità evidenziate sono risultate facilmente superabili. Inoltre l’adozione di un metodo di misura della concentrazione di *Ostreopsis ovata* deve tenere conto che il dato è alla base delle attività e delle misure gestionali previste nel piano di sorveglianza contenute nell’All. C del DM 30 marzo 2010 e nell’aggiornamento delle stesse Linee guida del Min. Salute contenute nel Rapporto ISTISAN 14/19. Ad oggi, i valori di riferimento a tutela della salute umana sono abbondanze di ≥ 10000 cell/l (DM 30 marzo 2010) e di ≥ 30000 cell/l (proposto nel Rapporto ISTISAN 14/19). **ISPRA pertanto ritiene di aggiornare i Protocolli Operativi (2012), inserendo questa nuova metodica di riconoscimento e conta automatica di cellule di *O. ovata*, come ulteriore sistema di analisi quali-quantitativa.**

Al fine di fornire opportuni strumenti di informazione e di una maggiore divulgazione si è concordato di elaborare una brochure come SNPA, in particolare per le amministrazioni comunali impegnate nella gestione dei fenomeni delle fioriture e di effettuare la divulgazione anche su piattaforme social a disposizione.

ISPRA, come concordato, ha pubblicato sul sito web il video elaborato nell’ambito del progetto M3-HABs su *Ostreopsis ovata* e le sue problematiche.

7. BIBLIOGRAFIA

- Asnaghi V., Bertolotto R., Giussani V., Mangialajo L., Hewitt J., Thrush S., Moretto P., Castellano M., Rossi A., Povero P., Cattaneo-Vietti R., 2012. Interannual variability in *Ostreopsis ovata* bloom dynamic along Genoa coast (North-Western Mediterranean): a preliminary modeling approach. *Cryptogam. Algal.*, **33**: 181–89.
- Asnaghi V., Pecorino D., Ottaviani E., Pedroncini A., Bertolotto R. M., Chiantore M., 2017. A novel application of an adaptable modeling approach to the management of toxic microalgal bloom events in coastal areas. *Harmful Algae*, **63**:184-192.
- Bertolotto R., Borrello P., Di Girolamo I., Ercolessi M., Magaletti E., Milandri M., Penna A., Pompei M., Scanu G., Spada E., Totti C., Ungaro N., Zingone A., 2014. Presenza di *Ostreopsis ovata* e altre microalghe bentoniche potenzialmente tossiche nelle acque costiere italiane. *Rapporti ISTISAN* 14/19 p. 13-20.
- Breiman L., 2001. Random Forests. *Mach. Learn.*, 45: 5–32.
- D.Lgs. 30 Maggio 2008, N. 116. Attuazione della Direttiva 2006/7/CE relativa alla gestione della qualità delle acque di balneazione e abrogazione della Direttiva 76/160/CEE. Gazzetta Ufficiale N. 155, 4 luglio 2008.
- Decreto Ministero della Salute 30 marzo 2010. Definizione dei criteri per determinare il divieto di balneazione, nonché modalità e specifiche tecniche per l'attuazione del decreto legislativo 30 maggio 2008, n. 116, di recepimento della direttiva 2006/7/CE, relativa alla gestione della qualità delle acque di balneazione. *Supplemento ordinario alla G.U.* n. 119 del 24 maggio 2010.
- Decreto Legislativo 30 maggio 2008 n. 116 - Attuazione della direttiva 2006/7/CE relativa alla gestione della qualità delle acque di balneazione e abrogazione della direttiva 76/160/CEE. *G. U. Serie Generale* n. 155 del 4 7-2008.
- Mangialajo L., Bertolotto R., Cattaneo -Vietti R., Chiantore M., Grillo C., Lemee R., Melchiorre N., Moretto P., Povero P., Ruggieri N., 2008. The Toxic Benthic Dinoflagellate *Ostreopsis ovata*: quantification of proliferation along the coastline of Genoa, Italy. *Mar. Poll. Bull.*, **56**(6): 1209-1214.
- 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-Mirailles F., Maso M., Rene A., Rossi A.M., Montserat Sala M., Thibaut T., Totti C., Vila M., Lemée R., 2011. Trends in *Ostreopsis* proliferation along the northern Mediterranean coasts. *Toxicon*, **57**: 408–420.
- Mangialajo L., Fricke A., Perez-Gutierrez G., Catania D., Jauzein C., Lemee R., In Press. Benthic Dinoflagellate Integrator (Bedi): A new method for the quantification of benthic harmful algal blooms. *Harmful Algae*.
- Meinshausen N., 2006. Quantile Regression Forests. *J. Mach. Learn. Res.*, 7: 983–999.
- ISPRA, Rapporto n. 127, 2010 - Monitoraggio di *Ostreopsis ovata* e altre microalghe potenzialmente tossiche lungo le coste italiane nel triennio 2007-2009. www.isprambiente.gov.it.
- ISPRA, Rapporto n. 148, 2011 - Monitoraggio di *Ostreopsis ovata* e altre microalghe potenzialmente tossiche lungo le aree marino-costiere italiane. Anno 2010. www.isprambiente.gov.it.
- ISPRA, Rapporto n. 173, 2012 - *Ostreopsis ovata* lungo le coste italiane: monitoraggio 2011. www.isprambiente.gov.it.
- ISPRA, Rapporto n. 188, 2013 - Monitoraggio e sorveglianza delle fioriture di *Ostreopsis ovata* lungo le coste italiane. Anno 2012. www.isprambiente.gov.it.
- ISPRA, Rapporto n. 211, 2014 - Monitoraggio della microalga potenzialmente tossica *Ostreopsis ovata* lungo le coste italiane. Anno 2013. www.isprambiente.gov.it.
- ISPRA, Rapporto n. 232, 2015 - Monitoraggio della microalga potenzialmente tossica *Ostreopsis cf. ovata* lungo le coste italiane - Anno 2014. Linea di attività ISPRA/ARPA: Fioriture algali di *Ostreopsis ovata* lungo le coste italiane. www.isprambiente.gov.it.
- ISPRA, Quaderni Ricerca Marina n. 5, 2012. Monitoraggio di *Ostreopsis ovata* e *Ostreopsis* spp.: Protocolli Operativi. www.isprambiente.gov.it.
- Istituto Superiore di Sanità, 2014. *Ostreopsis cf. ovata*: Linee Guida per la gestione delle fioriture negli ambienti marino costieri in relazione a balneazione e altre attività ricreative. A cura di Enzo Funari, Maura Manganeli ed Emanuela Testai, Iv, 118 P. *Rapporti Istisan* 14/19.
- Sbrana F., Landini E., Gjerci N., Viti F., Ottaviani E. – 2017. OVMeter: an automated 3D-integrated opto-electronic system for *Ostreopsis cf. ovata* bloom monitoring. *J. Appl. Phycol.*
- Vassalli M., Penna A., Sbrana F., Casabianca S., Gjerci N., Capellacci S., Asnaghi V., Ottaviani E., Giussani V., Lemée R., Hachani M.A, Mangialajo L., Bertolotto R., Totti C.M., Vila Reig M., Chiantore M., In Press. Intercalibration of counting methods for *Ostreopsis* spp. blooms in the Mediterranean Sea. *Ecological Indicators*.

