



ALMA MATER STUDIORUM  
UNIVERSITÀ DI BOLOGNA

Facoltà di Scienze Matematiche Fisiche e Naturali  
Corso di Laurea Magistrale in BIOLOGIA MARINA

***Monitoraggio del fitoplancton tossico e accumulo di  
biotossine marine in molluschi bivalvi della costa  
emiliano-romagnola.***

Tesi di Laurea in  
“ Monitoraggio e gestione integrata delle coste ”

**Relatore**

Chiar.mo Prof. Attilio Rinaldi

**Presentata da**

Annalisa Cecoro

**Correlatore**

Dott.ssa Marinella Pompei  
Prof.ssa Rossella Pistocchi

**II Sessione**  
**Anno Accademico**  
2011-2012

## INDICE

<b>1 INTRODUZIONE</b> .....	<b>3</b>
1.1 LE FIORITURE ALGALI.....	5
1.1.1 Caratteristiche generali .....	5
1.1.2 Harmful algal bloom .....	7
1.1.3 Incremento delle proliferazioni algali nel mondo .....	8
1.1.3.1 HABs ed eutrofizzazione .....	9
1.1.3.2 HABs e cambiamenti climatici .....	11
1.1.3.3 HABs e ballast water .....	12
1.1.4 Le biotossine marine .....	13
1.1.4.1 Paralytic Shellfish Poisoning (PSP) .....	16
1.1.4.2 Diarrhetic Shellfish Poisoning (DSP).....	17
1.1.4.3 Amnesic Shellfish Poisoning (ASP).....	22
1.1.4.4 Neurotoxic Shellfish Poisoning (NSP) .....	23
1.2 ORGANISMI RESPONSABILI DELLE BIOINTOSSICAZIONI .....	25
1.2.1 I molluschi filtratori .....	25
1.2.1.1 I Mitili: caratteri morfologici e biologici.....	26
1.2.1.2 Mitilicoltura: economia e produzione.....	31
1.3 LE NORME .....	36
1.3.1 Normativa nazionale e comunitaria .....	36
1.3.2 Regolamenti e linee guida della Regione Emilia Romagna .....	39
1.4 CARATTERIZZAZIONE DELL' AREA DI STUDIO .....	41
1.4.1 Il mare Adriatico: caratteristiche generali.....	41
1.4.2 La fascia di mare antistante l'Emilia-Romagna .....	44
1.4.2.1 La qualità delle acque marino costiere.....	44
1.4.2.2 Circolazione geostrofica e discontinuità della fascia litoranea .....	46
<b>2 SCOPO DELLA TESI</b> .....	<b>50</b>
<b>3 MATERIALI E METODI</b> .....	<b>52</b>
3.1 RACCOLTA DEI CAMPIONI.....	52
3.2 ANALISI EFFETTUATE AL CENTRO RICERCHE MARINE.....	56
3.2.1 Metodo biologico .....	57
3.2.1.1 Determinazione di tossine PSP mediante biotest.....	57
3.2.2 Metodi chimici .....	58
3.2.2.1 Determinazione di tossine ASP mediante HPLC .....	58
3.2.2.3 Determinazione di tossine liposolubili mediante LC-MS.....	61
3.3 ANALISI QUALI-QUANTITATIVA DEL FITOPLANCTON .....	64
3.4 ANALISI GRAFICA .....	69
<b>4 RISULTATI E DISCUSSIONE</b> .....	<b>70</b>
4.1 ANALISI DEL FITOPLANCTON TOSSICO .....	70
4.1.1 Analisi del fitoplancton - Ravenna.....	71
4.1.2 Analisi del fitoplancton - Cesenatico .....	72
4.1.3 Analisi del fitoplancton - Rimini .....	74
4.2 PARAMETRI TOSSICOLOGICI .....	77
4.1.1 Analisi biotossicologiche – Ravenna .....	77
4.1.2 Analisi biotossicologiche - Cesenatico .....	80
4.1.3 Analisi biotossicologiche - Rimini.....	82
4.3 SPECIE ALGALI RESPONSABILI DELLA TOSSICITÀ DEI MITILI .....	87
4.3.1 Alghe produttrici di YTXs.....	87

4.3.2 Correlazioni tra andamento delle alghe e andamento della tossicità.....	90
<b>5 CONCLUSIONI.....</b>	<b>99</b>
<b>6 BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>102</b>
<b>RINGRAZIAMENTI.....</b>	<b>115</b>

---

---

## 1 INTRODUZIONE

---

Le acque soleggiate della superficie del mare sono ricche di organismi microscopici monocellulari, che si muovono insieme ai loro piccoli consumatori erbivori (zooplancton), costituendo il plancton marino, ovvero esseri viventi che non sono in grado di opporsi al movimento delle correnti, ma che si lasciano trasportare da esse (dalla parola greca planktos = errante). Il fitoplancton è costituito da microalghe che si possono presentare isolate (forme unicellulari) o raggruppate in piccole colonie di cellule, che a seconda delle specie crescono in biomassa aumentando sia in dimensioni che in quantità. Questi organismi rivestono un ruolo basilare negli ecosistemi acquatici, in quanto figurano come i produttori primari di materia organica, rappresentando così il primo anello della catena alimentare acquatica; i pesci più piccoli, e alcune specie di alghe, utilizzano il fitoplancton come fonte di nutrimento; questi vengono ingeriti dai pesci più grandi, di cui, a loro volta si nutrono gli uomini.

La proliferazione di alghe nel plancton, definita *algal bloom*, è un fenomeno che si verifica periodicamente e in diverse parti del mondo, in concomitanza di particolari eventi climatici e ambientali, tra cui il fenomeno dell'upwelling, che rappresenta la causa principale delle "acque colorate" in tutto il mondo (Ade *et al.*, 2003). La densità cellulare può essere così alta che le acque diventano in alcuni casi rosse (da cui il termine "maree rosse") ma anche verdi o marroni. Alcune fioriture possono dar vita a spettacoli di rara bellezza (Fig. 1).



**Figura 1** Fioritura di *Noctiluca scintillans*, bioluminescente di notte. Gippsland Lakes, Victoria (Australia). Foto di Phil Hart.

In particolare, vengono definiti come “*harmful algal bloom*” i fenomeni associati alla proliferazione di alghe tossiche e/o dannose (Anderson, 1994; Hallegraeff *et al.*, 1995) che in talune situazioni possono avere conseguenze preoccupanti, dal momento che causano delle severe perdite economiche per gli allevatori di molluschi, per i pescatori e per quanti fondano la propria economia sul turismo, senza contare l’ancor più grave minaccia sull’ambiente e sulla salute dell’uomo. Infatti, le microalghe, oltre che per pesci erbivori, rappresentano la principale fonte di nutrimento, per quegli organismi che si alimentano per filtrazione delle acque del mare, quali ostriche, mitili, pettini, e bivalvi in genere. Tali organismi, attraverso la loro attività di “filter-feeding”, accumulano le fitotossine nei loro tessuti commestibili, quando le fioriture di tali specie tossiche appaiono inaspettatamente in aree dove i mitili sono coltivati (Anderson, 1997; Yasumoto & Murata, 1993). Questi ultimi sono tra gli alimenti marini più consumati in tutto il mondo, e in caso di proliferazione algale tossica, finiscono per rappresentare quell’anello della catena alimentare responsabile del trasferimento della tossicità dal plancton all’uomo.

## 1.1 LE FIORITURE ALGALI

---

### 1.1.1 Caratteristiche generali

Il termine “*algal bloom*” indica il repentino aumento di una popolazione microalgale che ha trovato condizioni adatte per la crescita. In molti casi la presenza di specifiche strategie adattative e di condizioni chimico-fisiche appropriate permette ad una specie di raggiungere numeri elevati. Per dar luogo ai cambiamenti di colore dell’acqua, la proliferazione dei microrganismi deve essere notevole. I dinoflagellati conferiscono colore all’acqua con un numero di microrganismi non inferiore a un milione di cellule per litro; queste alghe, in condizioni particolarmente favorevoli, possono raggiungere densità di 60-70 milioni di cellule per litro (Vollenweider *et al.*, 1992).

Non tutte le specie tossiche marine raggiungono durante le fioriture valori numerici ragguardevoli: il ruolo nocivo che rivestono può venire rapidamente garantito dalla concentrazione delle tossine nei tessuti dei molluschi eduli filtratori, che si nutrono di plancton.

Esempio classico sono le specie del genere *Dinophysis*, quasi tutte particolarmente tossiche, che raggiungono valori di guardia già a 200 cellule per litro.

Nell’aspetto fisico direttamente visibile, una fioritura può manifestarsi con colorazione delle acque rossa, da cui il nome tradizionale di “maree rosse”, oppure bruna, verde o altro a seconda della specie che l’ha prodotta e della sua fase di crescita, mentre si possono notare filamenti, fronti mucilluginosi o masse più disperse (Fukuyo, 2006; Corsini *et al.*, 2008) (Fig. 2).



**Figura 2** Alcuni esempi di fioriture algali: da sinistra *Noctiluca scintillan*, *Lingulodinium polyedrum*, *Lepidodinium chlorophorum* (Foto Daphne ARPA ER).

I bloom algali sono fenomeni naturali che avvengono in varie parti del mondo sin da tempi antichi. Tuttavia vi sono cause scatenanti che sembrano più frequenti in certe

zone. Si ritiene che tali cause consistano in fattori naturali e antropici e dalla loro interazione. Sono pertanto implicati elementi biologici, fisici e chimici.

Una fioritura passa sempre attraverso una fase d'inizio, quindi di crescita e mantenimento e infine di dispersione (Steidinger & Garcés, 2006). L'inizio di una fioritura può dipendere da una complessità di fattori, che comprendono la natura della specie interessata, la sua biologia, il suo ciclo vitale, le interazioni con le altre specie, le variazioni di temperatura e salinità, del clima, la disponibilità di nutrienti. Il fenomeno è influenzato anche dalle attività antropiche, dall'eccessiva urbanizzazione, dal sovrasfruttamento delle risorse ittiche, dal trasferimento di specie da una zona all'altra. Meglio conosciuti sono i fattori che influenzano le fasi di mantenimento della fioritura e quelli che portano alla sua senescenza e alla dissipazione. Il mantenimento o accumulo di biomassa è dovuto a fattori fisici o chimici che aumentano la velocità di crescita e/o limitano la dispersione. Per l'aumento del numero di cellule sono tuttavia necessari i nutrienti, mentre i fattori di perdita (grazing, sedimentazione, lisi cellulare, trasporto) devono essere minori della velocità di crescita. Infine, la dispersione o terminazione del bloom può avvenire per auto-ombreggiamento e competizione intraspecifica per i nutrienti, dispersione tramite trasporto a causa delle correnti, predazione, malattie o passaggio a forme di vita quiescente, quali le cisti (Burkholder *et al.*, 2006).

Già Darwin durante il viaggio del Beagle aveva osservato una verosimile fioritura di dinoflagellati in Cile (Granéli & Turner, 2006).

La prima citazione di una proliferazione nociva risale addirittura a circa 1000 anni prima di Cristo. Nella Bibbia, infatti, nel libro dell'Esodo (7; 20-21) è riportato: "tutte le acque del fiume divennero sangue. I pesci che erano nel fiume morirono, e il fiume ristagnò, e gli Egiziani non poterono più bere l'acqua del fiume".

In seguito, uno dei primi casi fatali documentati di avvelenamento, dovuti all'ingestione di molluschi bivalvi contaminati a causa di proliferazioni algali, risale al 1793, quando il Capitano George Vancouver approdò nella Columbia britannica, e molti uomini del suo equipaggio morirono in seguito a paralisi e soffocamento, dopo aver ingerito frutti di mare raccolti in una zona oggi conosciuta come "Poison Cove". Il Capitano, in seguito, osservò che per gli aborigeni fosse una sorta di tabù mangiare molluschi quando l'acqua del mare appariva "colorata". Solo molti anni dopo le sostanze responsabili di tale contaminazione furono identificate e denominate PSP dall'inglese *Paralytic Shellfish Poisoning*, alcaloidi così potenti, che una quantità di circa 500 µg, facilmente accumulabile in soli 100 gr di molluschi, può rivelarsi fatale per l'uomo.

Da allora, molti episodi simili sono stati registrati nel Nord America e nel mondo intero, fino ai giorni d'oggi, in cui, oltre 2000 casi di avvelenamento umano (fatali nel 15% dei casi), sono annualmente registrati in tutto il globo, in seguito al consumo di pesci o molluschi. Appare, così, evidente l'entità del danno economico conseguente ad una riduzione del consumo di alimenti marini e della loro esportazione.

### **1.1.2 Harmful algal bloom**

Dalla prima Conferenza Internazionale sulla Fioritura di Dinoflagellati Tossici, svoltasi a Boston nel 1974, la dicitura tradizionale di "red tide" è stata sostituita dal termine Harmful Algal Blooms (HABs) (LoCicero, 1975). Andersen (1996) definisce *harmful algal blooms* gli eventi in cui le concentrazioni di una o più alghe tossiche raggiungono livelli tali da arrecare danno ad altri organismi marini, causando la morte di pesci e molluschi, oppure accumulandosi lungo la catena trofica fino a giungere all'uomo come consumatore finale.

In termini di effetti dannosi, si considerano due principali tipologie di organismi responsabili: i produttori di elevata biomassa e i produttori di tossine (Masò & Garcés, 2006).

L'esplosione di elevata biomassa algale produce ripercussioni sull'ecologia dell'ecosistema. In pochi giorni gli individui si riproducono e diventano l'elemento dominante della comunità ecologica, raggiungendo numeri dell'ordine di grandezza anche di decine di migliaia di cellule per litro, provocando danni alla fauna acquatica a causa della formazione di ambienti anossici e impattando sulle attività ricreative costiere con discolorazioni dell'acqua, produzione di schiume, muco e cattivi odori (Granéli & Turner, 2006; Corsini *et al.*, 2008).

Gli organismi produttori di tossine, invece, possono dare origine a fenomeni pericolosi per la salute dell'uomo e dell'ecosistema marino anche quando la densità cellulare non è abbastanza elevata da colorare l'acqua (Burkholder *et al.*, 2006; Poletti, 2007) e il fatto che eventi tossici possano essere prodotti da una bassa concentrazione degli organismi che ne sono causa, implica una difficoltà nei programmi di monitoraggio della salute umana (Masò & Garcés, 2006).

Inoltre, il bloom può essere formato da specie che, unitamente ad un'eccessiva produzione di biomassa, emettono tossine capaci di causare problemi all'uomo, direttamente o tramite la catena trofica. (Granéli & Turner, 2006; Corsini *et al.*, 2008).



Le specie algali tossiche appartengono principalmente ai taxa delle diatomee e dei dinoflagellati; gli altri taxa sono molto meno rappresentati, sia quantitativamente che qualitativamente, e la loro presenza è legata a condizioni particolari.

Le fioriture di alghe dannose, a seconda degli effetti da esse prodotti, possono essere classificate nel seguente modo ( Andersen, 1996):

- a) fioriture di specie che provocano soltanto una colorazione dell'acqua, con diminuzione della visibilità e della qualità estetica ed eventuale moria di pesci e invertebrati acquatici, a causa delle conseguenti condizioni di ipossia. A questo gruppo appartengono specie di dinoflagellati (es. *Noctiluca scintillans*) e di diatomee (es. *Skeletonema costatum*);
- b) fioriture di specie che producono potenti tossine, che si accumulano lungo la catena alimentare e che possono causare effetti vari nei consumatori secondari (uomo e animali superiori). Di questo gruppo fanno parte diversi generi di dinoflagellati (*Alexandrium*, *Gymnodinium*, *Dinophysis*, *Prorocentrum*) e diatomee del genere *Pseudo-nitzschia*;
- c) fioriture di specie che nella maggior parte dei casi non sono tossiche per l'uomo, ma risultano dannose in vario modo per pesci e invertebrati (es. *Chattonella antiqua*, *Chaetoceros convolutus*);
- d) fioriture di specie produttrici di tossine che vengono trasportate nell'aerosol dall'area di fioritura fino alla costa (es. *Karenia brevis*).

### **1.1.3 Incremento delle proliferazioni algali nel mondo**

Se le proliferazioni di alghe rischiose per gli uomini sono, in senso stretto, un fenomeno del tutto naturale, nelle ultime due decadi se ne è registrato un considerevole incremento in frequenza, intensità e distribuzione geografica (Anderson *et al.*, 1989; Cosper *et al.*, 1989).

Un esempio estremo è quello del Giappone, che dal 1965 al 1975 ha visto aumentare le proprie fioriture tossiche annuali da 44 a circa 300.

Le fioriture dei dinoflagellati *Alexandrium tamarense* e *Alexandrium catenella* fino al 1970 avvenivano soltanto nelle acque temperate dell'Europa, del Nord America e del

Giappone (Sournia *et al.*, 1991); dal 1990 in poi, invece, si sono estese anche nell'emisfero meridionale, e quindi nelle acque del Sud Africa, Australia, Nuova Zelanda, India e Filippine; *Alexandrium minutum*, che, noto fino al 1988 soltanto in Egitto (Halim, 1960), è stato ora ritrovato anche in Australia, Irlanda, Francia, Spagna, Portogallo, Italia, Turchia, Tailandia, Nuova Zelanda e Giappone (Hallegraeff *et al.*, 1991; Yuki, 1994).

Con l'incremento, inoltre, dei problemi connessi alla pesca indiscriminata nelle acque costiere, molte nazioni stanno valutando i vantaggi degli allevamenti di pesci e molluschi.

Queste attività, attraverso un controllo più rigoroso delle acque, portano di conseguenza alla luce la presenza di specie tossiche mai ritrovate in passato.

Infatti, un po' dovunque si moltiplicano le comunicazioni scientifiche e sanitarie riguardanti tossine appartenenti alla classe delle PSP, DSP, NSP e ASP.

L'accresciuto numero di rilevamenti è da imputare al peggioramento delle condizioni trofiche delle coste con aumento degli scarichi umani e delle acquacolture (un allevamento di 200.000 pesci rilascia una quantità di azoto e fosforo equivalenti agli scarichi non trattati di 65.000 persone) e al concorso di mutamenti climatici straordinari da effetto serra, su cui si sono innestate le introduzioni di specie algali esotiche, come cisti quiescenti trasportate nelle stive di navi da carico o negli *stock* di pesci da allevamento.

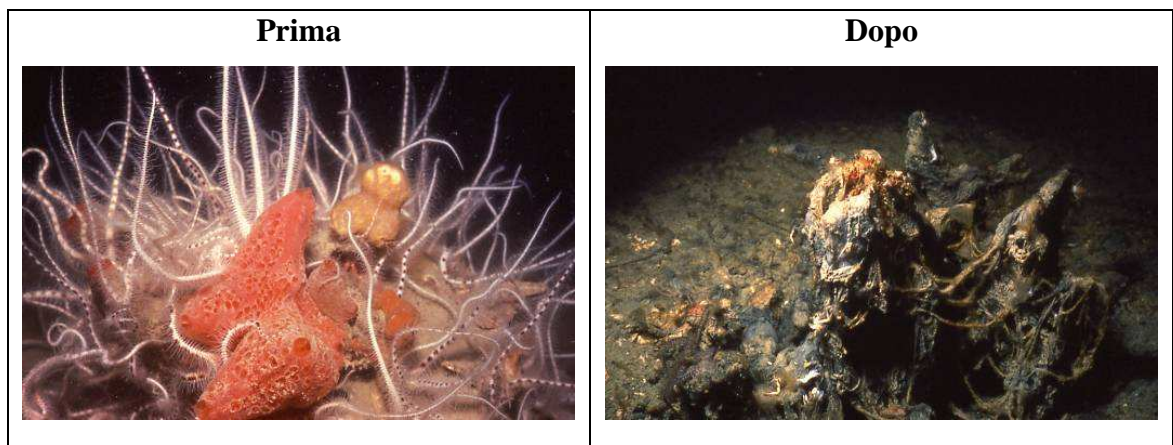
#### ***1.1.3.1 HABs ed eutrofizzazione***

Globalmente, l'eutrofizzazione è considerata una grave minaccia per il funzionamento degli ecosistemi costieri, in quanto legata all'insorgenza e all'aumento di fioriture algali nocive (HABs).

Secondo la definizione dell'OCSE (Organizzazione per la Cooperazione e lo Sviluppo Economico), "l'eutrofizzazione è un arricchimento nelle acque dei sali nutritivi che provoca cambiamenti tipici quali l'incremento della produzione di alghe e piante acquatiche, l'impoverimento delle risorse ittiche, la generale degradazione della qualità delle acque ed altri effetti che ne riducono e precludono l'uso."

Tale fenomeno è spiegato sia sulla base di cause naturali che antropogeniche (UNESCO, 1988). La principale caratteristica che distingue i due tipi di eutrofizzazione è il tempo di comparsa. Infatti, l'eutrofizzazione naturale è un processo che rientra in una scala di lungo periodo. L'eutrofizzazione antropogenica, che avviene più frequentemente nelle

aree costiere per apporto di sostanze eutrofizzanti, quali fosfati e nitrati, ad opera dell'uomo, si manifesta in tempi molto brevi, in una scala temporale di circa 10 anni. Tali sostanze eutrofizzanti sono altamente nutritive per le alghe, le quali, in loro presenza, si accrescono a dismisura producendo, per fotosintesi clorofilliana, grandi quantità di ossigeno. Subito dopo la morte, le alghe sono attaccate da batteri aerobi che le ossidano, liberando anidride carbonica. La quantità di ossigeno consumata dai batteri è più elevata se c'è molta sostanza organica da decomporre. In questo modo si crea nell'acqua una notevole diminuzione dell'ossigeno disciolto e ciò compromette la vita degli animali, soprattutto nei bacini chiusi come i laghi e nei mari poco profondi come l'Adriatico (Fig. 3).



**Figura 3** Effetti dell'anossia sugli organismi di fondo.

L'evoluzione del degrado delle acque marine del bacino nord dell'Adriatico è stata oggetto di molti studi. Particolare attenzione è stata rivolta al fenomeno dell'eutrofizzazione, che da anni affligge più o meno gravemente le acque costiere di questo bacino (Vollenweider *et al.*, 1992).

La ricorrenza di bloom algali lungo le coste emiliano-romagnole ha indotto la Regione Emilia Romagna ed il Centro Ricerche Marine di Cesenatico ad istituire, già da tempo, programmi continuativi di sorveglianza e di studio sulle cause innescanti il fenomeno. Dai dati rilevati in campo e da studi sperimentali di laboratorio sono emerse man mano indicazioni che tale degrado si deve attribuire all'apporto eccessivo di sali nutritivi. Tra questi si è visto che un ruolo predominante viene svolto dall'azoto e dal fosforo. Circa la loro origine è stata rivolta particolare attenzione al fiume Po ed al suo bacino idrografico, agli affluenti minore ed agli insediamenti costieri, in quanto produttori principali di azoto

e fosforo. In risposta a tali indicazioni, sia la Regione che il Governo centrale hanno promosso programmi di risanamento, quali la limitazione di polifosfati nei detersivi per uso domestico, per far fronte al fenomeno dell'eutrofizzazione.

Per i pericoli che possono derivare dai fenomeni di eutrofizzazione delle acque, Hong-Kong, il Giappone e diverse nazioni europee hanno deciso di ridurre gli scarichi di fosfati e di nitrati almeno del 50% nei prossimi anni: simili sforzi, tuttavia, finiscono per risultare vani, se rimangono iniziative isolate e se, cioè, i paesi vicini continuano ad inquinare le acque marine.

### ***1.1.3.2 HABs e cambiamenti climatici***

E' opinione comune presso le comunità scientifiche che anche l'effetto-serra e il riscaldamento degli oceani favoriscano lo sviluppo di particolari microalghe, come pure la migrazione di specie da certe aree geografiche verso nuove zone. Ad esempio, il ritrovamento di alcuni fossili testimonia come i progenitori del dinoflagellato *Pyrodinium bahamense*, attualmente confinato solo in alcune aree tropicali, abbia avuto in passato una distribuzione geografica ben più ampia; come, d'altro canto, non è escluso che il *Pyrodinium* nel prossimo futuro possa tornare a proliferare, ad esempio, nelle acque dell'Australia, che già un tempo colonizzava (McMimm, 1989).

Sono state, inoltre, osservate grosse coincidenze tra la proliferazione del *Pyrodinium* nelle Filippine e in Indonesia con eventi climatici particolari, quali l'ENSO (El Nino-Southern Oscillation) (Maclean, 1989). Il forte evento ENSO verificatosi tra il 1991 e il 1994 e l'incremento di fioriture di dinoflagellati nello stesso periodo tendono a confermare tale ipotesi.

L'aumento della temperatura ha modificato l'andamento climatico delle precipitazioni, concentrandole molto più nelle stagioni invernali e causando l'aumento della dilavazione dei terreni. L'assenza o la forte diminuzione delle piogge durante la primavera, l'estate e l'autunno ha come conseguenza l'aumento dei giorni di insolazione media e con temperatura superiore alla media.

Secondo le conclusioni del Rapporto del 1996 dell'*Intergovernmental Panel for Climate Change*, istituito dalla *World Meteorological Organization* e dall'*United Nations Environmental Programme*, il clima globale sta diventando via via più caldo e umido: nell'ultimo secolo le temperature medie sono aumentate di 0,3-0,6 gradi centigradi a causa dell'emissione di gas-serra come metano e anidride carbonica; a seguito di questo fenomeno le aree continentali comprese tra 40 e 70 gradi di latitudine mostrano un

aumento della temperatura media, mentre quelle a latitudini più basse presentano diminuzioni della temperatura media.

L'aumento apparentemente minimo della temperatura degli oceani sta avendo come conseguenza lo scioglimento progressivo dei ghiacci dei Poli, con diminuzione della salinità media già riscontrata in vaste aree dell'emisfero nord, come il Mar del Nord e il Mar Baltico.

Fenomeni di riscaldamento globale della Terra, o "global warming", sono noti essere avvenuti in varie ere geologiche, seguiti a volte da glaciazioni. L'intensità di questi episodi è molto variabile, così come non è regolare la loro durata.

Le prove più interessanti sulla loro frequenza nel passato sono state trovate nei carotaggi dei ghiacci antartici e artici, dove è stato riscontrato un aumento delle fioriture algali legate ai periodi di "global warming". Le caratteristiche di questi eventi sono illuminanti sul ruolo rivestito dall'intervento umano innestatosi nelle ultime "pulsazioni" naturali climatiche: mentre nelle ere passate si riscontra un aumento delle frequenze delle fioriture, nell'attuale periodo di riscaldamento aumenta anche l'intensità delle stesse con produzione di maggiore biomassa, sostenuta dalla maggior quantità di nutrienti presente nei mari a causa degli sversamenti di natura antropica.

### ***1.1.3.3 HABs e ballast water***

Infine, anche le acque di zavorra delle navi, insieme alle chiglie delle navi, vanno considerate dei probabili vettori di plancton marino da una parte all'altra del globo.

Le "ballast water" possono infatti contenere gli organismi presenti nelle aree portuali dalle quali vengono pompate (virus, batteri, fitoplancton, crostacei, molluschi, pesci), i quali possono sopravvivere durante il trasporto e così essere immessi nell'ambiente dove queste vengono scaricate. La loro sopravvivenza in questo nuovo ambiente è legata all'analogia con l'ambiente d'origine. In questo modo avviene la colonizzazione di aree geografiche da parte di nuove specie algali.

Tale problema è apparso in tutta la sua gravità negli anni '80, quando alcuni dinoflagellati tossici non indigeni sono stati introdotti nelle aree di allevamento di mitili presenti lungo le coste australiane, con disastrose conseguenze economiche (Hallegraeff & Bolch, 1992).

Enormi volumi di acque di zavorra sono in continuo movimento in tutto il mondo ed è presumibile che aumentino in futuro con la globalizzazione dei commerci. E' stato

stimato che ogni anno circolano in tutto il mondo circa 10 miliardi di tonnellate di acqua di zavorra.

Il problema dell'importazione di alghe tossiche marine, così come di altri organismi alieni, è stato ampiamente riconosciuto e documentato in vari paesi.

In Tasmania sono state campionate acque e sedimenti accumulati nelle cisterne di zavorra di grandi navi da carico e sono state rilevati oltre 300 milioni di cisti di dinoflagellati in una sola nave (Anderson & Keafer, 1985; Hallegraeff, 1998).

Al fine di ridurre i rischi associati al trasporto di specie pericolose attraverso le acque delle navi, il 1 novembre 1991 l'Organizzazione Marittima Internazionale ha ratificato alcune linee di condotta, attualmente ancora facoltative, quali il divieto di imbarcare acqua durante la fioritura di specie tossiche all'interno dei porti, o la possibilità di trattare le acque di zavorra con calore, shock elettrici o con agenti chimici (Cl<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> etc.) (Bolch & Hallegraeff, 1993).

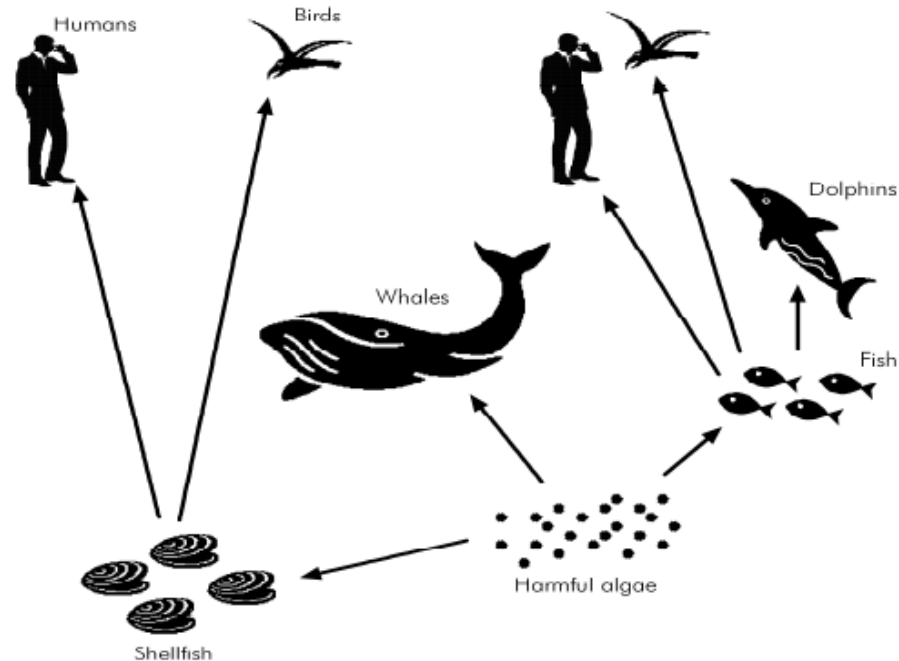
#### **1.1.4 Le biotossine marine**

Sono circa 5000 le specie algali identificate, delle quali circa 80 sono quelle che producono tossine (Andersen, 1996). Le biotossine marine sono un gruppo eterogeneo di composti chimici che determinano nell'uomo, in seguito al consumo di prodotti ittici, una serie di quadri clinici patologici noti con il termine di biointossicazioni; tali molecole vengono prodotte principalmente da organismi fitoplanctonici e fitobentonici ma anche dai batteri. Queste biomolecole manifestano il loro effetto come tali o attraverso le trasformazioni metaboliche che si possono verificare nei vari passaggi della catena alimentare. Fra le microalghe i dinoflagellati sono i principali produttori di tali composti, mentre per quanto riguarda le diatomee, attualmente solamente il genere *Pseudo-nitzschia* e la specie *Halamphora coffeaeformis*, sono noti per la sintesi di biotossine.

Non si conosce l'importanza e il ruolo delle tossine nel metabolismo delle alghe e non si capisce il perché vengano prodotte, ma è comune credere che siano dei metaboliti secondari.

Giungono all'uomo attraverso il sistema gastrointestinale (consumo di prodotti ittici crudi, cotti o lavorati), il sistema respiratorio (aerosol marino, spray) e la cute (attività di balneazione) (Poletti, 2011). Gli organismi filtratori quali molluschi e tunicati eliminano parte delle tossine assunte assieme all'acqua tramite il loro apparato escretore, ma una certa quantità permane nel loro corpo, soprattutto se l'accumulo è rapido e i produttori di tossine sono abbondanti. Dunque i vettori più comuni di biointossicazioni sono i

molluschi bivalvi, ma anche i pesci che accumulano le tossine lungo la catena alimentare (Fig. 4).



**Figura 4** Harmful algal blooms nella catena alimentare e relative vie di esposizione.

Diversi studi hanno evidenziato l'importanza dei processi di biotrasformazione delle tossine algali da parte dei molluschi e dei pesci. Infatti è stato dimostrato che il metabolismo di questi animali può modificare la struttura chimica della tossina, determinando un cambiamento dell'effetto tossico, fino a renderla 40 volte più potente (Ade *et al.*, 2003).

Le tossine algali marine possono anche provocare morie di pesci sia direttamente che in seguito ad ingestione di piccoli molluschi planctonici contaminati. I pesci sono in genere molto sensibili a queste tossine e muoiono prima che vengano raggiunte nelle loro carni concentrazioni pericolose per l'uomo (Anderson, 1994). Tuttavia alcune tossine liposolubili, come le ciguatossine, non hanno effetti significativi sui pesci ma tendono ad accumulare lungo la catena alimentare fino a raggiungere elevate concentrazioni nei grossi pesci predatori che risultano quindi tossici per l'uomo (Ade *et al.*, 2003).

Le biotossine marine, pur essendo un gruppo di composti strutturalmente diversi fra di loro, hanno alcune caratteristiche comuni. Sono insapori e inodori, stabili al calore e al trattamento con acidi, non è possibile riconoscere la loro presenza in fase di cottura e

finora non esistono antidoti (Fukuyo, 2006). Dunque la cottura dei frutti di mare o del pesce non elimina il rischio di intossicazione e i succhi gastrici dello stomaco non modificano e non eliminano la tossina, che viene in genere assorbita a livello intestinale.

Le biotossine possono essere suddivise in base alla loro solubilità in biotossine idrosolubili e biotossine liposolubili (Poletti *et al.*, 2003).

Attualmente la classificazione di questi composti è piuttosto discussa. Inizialmente le tossine sono state raggruppate in base al tipo di biointossicazione determinata:

- sindrome paralitica (PSP, paralytic shellfish poisoning),
- sindrome amnesica (ASP, amnesic shellfish poisoning),
- sindrome diarroica (DSP, diarrhetic shellfish poisoning),
- sindrome neurotossica (NSP, neurotoxic shellfish poisoning)
- ciguatera (CFP, ciguatera fish poisoning).

Tuttavia la questione è più complessa, infatti alcuni composti sono stati erroneamente inseriti in un gruppo solo per la loro presenza in concomitanza di altre tossine note, anche se i sintomi e la chimica delle molecole sono differenti.

Pertanto, la consultazione congiunta di esperti FAO/WHO/IOC sulle biotossine in molluschi bivalvi, riunitasi a Dublino nel marzo del 2004, ha proposto di classificare le tossine in otto gruppi, sulla base della loro struttura chimica (Toyofuku, 2006; FAO/WHO/IOC, 2004):

- Azaspiracido (AZA)
- Brevitossine (BTXs)
- Imine Cicliche
- Acido domoico (DA)
- Acido Okadaico (OA)
- Pectenotossine (PTXs)
- Saxitossina (STXs)
- Yessotossine (YTXs)

Relativamente alla diversità degli effetti negativi, si possono riconoscere rischi per la salute umana, impatti sugli organismi marini, impatti sul turismo e sull'uso ricreazionale delle aree costiere, danni all'ecosistema marino (Zingone & Oksfeldt Enevoldsen, 2000).



Le specie dannose appartengono non solo ai dinoflagellati e diatomee, ma anche ad altre categorie tassonomiche, quali cianofitiche, aptofitiche e rafidofitiche (Sellner *et al.*, 2003), comprendendo circa 80 specie tossiche (Fukuyo, 2006) e 200 specie nocive su un totale di circa 5000 alghe marine planctoniche finora descritte e il loro numero è in aumento (Zingone & Oksfeldt Enevoldsen, 2000).

#### **1.1.4.1 Paralytic Shellfish Poisoning (PSP)**

La sindrome paralitica da molluschi bivalvi (PSP) è una delle sindromi neurotossiche più studiate e conosciute per le gravi conseguenze che produce nei consumatori. Le tossine responsabili della sindrome sono rappresentate dalla saxitossina e dai suoi circa 21 analoghi (gonyautossine) e sono tra le neurotossine naturali più potenti finora note. Le tossine PSP agiscono sui canali del sodio bloccando il trasporto di questi ioni attraverso la membrana impedendo pertanto la trasmissione dell'impulso nervoso nei nervi periferici e nei muscoli scheletrici con conseguente paralisi respiratoria e morte (Kao, 1972). Tutte le tossine sono idrosolubili e termostabili, stabili in ambiente acido ma non alcalino (Schantz, 1961). Chimicamente i vari analoghi si distinguono in carbamiltossine, sulfocarbamiltossine, decarbamiltossine, deossidecarbamiltossine, aventi diversa tossicità (Llewellyn, 2006).

I primi casi europei di sindrome paralitica da bivalvi furono descritti nel 1885; la tossina fu isolata per la prima volta nel 1957 dal mollusco *Saxidomus giganteus* raccolto in zone costiere dell'Alaska (Schantz, 1957), ma la sua caratterizzazione chimica risale al 1975 (Bordner *et al.* 1975; Schantz *et al.*, 1975).

In ambienti marini, le STXs sono principalmente prodotte da dinoflagellati appartenenti ai generi *Alexandrium*, *Gymnodinium* e *Pyrodinium* (Lefebvre *et al.*, 2008; Oshima *et al.*, 1993; Usup *et al.*, 1994). In particolare, nelle acque temperate, le tossine idrosolubili del tipo PSP sono prodotte da specie algali appartenenti al genere *Alexandrium* quali *A. tamarense*, *A. catenella*, *A. acatenella*, *A. fundyense* e *A. minutum* (Taylor, 1984). Responsabile della produzione di PSP nei mari tropicali è invece *Pyrodinium bahamense*, var. *compressa*, mentre *Gymnodinium catenatum* ha un'ampia distribuzione geografica, che va dalla costa atlantica e mediterranea della Spagna alla costa pacifica dell'America, al Giappone, all'Australia.

Nel Mediterraneo sono presenti specie del genere *Alexandrium* e ceppi di *G. catenatum*, che producono tossine PSP.

Il pericolo di intossicazione, nella maggior parte dei casi, è associato al consumo di molluschi bivalvi che filtrano acqua contenente cellule algali tossiche, accumulando tossine nei loro tessuti, senza apparente danno per se stessi (Gainey *et al.*, 1988).

I bivalvi maggiormente responsabili di questa intossicazione nell'uomo sono *Mytilus edulis* e *Saxidomus giganteus*. Le tossine PSP vengono trasferite anche a livelli più elevati della catena alimentare, ed in particolare nei pesci (Chang *et al.*, 1997).

Nel 1989 sono stati riscontrati mitili tossici per PSP lungo le coste spagnole; nel 1994 sono comparse tossine PSP in mitili della costa emiliano-romagnola prodotte dalla dinoflagellata *Alexandrium minutum* (Poletti & Viviani, 1999).

La saxitossina è una tossina ad elevata tossicità per l'uomo, con effetti analoghi a quelli della tossina botulinica (Steidinger & Baden, 1984; WHO, 1984); la gravità dei sintomi dipende dalla quantità di tossina che è stata ingerita.

I sintomi insorgono entro 30 minuti dall'ingestione di molluschi contaminati e consistono in parestesie alla bocca, labbra, lingua, all'estremità degli arti, profonda astenia muscolare, impossibilità a mantenere la posizione eretta con perdita dell'equilibrio (Auerbach, 1988). Nei casi più gravi l'evoluzione è molto rapida e la morte avviene per arresto cardiocircolatorio in un tempo variabile dalle 2 alle 12 ore. Attualmente vi sono oltre 2000 casi di biointossicazioni l'anno (Tredici, 2006).

I pazienti che superano le prime 12-24 ore, indipendentemente dalla quantità di tossina ingerita, di solito si riprendono rapidamente; in circa il 50% dei pazienti permangono per circa tre settimane astenia e perdita di memoria. Poiché attualmente non sono disponibili antisieri efficaci contro tutte le tossine PSP, la terapia rimane essenzialmente sintomatica per combattere la paralisi respiratoria (Auerbach, 1988) e consiste nel lavaggio gastrico; nei casi più gravi si fa ricorso all'intubazione e alla ventilazione meccanica. Poiché la tossina è instabile in ambiente alcalino è utile l'utilizzo di bicarbonato di sodio (Ade *et al.*, 2003).

L'attuale normativa (Reg. CE 853/2004) ha fissato i limiti di tolleranza di 800 µg STX/kg di tessuto edibile.

#### **1.1.4.2 Diarrhetic Shellfish Poisoning (DSP)**

La sindrome diarroica da molluschi bivalvi (DSP) è una definizione proposta per una intossicazione nettamente diversa da quella PSP sia per sintomatologia che per eziologia (Yasumoto *et al.*, 1978). Si manifesta dopo il consumo di molluschi che hanno

accumulato tossine da diverse specie di dinoflagellati. Pur non essendo letale, rappresenta un importante problema sanitario.

La natura tossico-algale di questa sindrome è stata riconosciuta dopo numerosi casi diarroici a elevata morbosità che si sono verificati in Giappone alla fine degli anni settanta (Yasumoto *et al.*, 1980).

A partire dal 1980 iniziarono a registrarsi casi di DSP nei paesi europei che si affacciano sull'Atlantico e nel mare del Nord fino a comparire in Adriatico nel 1989, interessando la fascia costiera dell'Emilia Romagna, dove si verificarono un centinaio di casi di disturbi diarroici in consumatori di mitili, e interessando anche le coste del Veneto, del Friuli Venezia Giulia, delle Marche e dell'Abruzzo; altri casi si registrarono lungo le coste della Slovenia e della Croazia.

Le tossine DSP sono prodotte da dinoflagellati dei generi *Dinophysis* e *Prorocentrum*; varie specie di queste alghe sono presenti nel Mediterraneo e nei mari italiani e si caratterizzano per il fatto di non produrre maree rosse. L'associazione tra DSP e varie specie di *Dinophysis* e *Prorocentrum* è ampiamente documentata e le contaminazioni di molluschi predanti queste specie sono segnalate in tutto il mondo (Wright, 1995; Madigan *et al.*, 2006).

In Adriatico sono state identificate 55 specie di *Dinophysis* (Sidari & Honsell, 1994), anche se finora si è dimostrata la produzione di tossine DSP solo per alcune specie, tra cui *D. acuminata*, *D. acuta*, *D. fortii*, *D. mitra*, *D. rotundata*, *D. tripos* (Lee *et al.*, 1989) e *D. sacculus* (Giacobbe *et al.*, 2000). Le intossicazioni dell'Adriatico del 1989 furono associate alla presenza di *D. fortii*, *D. tripos* e *D. caudata* (Boni *et al.*, 1992).

Le tossine prodotte da queste microalghe sono polieteri ciclici, composti liposolubili e temostabili, che tendono ad accumularsi nell'epatopancreas dei molluschi bivalvi (Whittle & Gallacher, 2000).

Le tossine DSP possono essere divise in quattro classi strutturali diverse per effetti tossicologici, meccanismi d'azione e lesioni biochimiche:

1. tossine acide: acido okadaico e derivati (OAs) ;
2. tossine neutre: pectenotossine (PTXs);
3. yessotossina e derivati (YTXs);
4. azaspiracido e derivati (AZAs)

Per quanto riguarda gli ultimi due gruppi di tossine queste sono state attribuite al gruppo delle DSP in quanto sono state spesso ritrovate nei molluschi in associazione con l'acido okadaico e le dinophysitossine, ma risultano differenti per tossicologia e per meccanismo d'azione (Poletti *et al.*, 2003).

### **1. Acido okadaico (OA) e dinophysitossine (DTXs)**

Due generi di dinoflagellati, *Dinophysis* e *Prorocentrum*, sono coinvolti nella produzione di acido okadaico (OA) e dinophysitossine (DTX1, DTX2, DTX3).

L'acido okadaico fu isolato per la prima volta da alcune spugne, *Halicondria okadai* e *Pandaros acanthifolium*, ma l'origine della tossina e dei suoi derivati venne individuata nella dinoflagellata bentonica *Prorocentrum lima* e nella dinoflagellata planctonica *Dinophysis fortii*.

Nel giugno 1989 il riscontro, da parte di ricercatori del Centro Ricerche Marine di Cesenatico, di cellule di *Dinophysis fortii* nell'epatopaneas di mitili raccolti nella fascia costiera dell'Emilia Romagna permise di accertare che l'origine dei numerosi casi diarroici verificatisi in consumatori di mitili erano imputabili a biointossicazioni del tipo DSP (Poletti *et al.*, 2003).

L'acido okadaico e i suoi derivati (OAs) essendo liposolubili possono attraversare facilmente la membrana cellulare (Suganuma, 1989) ; OA, DTX1 e DTX2 inibiscono selettivamente le proteine fosfatasi alterando i processi di fosforilazione-defosforilazione fondamentali per la regolazione dell'attività cellulare. L'acido okadaico probabilmente provoca diarrea stimolando la fosforilazione che controlla la secrezione di sodio da parte delle cellule intestinali, con conseguente perdita passiva di fluidi; inoltre c'è una stimolazione diretta della muscolatura liscia dell'intestino (Shibata *et al.*, 1982).

Nell'uomo i disturbi sono gastrointestinali e comprendono diarrea (92%), nausea (80%), vomito (79%) e dolori addominali (53%). I sintomi compaiono da 30 minuti a 12 ore dall'ingestione dei molluschi e possono durare fino a 3 giorni nei casi più gravi senza lasciare conseguenze.

L'acido okadaico è un potente promotore tumorale nei test animali (Fujiki *et al.*, 1991); studi epidemiologici compiuti lungo le coste francesi ne hanno rivelato l'associazione con il cancro dell'apparato digerente (dell'esofago, dello stomaco, del colon e del pancreas) nei consumatori di molluschi contaminati in vario grado (Cordier *et al.*, 2000).

Il Reg. 853/CE/2004 indica un limite di 160 µg di equivalente acido okadaico per kg di parte edibile assunta (Reg. 853/CE/2004).

## 2. Pectenotossine (PTXs)

Le pectenotossine (PTXs) sono un gruppo di polieterei ciclici di origine marina strutturalmente divisi in due gruppi (Yasumoto *et al.*, 1984); la PTX-1 fu la prima a essere isolata dalla ghiandola digestiva di *Patinopecten yessoensis*.

L'origine di queste tossine è attribuito a microalghe appartenenti al genere *Dinophysis*. In *D. fortii* è stata dimostrata la presenza di una pectenotossina, la PTX-2 (Lee *et al.*, 1989); anche in Adriatico *D. fortii* mostra la presenza di PTX-2 oltre a quella dell'acido okadaico (Draisci *et al.*, 1996). La PTX-2 è ritenuta il precursore delle altre pectenotossine attraverso processi di biotrasformazione ad opera dei bivalvi.

Sono ancora scarse le conoscenze su queste molecole; gli studi condotti sul topo per mezzo di estratti di molluschi contaminati hanno evidenziato tossicità a livello del fegato, dello stomaco e dell'intestino (Ishige *et al.*, 1988).

Fino ad oggi non sono stati registrati casi di intossicazione umana attribuibili a queste tossine; i dati a disposizione sulla mortalità nel topo si riferiscono esclusivamente a quanto osservato in seguito ad iniezione intraperitoneale (i.p.) e non sono sufficienti per fissare solidi fattori di equivalenza tossica (TEF) per l'uomo.

La pectenotossina con più alta letalità è la PTX-2 che si trova nella forma meno ossidata; quest'ultimo aspetto induce a pensare che i molluschi siano in grado di diminuire la tossicità delle PTXs attraverso l'ossidazione di PTX-2 (Ade *et al.*, 2003).

L'Unione Europea ha stabilito, con il Reg. CE 853/2004, un limite di tolleranza per l'AO e i suoi derivati di 160 µg/Kg di parte edibile di mollusco.

## 3. Yessotossine (YTXs)

Le YTXs sono state isolate per la prima volta in Giappone dalle ghiandole digestive di molluschi *Patinopecten yessoensis* raccolti nella baia di Mutsu (Murata *et al.*, 1987).

In Italia la prima dimostrazione della presenza di yessotossine in mitili risale al giugno del 1995 nelle acque dell'Emilia Romagna (Ciminiello *et al.*, 1995); successivamente analisi su mitili raccolti nella stessa area costiera nell'agosto del 1996 e nel luglio del 1997 misero in evidenza la presenza di analoghi delle YTXs (Satake *et al.*, 1996; Tubaro *et al.*, 1998): homo-yessotossina, 45-idrossi-homo-yessotossina e 45-idrossi-yessotossina. Successivamente fu identificato un altro analogo della yessotossina, denominata adriatossina (ATX), nel mare Adriatico (Ciminiello *et al.*, 1998).

Le YTXs si accumulano in prevalenza nell'epatopancreas dei molluschi.

La grande varietà e abbondanza di yessotossine, presenti lungo le coste dell'Emilia Romagna, costituisce uno dei principali problemi per la raccolta e commercializzazione dei molluschi bivalvi.

Due specie di dinoflagellati sono considerate responsabili della produzione di yessotossine: *Protoceratium reticulatum* e *Lingulodinium polyedrum* (Satake *et al.*, 1996; Tubaro *et al.*, 1998; Paz *et al.*, 2004).

Nel 2006 anche la dinoflagellata *Gonyaulax spinifera*, una specie piuttosto comune nei popolamenti adriatici, fu associata alla produzione di yessotossine (Rhodes *et al.*, 2006).

Già nell'autunno del 2004, la produzione di una serie di allevamenti di mitili lungo le coste dell'Emilia-Romagna fu sospesa a causa di livelli YTXs che superavano il limiti di legge. In tale occasione l'analisi della composizione fitoplanctonica portò alla luce che, durante il periodo di chiusura degli allevamenti, *P. reticulatum* e *L. polyedrum* erano quasi assenti in mare, mentre *G. spinifera* era presente ad elevate concentrazioni. Ciò suggerì che *G. spinifera* poteva essere responsabile della tossicità nei frutti di mare (Riccardi *et al.*, 2009).

Negli studi sugli effetti tossici della yessotossina come tale e della sua forma desulfatata, è risultato che la prima ha come organo bersaglio il miocardio mentre la seconda il fegato e il pancreas (Terao *et al.*, 1990). Le discrepanze di effetti tossicologici nei due tipi di somministrazione, potrebbe essere dovuta al fatto che i gruppi solforati ne riducono l'assorbimento nel tratto digestivo (Poletti *et al.*, 2003, Poletti, 2007).

Non si conoscono casi di intossicazione umana attribuibili alle YTXs (Toyofuku, 2006). Attualmente il limite previsto dalla legislazione vigente (Reg. CE 853/2004) per le yessotossine è stato fissato a 1 mg YTXs/Kg di parte edibile di mollusco.

#### **4. Azaspiracido (AZA)**

Il primo episodio di intossicazione da azaspiracido (AZA) risale al 1995 quando nei Paesi Bassi si registrarono casi di forti disturbi gastrointestinali dopo il consumo di mitili irlandesi raccolti nella baia di Killary (McMahon & Silke, 1996); da allora, numerosi casi sono stati rilevati in una varietà di specie di bivalvi (Furey *et al.*, 2003; Rehmann *et al.*, 2008), provenienti da diversi paesi europei, tra cui anche l'Italia.

Per diverso tempo si è ritenuto che l'organismo responsabile fosse una dinoflagellata appartenente al genere *Protoperdinium* (Yasumoto, 2001; James *et al.*, 2003). Tuttavia si tratta di organismi eterotrofi e non coltivabili per cui le evidenze della tossicità erano limitate.

Durante una crociera di ricerca nel Mare del Nord nel giugno 2007, Tillmann ed i suoi collaboratori trovarono le maggiori concentrazioni di AZA nella frazione di fitoplancton compresa tra 8-20  $\mu\text{m}$  (Krock *et al.*, 2008), escludendo *Protoperidinium* come organismo produttore di AZA.

Nell'ambito di tale ricerca fu isolato con successo l'organismo produttore di AZA; si tratta di una piccola dinoflagellata di cui si nutrono gli organismi eterotrofi (come *Protoperidinium*): una nuova specie chiamata *Azadinium spinosum* (Tillmann *et al.*, 2009).

L'azaspiracido è una tossina liposolubile e termostabile della quale non si conoscono al presente i meccanismi d'azione che ne fanno una tossina patologica per l'uomo.

Tutti i sintomi osservati nell'uomo dopo il consumo di molluschi contaminati da AZA appaiono poche ore dopo l'ingestione, e comprendono nausea, vomito, grave diarrea e crampi allo stomaco (McMahon & Silke, 1996). La malattia persiste per 2-3 giorni e, durante l'incidente in Arranmore Island, vi fu il pieno recupero in tutti i casi. Ad oggi, non è stato segnalato nessun effetto a lungo termine. L'intossicazione da AZA rimane una malattia rara, dato che solo 5 eventi sono stati riportati fino ad oggi; tuttavia, è probabile che vi è un'elevata percentuale di sotto-segnalazioni a causa della rapida scomparsa dei sintomi e nessuna precedenza di casi fatali (Twiner *et al.*, 2008).

Attualmente il limite previsto dalla legislazione vigente (Reg. CE 853/2004) per gli azaspiracidi è stato fissato in 160  $\mu\text{g}/\text{Kg}$  di parte edibile di mollusco.

#### **1.1.4.3 Amnesic Shellfish Poisoning (ASP)**

I primi casi di intossicazioni con sindrome amnesica da molluschi bivalvi documentati risalgono al novembre 1987 quando in Canada 153 persone ricorsero a cure mediche mostrando disturbi di tipo gastrointestinale quali nausea, vomito. Oltre a disturbi di tipo gastrointestinale, questa intossicazione provocò in alcuni casi confusione e perdita di memoria, da cui il termine *Amnesic Shellfish Poisoning* (ASP) proposto per questa sindrome (Wright *et al.*, 1989). In tale occasione si registrarono anche tre decessi in soggetti ultrasessantenni.

La causa venne attribuita alla ingestione di *Mytilus edulis* contaminati durante una fioritura della diatomea *Pseudo-nitzschia multiseriis*, precedentemente conosciuta come *Nitzschia pungens* f. *multiseriis* (Bates, 2000); si accertò che la tossina presente nei molluschi responsabili della biointossicazione era l'acido domoico (DA), un aminoacido neurotossico relativamente raro, non presente nelle proteine, isolato per la prima volta

negli anni '50 dalla macroalga rossa del Giappone *Chondria armata domoi*, il cui effetto maggiore è a livello del sistema nervoso centrale, principalmente nella regione dell'ippocampo.

Questa tossina, attraverso la catena alimentare può accumularsi nei livelli trofici superiori (Doucette *et al.*, 2006).

Le microalghe appartenenti al genere *Pseudo-nitzschia* sono ampiamente distribuite in tutte le acque del mondo, con alcuni taxa che mostrano la produzione di DA, mentre altri no. Inoltre la tossicità può variare considerevolmente sia tra le diverse specie, che all'interno della stessa specie (Ciminiello *et al.*, 2005).

In Italia, il problema del possibile rischio sanitario associato alle tossine ASP è stato sollevato quando, negli anni 1988/91, sono comparsi nell'alto e medio Adriatico aggregati mucilluginosi contenenti diatomee del genere *Pseudo-nitzschia*. In realtà fu possibile escludere la presenza di acido domoico in questi aggregati (Viviani *et al.*, 1995).

Ricerche sul meccanismo d'azione dell'acido domoico hanno mostrato che questo aminoacido, analogo dell'acido glutammico e dell'acido kainico, agisce sui recettori dell'acido glutammico, uno dei principali neurotrasmettitori del sistema nervoso centrale (Todd, 1993). Questo meccanismo d'azione a livello delle sinapsi spiega in parte gli effetti neurotossici dell'acido domoico. Quando l'azione dell'acido domoico porta ad un'attivazione eccessiva e prolungata dei recettori dell'acido glutammico e dell'acido aspartico si genera una ipereccitazione che può provocare lesioni irreversibili a livello neuronale. Le autopsie eseguite hanno evidenziato necrosi neuronale e astrocitosi, principalmente nella zona dell'ippocampo e del nucleo dell'amigdala, cause dei disturbi neurologici (Tubaro & Hungerford, 2007).

La sintomatologia da ASP non si limita al sistema nervoso ma riguarda anche l'apparato digerente.

Attualmente il limite di tolleranza previsto dalla legislazione vigente (Reg. CE 853/2004) per l'acido domoico è pari a 20 mg/kg di tessuto edibile di mollusco.

#### **1.1.4.4 Neurotoxic Shellfish Poisoning (NSP)**

L'intossicazione da NSP è causata da biotossine neurotossiche (brevitossine) prodotte principalmente da dinoflagellati del genere *Karenia*; il rischio per l'uomo deriva dall'ingestione di molluschi contaminati e dall'inalazione di aerosol contenente cellule algali o le stesse tossine (Whittle & Gallacher, 2000).



La microalga *Karenia brevis* è causa di frequenti maree rosse nel Golfo del Messico, lungo le coste della Florida e in Carolina del Nord (USA) alle quali sono spesso associate ingenti morie di pesci, mammiferi ed uccelli marini (Landsberg, 2002), mentre nell'uomo provoca disturbi gastrointestinali e sintomi neurologici e/o problemi respiratori. Se vengono ingeriti dei molluschi contaminati, i principali sintomi sono sensazione di paralisi alla bocca e alle dita, rallentamento del battito, sensazione di caldo e freddo, midriasi e lieve diarrea (Tubaro *et al.*, 2007).

La pratica di mangiare i pesci interi (di alcune comunità asiatiche e di altre culture) espone le persone ad elevato rischio di avvelenamento, in quanto i più alti livelli di brevetossina sono stati trovati nel fegato e nel contenuto dello stomaco dei pesci. Le brevetossine possono persistere nei pesci, in particolare nel fegato, per più di un anno dopo la terminazione della fioritura (Naar *et al.*, 2007).

I bloom di *K. brevis* sembrano cominciare al largo e nel giro di diverse settimane il numero di cellule aumenta e il bloom viene trasportato da venti e correnti vicino alla costa. Qui si sviluppa ulteriormente e l'alga può prendere il sopravvento sulle altre specie coprendo aree di migliaia di km<sup>2</sup> e perdurando per mesi. Inoltre, diversi studi hanno documentato la produzione di brevetossine da parte di alcune rafidoficee (ad esempio, *Chattonella* spp.) (Hallegraeff *et al.*, 1998).

La NSP è una forma relativamente blanda di intossicazione da molluschi bivalvi; la guarigione avviene in pochi giorni e non sono stati riportati casi letali. Se viene inalato dell'aerosol tossico, si possono determinare forti irritazioni della congiuntiva e delle mucose, soprattutto nasali, seguite da tosse secca e rinorrea.

Anche in questo caso la tossina agisce sui canali di membrana del sodio, rilasciando acetilcolina che causa contrazione della muscolatura liscia tracheale (Tubaro *et al.*, 2007).

Attualmente non sono previsti limiti di tolleranza per le brevetossine; la determinazione avviene in maniera indiretta, a seguito di positività alla prova biologica (morte del topo) per il gruppo delle tossine liposolubili.

## **1.2 ORGANISMI RESPONSABILI DELLE BIOINTOSSICAZIONI**

---

### **1.2.1 I molluschi filtratori**

I molluschi lamellibranchi si nutrono per filtrazione, pompando acqua attraverso le branchie e trattenendo tutte le particelle di dimensioni comprese tra 2 e 90 micron; la velocità di filtrazione dipende dalla temperatura e dalle condizioni ambientali: in media filtrano 2,5 litri di acqua all'ora, estraendo il 98% delle alghe disponibili. Le tossine presenti nelle alghe sono quindi trattenute e concentrate nei molluschi bivalvi, rendendoli tossici anche in sole 24 ore durante una fioritura algale; il consumo di molluschi (o pesce) contenenti biotossine causa malattia nell'uomo, con sintomi più o meno gravi a seconda della tossina, della concentrazione e della combinazione di più tossine. Le tossine si accumulano nella ghiandola digestiva (epatopancreas) senza causare patologia nel mollusco, che all'esame ispettivo non è distinguibile da quelli non tossici. Con il tempo, in acque prive di tossine algali, i molluschi possono ridurre la loro tossicità. Diversi studi, effettuati sui mitili, dimostrano la capacità di autodepurazione di tali organismi. Il metodo di detossificazione più usato prevede il trasferimento dei molluschi tossici in acque prive di plancton tossico, per permettere l'autodepurazione (Poletti *et al.*, 1995).

Tale metodo, tuttavia, non è applicabile a quegli invertebrati (ostriche, pettini) che hanno meccanismi di decontaminazione molto lenti.

Senza contare che il trasferimento di grosse quantità di molluschi da un'area contaminata ad un'altra non contaminata è al tempo stesso faticoso e molto dispendioso.

Shock elettrici o l'impiego di cloro possono ridurre il livello di contaminazione nei molluschi ma, al tempo stesso, alterano le proprietà organolettiche del prodotto, diminuendone l'appetibilità.

Risulta quindi non prevedibile il processo di depurazione, dipendendo dalla specie del mollusco, dal tessuto in cui la tossina si accumula, dall'attività di filtrazione, dalle condizioni idrogeografiche. Le tossine possono infatti rimanere oltre un anno nei tessuti del sifone di alcune specie. Risulta pertanto difficilmente praticabile il trattamento di depurazione o la stabulazione per cui i programmi di prevenzione consistono nel monitoraggio continuativo delle aree di raccolta o di allevamento con determinazione della concentrazione algale nelle acque e nei molluschi.

Gli organismi responsabili del trasferimento di biotossine all'uomo non sono solo i molluschi filtratori; infatti nelle zone tropicali è comune un tipo di intossicazione, detta

*Ciguatera Fish Poisoning* (CFP), che deriva dall'ingestione di pesci contaminati (Andersen, 1996).

In Adriatico, un episodio di biointossicazione dovuto al consumo di organismi diversi dai molluschi risale al dicembre del 2004. In tale occasione furono osservati nausea, cefalea, vertigini, annebbiamento della vista e diplopia, nei soggetti che avevano consumato ascidie della specie *Microcosmus sulcatus* (Fig. 5), raccolte nel nord Adriatico.



**Figura 5** *Microcosmus sulcatus*.

Il saggio biologico risultò positivo al protocollo DSP (fase metanolica), suggerendo la presenza di tossine idrosolubili. Di conseguenza la raccolta, la commercializzazione e il consumo di questi organismi filtratori furono vietati nelle zone colpite.

#### ***1.2.1.1 I Mitili: caratteri morfologici e biologici***

I principali vettori delle tossine algali sono i molluschi bivalvi, in particolare i Mitili. Questi ultimi sono ampiamente diffusi nel Mediterraneo, ove sono presenti con due specie, il *Mytilus edulis* (Linnaeus, 1758) e il *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck, 1819); nel mare Adriatico la specie più diffusa è costituita dal *Mytilus galloprovincialis* (Fig. 6),

il cui allevamento rappresenta, in alcuni bacini, fra i quali quelli dell'alto e medio Adriatico, una importante risorsa economica.



**Figura 6** *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck, 1819)

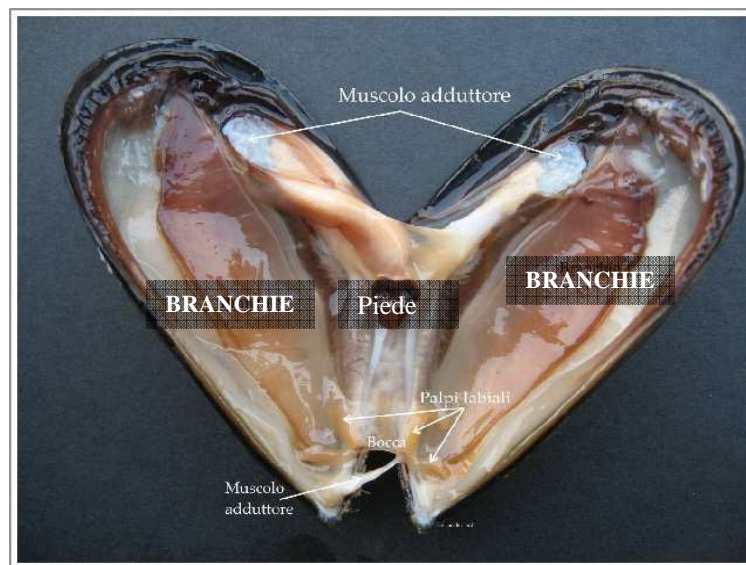
Il mitilo ha un corpo compresso costituito da una conchiglia liscia e allungata formata da due valve simmetriche di forma cuneiforme di colore nero o nero violaceo, internamente madreperlacee; la lunghezza è mediamente di 5/8 cm., ma il mitilo può raggiungere gli 11 cm. La conchiglia è costituita da  $\text{CaCO}_3$  cristallizzato ed è il prodotto dell'attività metabolica delle cellule del mantello che trasformano il bicarbonato di calcio, disciolto nell'acqua, in cristalli di carbonato conglobati in una sostanza organica, anch'essa secreta dal mantello, detta conchiolina (Gardenghi, 1978).

Le valve sono unite da un legamento elastico che ha l'aspetto di una banda di colore brunastro, costituito da conchiolina che permette alle stesse di assumere una posizione leggermente divaricata (Fig. 6); la chiusura viene determinata dalla contrazione di muscoli adduttori, anteriore e posteriore, inseriti perpendicolarmente rispetto alle valve. Questi muscoli sono composti da una combinazione di fibre muscolari lisce e striate; le prime consentono la chiusura protratta nel tempo delle valve, mentre le seconde assicurano la loro chiusura immediata.

I muscoli adduttori rivestono un ruolo essenziale per la sopravvivenza del mollusco in quanto regolando l'apertura e la chiusura delle valve consentono la difesa dai predatori in mare e permettono la sopravvivenza, per periodi più o meno lunghi, al di fuori dell'ambiente marino. La chiusura delle valve permette la trattenuta del liquido intervalvare, consentendo alla branchie di continuare ad espletare la propria funzione respiratoria, avendo la capacità di captare l'ossigeno atmosferico (Mengoli, 1998).

In corrispondenza del legamento elastico è presente una cerniera o cardine formato da dentelli e incisioni della conchiglia che assicurano che le valve mantengano la posizione. Nei pressi del legamento elastico e della cerniera si trova il punto di inizio di accrescimento della conchiglia chiamato umbone; sulla superficie delle valve sono visibili degli anelli concentrici di crescita.

All'interno delle valve ha sede il sacco dei visceri, contenente gli organi interni (Fig. 7), il quale è rivestito da un epitelio aderente alla superficie interna delle valve, detto mantello.



**Figura 7** Organizzazione anatomica del mitilo.

Tra i lobi del mantello si trova il piede che appare come una formazione impari disposta lateralmente in mezzo alle branchie. Si presenta con la forma di piccola lingua, molto estensibile, e la sua superficie ventrale o pianta è ricoperta di ciglia. Il piede è costituito da strati muscolari circolari e longitudinali. Sulla linea medio-ventrale del piede si apre la ghiandola bissogena, la quale produce dei filamenti o bisso che, partendo in fascio divergente dal suo orifizio, si fissano ad un substrato mediante la propria estremità allargata a forma di lente. Il piede ha anche una piccola capacità locomotoria, infatti quando l'animale non gradisce rimanere nel luogo in cui si trova, si avvicina il più possibile al ciuffo del bisso, poi lancia dei nuovi filamenti nella direzione desiderata, passa il piede nei vecchi filamenti e man mano li rompe.

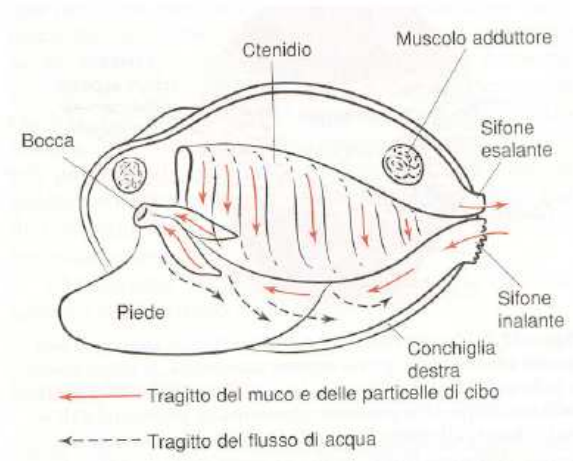
Fra il mantello e il piede è presente una cavità denominata cavità del mantello o cavità palleale.

Lo scambio gassoso viene assicurato dal mantello e dalle branchie: l'acqua aspirata viene convogliata alle due branchie o ctenidi, contenute nella cavità palleale, costituite da lamelle branchiali rivestite da un epitelio ciliato che assicura gli scambi respiratori e favorisce la circolazione delle particelle in sospensione trattenute verso l'apparato digerente.

Le branchie hanno una struttura estremamente semplice di tipo filamentoso e vengono chiamate filibranchie. L'aumento di complessità della struttura delle branchie nella classe dei bivalvi è volta quasi esclusivamente alla specializzazione nella captazione del cibo. Per cui quanto più primitiva è la struttura della branchia, tanto più predomina la funzione respiratoria su quella alimentare.

Essendo organismi sessili bentonici, si alimentano attraverso un meccanismo di filtrazione (filter feeding) e si nutrono direttamente di microalghe o di altro materiale organico in sospensione filtrando una rilevante quantità d'acqua; per questo sono in grado di accumulare, anche in brevissimo tempo, concentrazioni di ficotossine mortali per un eventuale consumatore.

Le ciglia sulla superficie dello ctenidio creano una corrente di acqua attraverso il sifone inalante, facendola passare tra i filamenti delle branchie (Fig. 8); queste ciglia hanno anche il compito di far scendere il muco (miscela vischiosa di mucopolisaccaridi in cui vengono intrappolati i microrganismi acquatici e le particelle di cibo e che serve anche a facilitare la respirazione), sotto forma di un cordone continuo, lungo i filamenti fino all'apice della branchia, dove viene sospinto dal movimento circolare in un particolare solco verso la bocca. Dopo il passaggio sotto le branchie, i granelli di sabbia e i materiali indigesti vengono separati ed espulsi assieme all'acqua dal sifone esalante, mentre le particelle di cibo vengono portate dalle ciglia alla bocca.



**Figura 8** Schema che raffigura il tragitto del flusso di acqua e delle particelle di cibo nei bivalvi.

L'apparato digerente semplificato è costituito da palpi labiali, bocca, stomaco, epatopancreas, intestino e ano (Gardenghi, 1978).

Lo stomaco si presenta come un lungo diverticolo cieco che contiene lo stilo del cristallino, sottile fusto trasparente che, mosso da ciglia vibratili, gira su stesso liberando enzimi quali amilasi, cellulasi e lipasi (Mengoli, 1998).

L'epatopancreas è una ghiandola digestiva comunicante con lo stomaco dove viene svolta la funzione digestiva; il materiale digerito viene convogliato nell'intestino e all'ano dove sfocia nella cavità palleale e, tramite il sifone esalante, convogliato all'esterno.

L'elevata capacità filtrante porta all'accumulo, nel mitilo, di inquinanti di diversa natura o tossine.

L'apparato escretore è costituito da nefridi del tipo dei metanefridi, che svolgono un'intensa attività filtrante i cui prodotti catabolici sono costituiti per lo più da ammoniaca e urea.

L'apparato circolatorio è di tipo aperto a circolazione incompleta e mista con il cuore composto da un ventricolo e due atri; il ventricolo cardiaco è attraversato dal tubo intestinale, senza che avvenga comunicazione fra loro. Il sangue contiene come pigmento respiratorio l'emocianina.

Il sistema nervoso è semplice di tipo gangliare con cordoni neurali.

La riproduzione è di tipo sessuale e i sessi sono generalmente separati; le gonadi sono costituite da tessuto ghiandolare che si insinua fra il mantello e gli organi interni; i gameti vengono rilasciati da follicoli genitali e portati all'esterno tramite il sifone esalante, soprattutto lo sperma poiché le uova a volte rimangono nella cavità palleale fino ad un certo stadio dello sviluppo larvale; la fecondazione avviene generalmente all'esterno, in mare, ma anche nella cavità palleale delle femmine (Gardenghi, 1978).

Il ciclo riproduttivo subisce variazioni in base alle zone geografiche; nel medio e alto Adriatico le gonadi sono mature tra settembre e ottobre e la produzione di gameti avviene per tutto l'inverno fino alla primavera, con alcuni picchi di produzione. In tali periodi l'emissione di gameti avviene in quantità elevata (ogni emissione varia dai 5 ai 12 milioni di gameti). Dall'ovocita fecondato si sviluppa un primo stadio larvale dotato di ciglia (larva trocofora); dopo alcuni giorni la larva si trasforma in veliger, caratterizzata dalla disposizione a vela delle ciglia; successivamente avviene la trasformazione in larva pelagica idonea alla colonizzazione di nuove zone e a garantire il flusso genico. In cinque

settimane la larva diventa un giovane mitilo di circa 5 mm. ed è pronto ad aderire a substrati duri tramite i filamenti di bisso (Bao *et al.*, 2007).

### ***1.2.1.2 Mitilicoltura: economia e produzione***

Il sistema della mitilicoltura è caratterizzato da una struttura complessa in cui convivono ancora retaggi frutto di antiche tradizioni e tecniche di allevamento assai moderne e di carattere intensivo. Il processo di trasformazione verso pratiche di allevamento che consentono di superare l'ambito territoriale locale ed il carattere artigianale di questa attività è avvenuto con l'introduzione, nella seconda metà degli anni ottanta, del sistema *longline offshore* (Fig. 9).



**Figura 9** Filare di allevamento di mitili del tipo longline (Ronconi, 2010).

Tali impianti hanno rappresentato un'evoluzione importante per la mitilicoltura in quanto hanno permesso lo sfruttamento di acque più profonde rispetto a quelle costiere beneficiando del migliore apporto nutrizionale delle correnti marine.

Gli impianti longline sono costituiti da filari di lunghezza tra i 100 e 200 metri, posizionati parallelamente alla costa, ad una profondità variabile dai 9 ai 15 metri. Ogni filare è costituito da una fune (ventia) ancorata sul fondo da grossi pesi (generalmente blocchi di cemento) denominati corpi morti, tenuto in superficie da boe distanziate fra loro di circa 4/5 metri (Fig. 9); i filari sono distanziati fra loro di circa 40 metri,



corrispondente allo spazio di manovra delle imbarcazioni. Sul filare, a distanze regolari di circa cm. 60, vengono appese delle reti di nylon denominate calze o reste, pendenti verso il fondo, lunghe mediamente 3,5/4,5 metri, sulle quali avviene l'accrescimento dei mitili (Fig. 10)



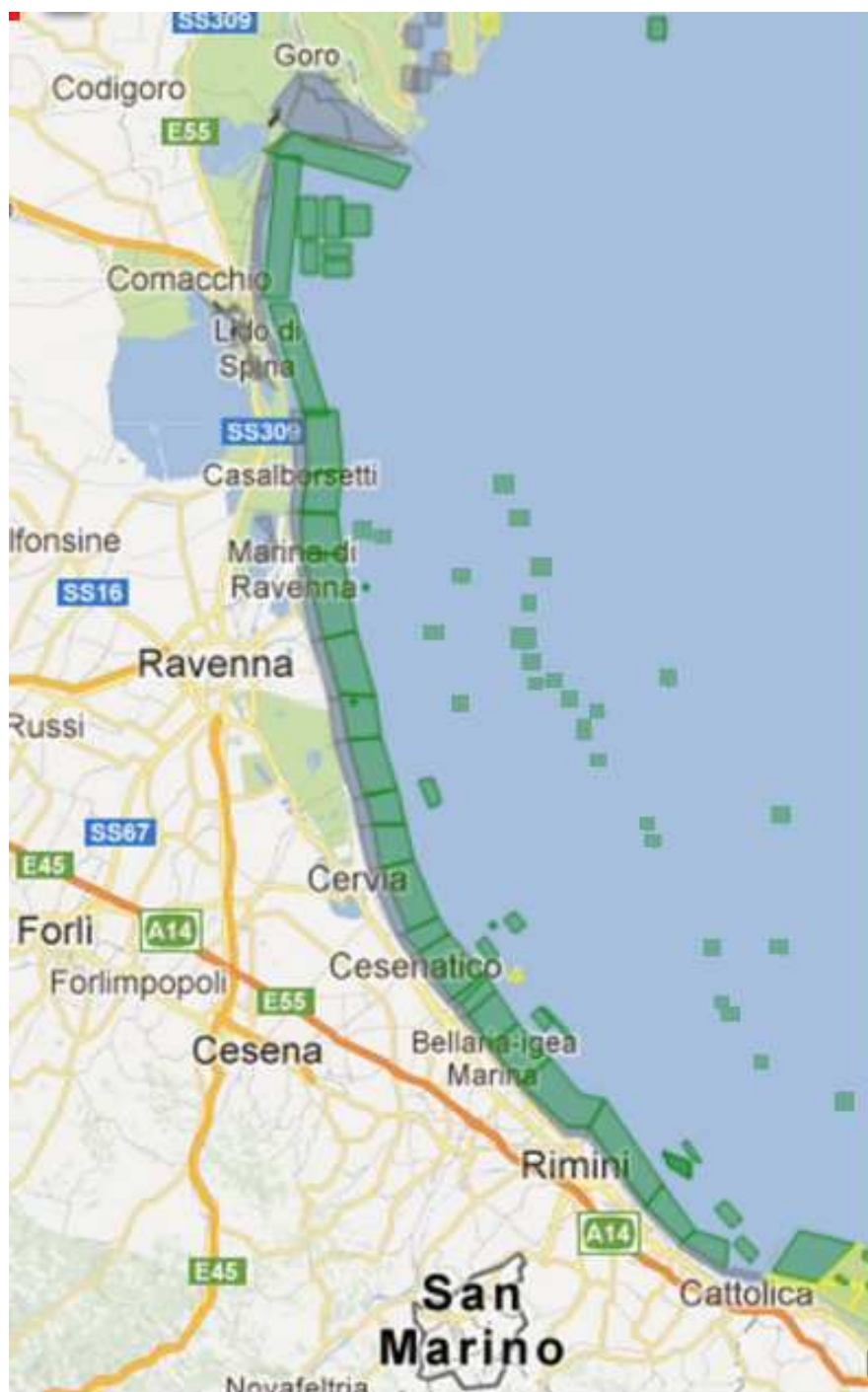
**Figura 10** Filari con reste per l'accrescimento dei mitili.

L'avvento di nuove tecnologie nell'allevamento dei mitili ha, infatti, consentito di conquistare nuovi spazi, e alle tradizionali aree di produzione, situate soprattutto in zone strettamente costiere o lagunari, si sono aggiunte numerose realtà produttive poste in mare aperto. Ciò ha fatto sì che la molluschicoltura oggi rappresenti la principale voce produttiva per quanto riguarda l'acquacoltura italiana.

L'Emilia-Romagna costituisce un'area di notevole importanza per la mitilicoltura italiana, con una produzione e un'estensione degli impianti che rappresentano circa il 25 per cento dei rispettivi totali nazionali.

Questo processo è stato naturalmente favorito dalle caratteristiche idrologiche e ambientali presenti nelle acque della fascia costiera dell'Emilia-Romagna, da sempre considerate eccezionalmente ricche di nutrimento, grazie all'apporto del Po e dei corsi d'acqua minori, che favoriscono lo sviluppo, a volte eccessivo, del fitoplancton, cibo preferito dei molluschi bivalvi filtratori quali i mitili.

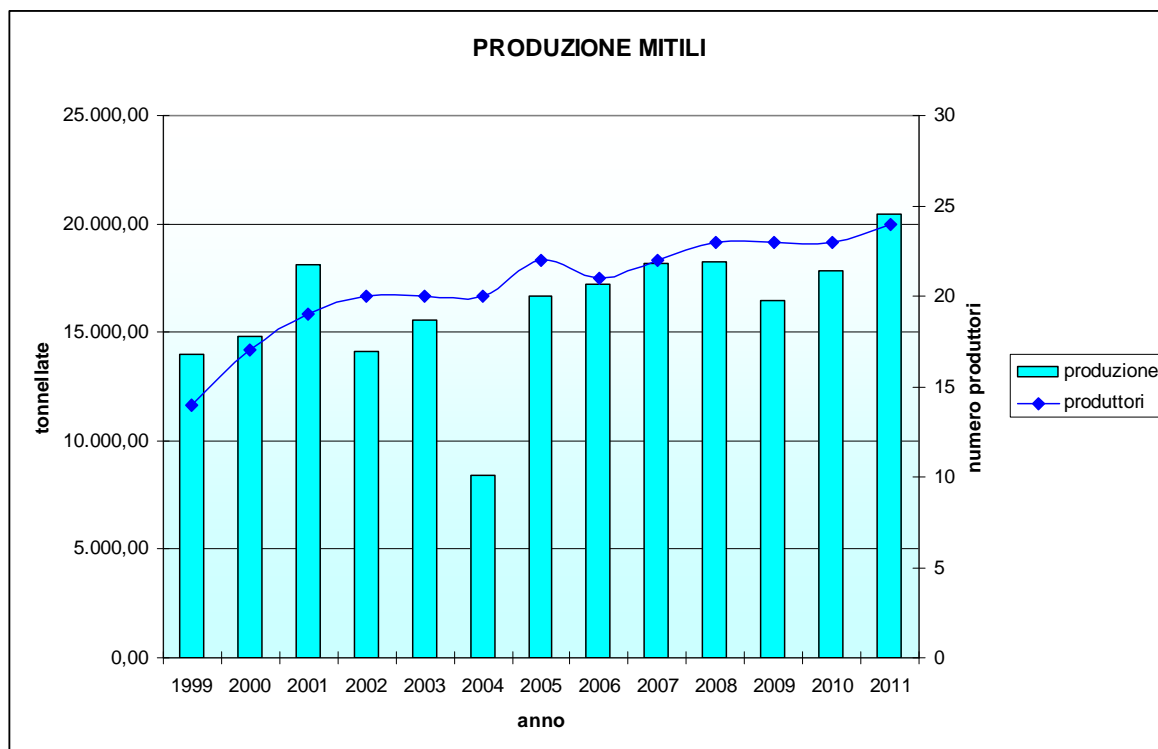
Al momento attuale impianti di molluschicoltura sono distribuiti lungo tutta la costa regionale, con una maggiore concentrazione nel tratto di mare che da Porto Garibaldi giunge fino alla Sacca di Goro (Fig. 11).



**Figura 11** Distribuzione degli allevamenti lungo la costa emiliano-romagnola ([www.algaeadria.org](http://www.algaeadria.org)).

In base a una rilevazione svolta nel 2011, complessivamente sono risultate 24 imprese dedite alla mitilicoltura, con una produzione di oltre 20.000 tonnellate.

In particolare, l'andamento della produzione in questi ultimi anni si sta assestando intorno a valori compresi tra le 16.000 e le 20.000 t, a parte una vistosa caduta nel 2004 dovuta a perdita di prodotto derivante a problematiche di carattere ambientale (Fig. 12).



**Figura 12** Andamento della produzione di mitili da allevamento nel periodo 1999-2011.

Attualmente tale produzione equivale a circa il 25% di quella nazionale, rappresentando quindi una quota consistente dell'intero comparto produttivo.

Pertanto la rilevazione di elevati livelli di biotossine nei molluschi non costituisce soltanto un serio problema per la salute pubblica, ma rappresenta anche la causa di un significativo danno economico. Quando il monitoraggio dei molluschi porta alla rilevazione di elevati livelli di contaminazione, infatti, il prodotto non ha più le caratteristiche igieniche stabilite dalle normative comunitarie, e ne viene inibita la commercializzazione. Nell'Adriatico settentrionale, negli anni 1989-2000, la raccolta dei mitili è rimasta chiusa dai tre fino a dieci mesi all'anno a causa di contaminazioni da biotossine (Fig. 13), con gravi ripercussioni sulla redditività della molluscoltura (Poletti *et al.*, 1998).

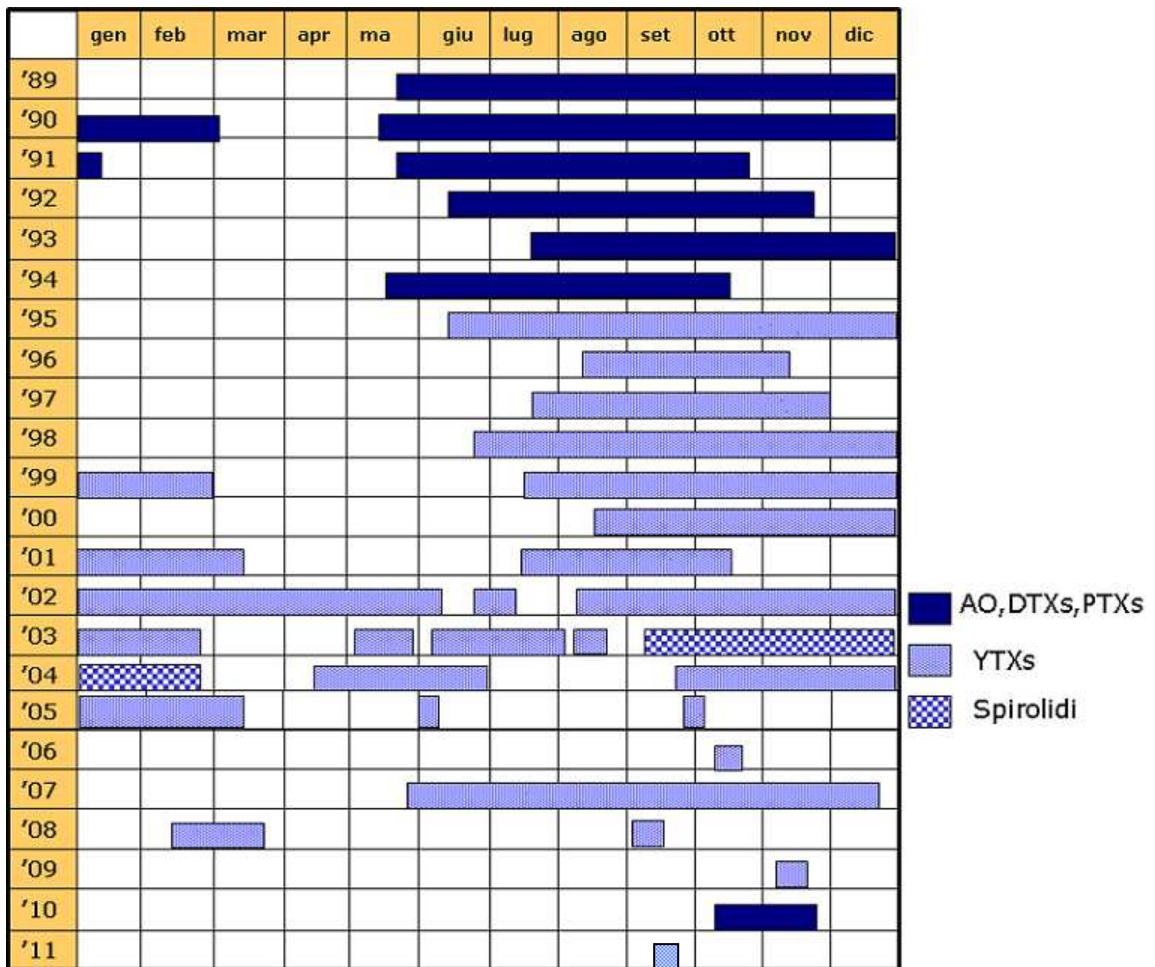


Figura 13 Chiusura allevamenti dell'Emilia Romagna dal 1989 al 2011.

Da tutto ciò risulta evidente come siano necessarie delle normative per regolare il commercio dei molluschi e del pesce a livello globale. Infatti il commercio dei frutti di mare è diffuso in tutto il mondo e soltanto in Europa risultano essere consumati circa 12 miliardi di pesce all'anno, che comprende il pescato europeo e le importazioni (Whittle & Gallacher, 2000).

Le istituzioni, con l'essenziale collaborazione del mondo scientifico, devono emanare dei regolamenti per stabilire i livelli massimi di tossina nei molluschi e indicare i metodi di analisi dei diversi gruppi di tossine. Inoltre è essenziale stabilire dei metodi di monitoraggio internazionali e formare personale competente che sappia identificare le specie algali tossiche (Toyofuku, 2006).

Sia a livello nazionale che a livello di comunità europea, esiste quindi una legislazione che definisce i limiti di presenza delle biotossine marine nei vari prodotti ittici commercializzati.

## 1.3 LE NORME

---

### 1.3.1 Normativa nazionale e comunitaria

Le principali biointossicazioni che interessano i molluschi commercializzati in Italia e nell'Unione Europea sono le intossicazioni da DSP, che portano a diarrea, nausea, vomito e dolori addominali, le intossicazioni da PSP, che possono essere letali, in quanto inducono a paralisi dei muscoli respiratori, e le intossicazioni da ASP, che inducono amnesia agendo sull'organo deputato alla memoria, cioè l'ippocampo.

Da un lato è da considerare anche l'aumentata richiesta di prodotti ittici che l'UE non riesce a soddisfare vedendosi costretta ad importare tali prodotti da paesi extra europei.

Si è verificata quindi la necessità di garantire la sicurezza nel consumo di questi alimenti in quanto rappresentano un'importante fonte di risorsa alimentare e ciò ha spinto l'UE a proporre normative sanitarie a tutela del consumatore, nonché dei limiti di tolleranza e dei metodi di analisi e identificazione delle varie biotossine.

In Italia le norme di controllo sanitario per le biotossine marine sono comparse a seguito dei fenomeni di eutrofizzazione, fioriture algali nell'Adriatico e fenomeni di intossicazioni da consumo di mitili provenienti dalle coste atlantiche della Spagna negli anni settanta.

La prima legge varata fu la *n° 192/1977* riguardante le “norme igienico sanitarie” per la produzione, commercio e vendita di molluschi eduli bivalvi; successivamente furono introdotti il *D.M. 27 aprile 1978* sui requisiti microbiologici, chimici e fisici delle acque destinate a molluschicoltura e il *D.M. 5 ottobre 1978* su tali requisiti dei molluschi eduli bivalvi.

In seguito, il Ministero della Sanità attraverso il *D.M. n° 131 del 1 settembre 1990*, emanò i “metodi per la determinazione qualitativa e quantitativa dei popolamenti fitoplanctonici nelle acque adibite alla molluschicoltura” e successivamente il Governo Italiano recepì due Direttive Comunitarie, rispettivamente la 492 e la 493 del 15 luglio 1991.

Non veniva però specificata il tipo di metodica biologica da adottare e i criteri di quantificazione delle biotossine creando problemi fra gli stati membri dell'Unione Europea nell'elargire giudizi sulla qualità dei prodotti ittici, fino a quando, con decisione del Consiglio *n° 383 del 14 giugno 1993*, la Comunità Europea designò dei Laboratori di Riferimento Nazionali coordinati dal Laboratorio Comunitario la cui sede è a Vigo, in Spagna. Laboratorio Nazionale di Riferimento per l'Italia è la Fondazione Centro

Ricerche Marine di Cesenatico, laboratorio che opera in conformità alla norma UNI CEI EN ISO/IEC 17025 ed ha formalmente ottenuto l'accreditamento, con certificato n° 0472, nel 2003, poi riconfermato nel 2007 e nel 2011, dal SINAL (ora ACCREDIA, ente unico nazionale di accreditamento riconosciuto dallo Stato il 22 dicembre 2009, nato dalla fusione di SINAL e SINCERT). ACCREDIA è un'associazione senza scopo di lucro, che valuta la competenza tecnica e l'idoneità professionale degli operatori di valutazione della conformità (Laboratori e Organismi), accertandone la conformità a regole obbligatorie e norme volontarie, per assicurare il valore e la credibilità delle certificazioni. L'accreditamento per il consumatore è uno strumento invisibile che però comporta dei vantaggi e dei benefici reali e percepibili.

Con decisione della Commissione del 15 marzo 2002 vennero poi fissate delle norme specifiche per l'attuazione della direttiva 91/492/CEE per i metodi di identificazione delle varie biotossine nei molluschi bivalvi e in altre specie marine, norme che sono incorporate nel *D.M. del 16 maggio 2002*.

I regolamenti della normativa denominata "*Pacchetto Igiene*", approvati nel 2004 ed entrati in vigore nel 2006, hanno prestato grande attenzione al rischio in oggetto, confermando la necessità di procedere all'applicazione di specifiche attività di sorveglianza sanitaria. Lo scopo evidente è insito nell'intenzione di semplificare i concetti sulla sicurezza alimentare dell'intera filiera produttiva e di approfondire le tematiche sulle modalità di applicazione del sistema HACCP. Il Pacchetto Igiene, che riunisce e sostituisce i regolamenti esistenti in materia igienico-sanitaria per il settore alimenti, comprende i seguenti Regolamenti:

- ✓ il *Regolamento (CE) 853/2004 del 29 aprile 2004*, che all'Allegato III Sezione VII Capitolo V No. 2 stabilisce i tenori massimi per le tossine ASP, PSP e DSP. L'Articolo 11, implica l'autorizzazione a specificare metodi d'analisi approvati per le biotossine marine;
- ✓ il *Regolamento (CE) 854/2004 del 29 aprile 2004*, che all'Allegato II Capitolo II affida all'Autorità per il monitoraggio negli Stati Membri il controllo dei molluschi bivalvi per la presenza di biotossine marine;
- ✓ il *Regolamento (CE) 2074/2005 del 5 dicembre 2005*, che all'Articolo 12 stabilisce che "il saggio biologico è il metodo di riferimento utilizzato per individuare talune

tossine ed evitare che siano raccolti molluschi tossici. Gli Stati membri devono armonizzare e applicare tenori massimi e metodi di analisi per proteggere la salute umana. Oltre ai metodi di analisi biologica, opportuno autorizzare altri metodi di determinazione, come i metodi chimici e le prove *in vitro*, se dimostrato che i metodi prescelti sono efficaci almeno quanto il metodo biologico e che la loro applicazione consente un grado equivalente di protezione della salute pubblica. I tenori massimi proposti per le tossine liposolubili sono basati su dati provvisori e dovranno essere riesaminati quando nuovi dati scientifici saranno disponibili. La limitata disponibilità di materiali di riferimento e il solo uso di prove diverse dai saggi biologici non consentono ora di garantire una protezione della salute pubblica su tutte le tossine specificate di livello equivalente a quello assicurato dalle prove biologiche. Occorre provvedere quanto prima possibile alla sostituzione delle prove biologiche”;

- ✓ il *Regolamento (CE) 1664/2006 del 6 novembre 2006*, in cui si stabilisce che “il tenore massimo di tossine PSP (Paralytic Shellfish Poison) deve essere determinato con il metodo d’analisi biologica o con altro metodo internazionalmente riconosciuto. Il cosiddetto metodo Lawrence così come pubblicato in AOAC Official Method 2005.06 (Paralytic Shellfish Poisoning Toxins in Shellfish) può essere utilizzato come metodo alternativo per l’individuazione di tali tossine. In caso di contestazione dei risultati il metodo di riferimento è tuttavia ancora quello biologico”;
- ✓ il *Regolamento (CE) 1244/2007 del 24 ottobre 2007*, che afferma che il contenuto di tossine ASP nella parte edibile dei molluschi debba essere rilevato con il metodo HPLC o qualsiasi altro metodo riconosciuto in campo internazionale, proponendo altresì, come metodo di screening, il metodo 2006.02 ASP ELISA, come pubblicato in Journal of AOAC (Giugno 2006);
- ✓ il *Regolamento (CE) 15/2011 del 10 gennaio 2011*, che modifica il *Regolamento (CE) 2074/2005* per quanto riguarda i metodi di analisi riconosciuti per la rilevazione delle biotossine marine nei molluschi bivalvi vivi. Prevede il superamento dei biotest in quanto l’Autorità europea per la sicurezza alimentare (EFSA) ha espresso parere nel merito ritenendo che gli stessi presentano lacune e pertanto non sono considerati adeguati a causa dell’elevata variabilità dei risultati, della loro insufficiente capacità di rilevazione e della loro limitata specificità. Prevede metodi chimici per la

rilevazione delle tossine lipofile e test biologici per un periodo transitorio fino al 31 dicembre 2014.

Molto importante è anche il ruolo del Sistema Comunitario di Allerta Rapido (RASFF) che trova il fondamento giuridico nella *Direttiva 92/59/CEE* del Consiglio Europeo recepita col *Decreto Legislativo 115/95*, relativa alla sicurezza generale dei prodotti e nel *Regolamento CE 178/2002* del Parlamento Europeo e del Consiglio, che stabilisce i principi e i requisiti generali della legislazione alimentare, istituisce l'autorità europea per la sicurezza alimentare e fissa procedure nel campo della sicurezza alimentare; il RASFF si occupa di notificare in tempo reale i rischi diretti o indiretti per la salute pubblica connessi al consumo di alimenti o mangimi, un sistema sotto forma di rete, a cui partecipano la Commissione Europea, l'EFSA (Autorità Europea per la Sicurezza Alimentare) e gli Stati membri dell'Unione. L'attività del sistema di allerta prevede il ritiro di prodotti pericolosi per la salute umana o animale.

### **1.3.2 Regolamenti e linee guida della Regione Emilia Romagna**

Vi sono inoltre una serie di regolamenti regionali volti a specificare i metodi analitici per la ricerca di biotossine marine e le procedure per il campionamento dei molluschi bivalvi.

- ✓ *Circolare n. 19 della Regione Emilia Romagna, 26 marzo 1996.* Sistema di sorveglianza sanitaria nelle zone di produzione dei molluschi bivalvi vivi. Definiva metodi, modalità, frequenza e punti del campionamento ufficiale da eseguirsi sui molluschi bivalvi per la ricerca, oltre a quelle microbiologiche previste, di biotossine marine e sull'acqua di mare per il controllo dei popolamenti fitoplanctonici.
- ✓ *Procedure operative riguardanti il prelievo e le analisi microbiologiche e biotossicologiche eseguite sui molluschi bivalvi campionati ai sensi del D.lgs 123/93, Regione Emilia Romagna, 9 gennaio 1997.* Stabiliva procedure operative per il campionamento dei molluschi bivalvi e l'invio ai laboratori per analisi, non ripetibili, per il controllo microbiologico e la determinazione delle biotossine algali.
- ✓ *Delibera n. 821 del 27 maggio 2002 della Giunta della Regione Emilia Romagna.* Classificazione delle zone di produzione di molluschi bivalvi vivi, art. 4 del D.Lgs. 530/1992. Procede alla classificazione delle zone di produzione di MBV; viene



adottata a seguito delle osservazioni formulate dalla Direzione Generale della Salute e della Tutela dei Consumatori della Commissione Europea durante la missione effettuata nella Regione Emilia Romagna il 20 e 21 novembre 2001.

- ✓ *Circolare n. 22 della Regione Emilia Romagna, 3 dicembre 2002.* Sistema di sorveglianza sanitaria nelle zone di produzione dei molluschi bivalvi vivi. Modificava e integrava la Circolare RER N. 19 del 26 marzo 1996.
- ✓ *Delibera n. 696 del 21 maggio 2007 della Giunta della Regione Emilia Romagna.* Recepimento dell'Intesa tra il Governo, le Regioni e le Province autonome di Trento e Bolzano relativa alle linee guida sui molluschi bivalvi e alla nuova regolamentazione comunitaria – Rep. n. 7/C5R del 25 gennaio 2007.
- ✓ *Determinazione n. 016348 del 19 dicembre 2008 della Regione Emilia Romagna.* Procedure e modalità concernenti il sistema di sorveglianza sanitaria nelle zone di produzione e raccolta di molluschi bivalvi vivi e la classificazione delle acque destinate a tali produzione. Il provvedimento sostituisce la circolare della RER n. 19/1996 modificata e integrata dalla Circolare della RER n. 22/2002.
- ✓ *Determinazione n. 199 del 18 gennaio 2010 della Regione Emilia Romagna.* Integrazione alle procedure e modalità concernenti il sistema di sorveglianza sanitaria nelle zone di produzione e raccolta di molluschi bivalvi vivi e la classificazione delle acque destinate a tali produzione di cui alla determinazione n. 16348/2008.
- ✓ *Determinazione n. 4034 del 20 aprile 2010 della Regione Emilia Romagna.* Modifica e integrazione alla Determinazione n. 5240 del 15.06.2009 “Linee guida regionali Sistema di Allerta alimenti-mangimi in attuazione alla Delibera di Giunta Regionale n. 308 del 23.03.2009”.

## 1.4 CARATTERIZZAZIONE DELL'AREA DI STUDIO

### 1.4.1 Il mare Adriatico: caratteristiche generali

Il mare Adriatico presenta una forma allungata secondo un asse principale orientato in direzione Nord Ovest – Sud Est. Ha una lunghezza di circa 800 km e una larghezza massima di 220 km.

L'Adriatico ha un'estensione di 132.000 km<sup>2</sup>, con una superficie pari ad 1/19 di quella del Mediterraneo. Ha un volume di 36.000 km<sup>3</sup>, corrispondente a 1/103 dell'intera massa acquee mediterranea. Straordinaria è la quantità di acque dolci che in esso si immettono, pur essendo un bacino di modeste dimensioni riceve 1/3 di tutti gli apporti fluviali confluenti nel Mediterraneo.

Le caratteristiche biochimiche dell'Adriatico sono delineate da alcuni fattori principali: l'apporto di sostanze organiche, inorganiche e nutritive dai fiumi, la forma semichiusa del bacino che limita gli scambi con il resto del Mediterraneo, la forte pressione antropica esercitata sulle aree costiere e le dinamiche degli ecosistemi in esso presenti.

Convenzionalmente il Mar Adriatico viene suddiviso, sulla base delle sue caratteristiche morfologiche (lungo il suo asse principale NO-SE), in tre sottobacini: l'Adriatico Settentrionale, Centrale e Meridionale (Fig. 14).

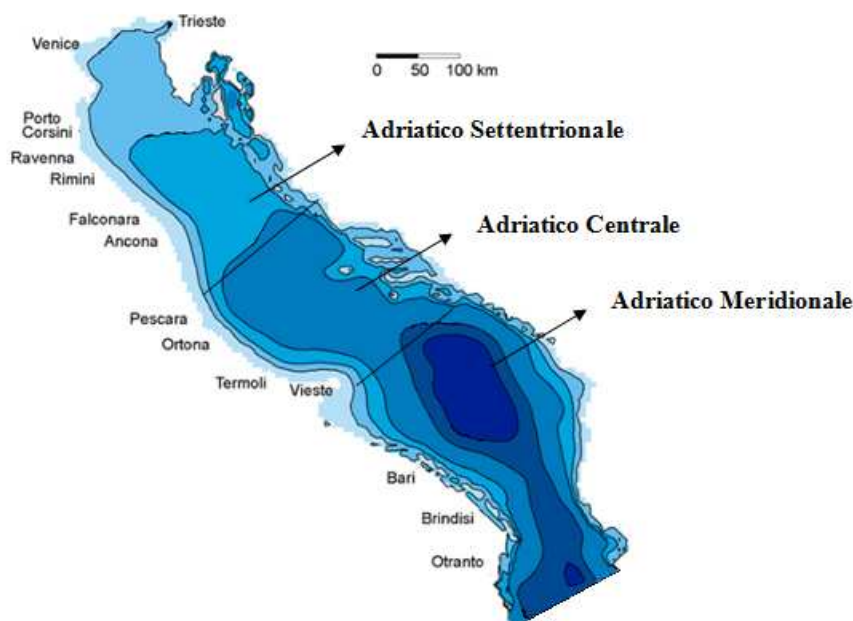


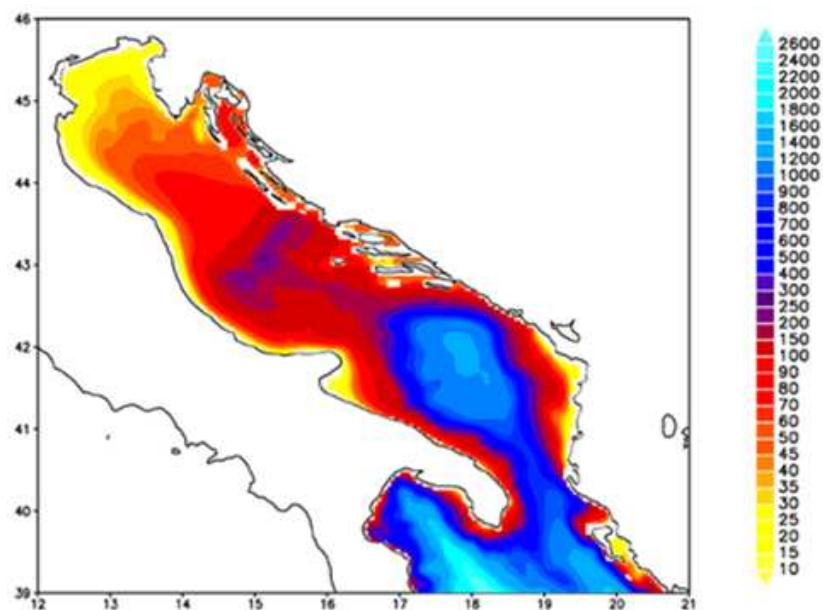
Fig. 14 Mar Adriatico con suddivisioni nei tre sottobacini.

Questa suddivisione identifica inoltre le caratteristiche fisiche e biologiche. La regione Nord-Ovest è caratterizzata da una lunga piattaforma continentale, quindi da basse

profondità (35 m). Il fondale scende gradualmente lungo la piattaforma con un'inclinazione inferiore a un grado, fino ad arrivare al ciglio della scarpata continentale, identificabile con l'isobata dei 120 m all'altezza di Pescara, la quale delimita il Bacino Settentrionale.

Il cambio di pendenza sulla scarpata continentale determina un aumento più repentino della profondità fino a raggiungere i 238 m nella Fossa di Pomo che segna il confine tra il Bacino Centrale e quello Meridionale. Quest'ultimo raggiunge i 1200 m di profondità massima (al largo di Bari) per poi risalire nuovamente avvicinandosi allo stretto di Otranto (780 m).

La pendenza dei fondali prospicienti l'Emilia Romagna è molto lieve, soprattutto se si considera che la profondità oltre al 1 km dalla costa aumenta di un metro ogni chilometro (Fig. 15).



**Figura 15** Batimetria dell'Adriatico (dal sito ADRICOSM).

Numerosi fiumi scaricano in entrambi i versanti un'ingente quantità di acqua dolce, stimabile con una portata media pari a circa 6000 m<sup>3</sup>/s. Gli scarichi fluviali sono particolarmente abbondanti nella zona Nord del bacino, dove condizionano sia la circolazione con i loro input, sia l'ecosistema introducendo grandi quantità di nutrienti. Gli apporti fluviali di acqua dolce e fredda fanno sì che l'Adriatico sia un bacino in diluizione.

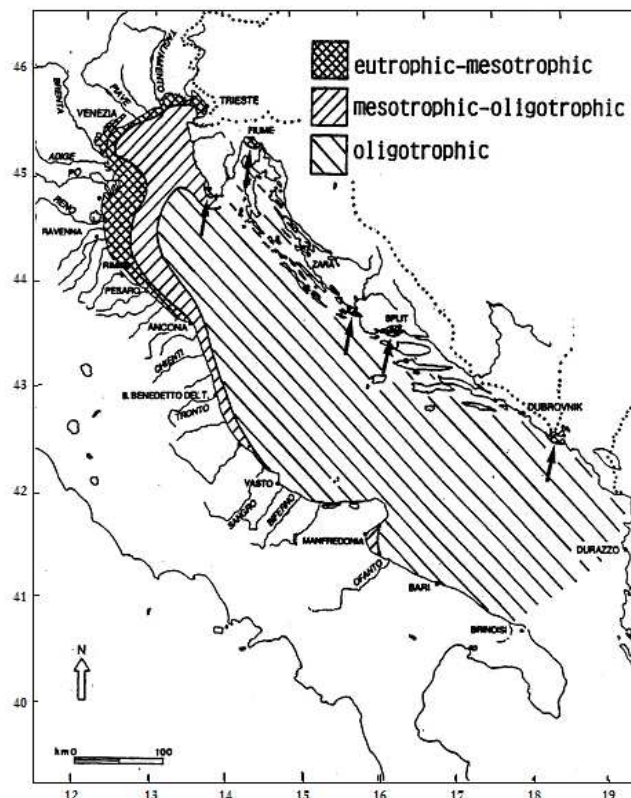
In particolare, l'alto Adriatico è sottoposto ad un ingente apporto di acque dolci dal fiume Po, che con il suo delta molto sviluppato caratterizza fortemente tutta la

morfologia e l'idrodinamica della zona. Il Po condiziona inoltre la temperatura superficiale apportando acqua più fredda di qualche grado di quella in loco.

La salinità varia da zero, alla bocca del fiume, fino a valori massimi attorno ai 38psu dovuti invece all'arrivo di masse d'acqua più salate da sud lungo la costa orientale.

Gran parte dell'intero apporto fluviale (28%) e dell'apporto di sedimenti dipende in maniera predominante dal Po e, in via subordinata dagli altri fiumi che sfociano nella zona come il Reno, l'Adige e il Brenta.

Il bacino è caratterizzato da diverse condizioni trofiche: la zona produttiva (eutrofica) dello Shallow Nord e la zona oligotrofica dell'Adriatico Centrale e dell'Adriatico Meridionale (Fig. 16)



**Figura 16** Lo stato trofico dell'Adriatico (UNEP/FAO/WHO MAP Technical Report, Rinaldi A., 1996.)

Lo Shallow Nord presenta un ciclo di produzione primaria che è notevolmente influenzato dalle immissioni fluviali di nutrienti, che possono dare luogo, nella zona circostante, a fenomeni di anossia con conseguente mortalità della fauna bentica.

L'Adriatico Centrale e Meridionale sono caratterizzati da una bassa produzione primaria, fatta eccezione per l'area costiera occidentale che presenta una ricca concentrazione di nutrienti dovuta alla corrente proveniente dal bacino settentrionale. Le acque in mare aperto mostrano invece caratteristiche oligotrofiche. La coesistenza di condizioni costiere

eutrofiche e in mare aperto oligotrofiche, implica la presenza di un gradiente trofico Nord-Sud. Quest'ultimo dipende dalle interazioni tra processi biogeochimici, la circolazione e la struttura della colonna d'acqua del bacino.

Il limitato scambio di acque allo Stretto d'Otranto causa un aumento del tempo di resistenza dei nutrienti all'interno del bacino. Si è stimato che il completo ricambio di acqua avvenga in un periodo che va dai tre ai dieci anni (Mosetti, 1983), non facilitando l'ingresso di acque oligotrofiche dal Mar Mediterraneo.

Il fiume Po può essere quindi considerato il motore principale della dinamica dei nutrienti in Adriatico, i quali, una volta in mare sono sottoposti a processi di diversa natura che li trasportano attraverso diversi compartimenti.

A Nord del delta del Po le aree costiere sono dominate dalle immissioni di acque fredde dovute agli scarichi fluviali, mentre a Sud del Po, sia nell'Adriatico Centrale che Meridionale, la circolazione è dominata da un'intensa corrente, la *Western Adriatic Coastal Current* (WACC), che è guidata sia dal vento sia da input di acque fredde. Questa fa sì che si formino delle zone di "ricircolo", ovvero di corrente vicino a costa con direzione verso nord.

La variabilità delle correnti costiere indotte dai gradienti termici e associata alla salinità dell'acqua è molto accentuata nella zona a nord di Ravenna, mentre la zona sud è caratterizzata da correnti pressoché permanenti verso sud.

## **1.4.2 La fascia di mare antistante l'Emilia-Romagna**

### ***1.4.2.1 La qualità delle acque marino costiere***

La fascia costiera dell'Emilia Romagna è da diversi anni interessata da frequenti fenomeni di eutrofizzazione che hanno portato a profonde alterazioni degli equilibri dell'ecosistema marino. Le manifestazioni dello sviluppo microalgale si evidenziano in colorazioni delle acque, ridotta trasparenza e anossia nelle acque di fondo. Le zone prospicienti al delta del Po e la costa emiliano-romagnola, essendo investite direttamente dagli apporti del bacino idrografico padano veicolati dal Po, nonché dagli apporti dei bacini costieri, sono maggiormente interessate dai processi di eutrofizzazione. In tale zona infatti la grande massa d'acqua dolce del Po, rappresenta il motore e l'elemento caratterizzante del bacino Adriatico nord-occidentale, in grado di determinare e condizionare gran parte dei processi trofici e distrofici nell'ecosistema costiero (ARPA Emilia Romagna, 2010).

Fattori che amplificano il fenomeno in questa zona sono la bassa profondità dei fondali e le particolari condizioni meteorologiche che, soprattutto nel periodo estivo causano lunghi periodi di stabilità della colonna d'acqua e un consecutivo scarso potere di diluizione delle sostanze eutrofizzanti.

Anossia ed ipossia, sono spesso una conseguenza dei fenomeni di eutrofizzazione. La carenza di ossigeno negli strati più profondi è causata dall'accumulo di un'abnorme quantità di biomassa microalgale sui fondali, la quale entra in putrefazione. Il consumo di ossigeno è funzione dell'attività respiratoria dei batteri o degli organismi bentonici che decompongono e remineralizzano la sostanza organica prodotta negli strati superficiali che cade in forma particellata sul fondo. L'utilizzazione e la continua richiesta di ossigeno risulta superiore alla disponibilità per cui si ha la formazione di un ambiente fortemente riducente con produzione di idrogeno solforato e ammoniaca.

La creazione di condizioni ipossiche o anossiche negli strati sottosuperficiali può causare estese morie di pesci e di organismi bentonici, soprattutto di quelli meno mobili (Molluschi, Crostacei, Policheti), la migrazione di pesci e invertebrati in altre aree, una perdita in termini di diversità e la rottura di alcuni cicli riproduttivi con conseguente squilibrio dell'intero ecosistema (Fig. 17).



**Figura 17** Spiaggiamento di pesci, molluschi e crostacei a seguito una fioritura. Porto Garibaldi, 2005. (ARPA Emilia Romagna).

Eutrofizzazione e formazione di strati anossici determinano inoltre impatti negativi su due importanti settori dell'economia regionale e nazionale quali turismo e pesca.

Infatti, le anomale colorazioni delle acque dovute alle alte concentrazioni di biomassa fitoplanctonica in sospensione, i bassi valori di trasparenza che ne conseguono, i cattivi odori derivati dai processi degenerativi, lo spiaggiamento di organismi morti, tendono a ridurre ai minimi termini i requisiti di "appetibilità balneare" del corpo idrico costiero (Rinaldi *et al.*,1995).

#### ***1.4.2.2 Circolazione geostrofica e discontinuità della fascia litoranea***

In una zona costiera dove l'influenza degli apporti fluviali è dominante e la stratificazione in temperatura è rilevante, l'informazione del campo di temperatura e salinità può essere tradotta in quella del campo di velocità associato alle correnti cosiddette "geostrofiche". La parola viene dal greco e significa "terra che gira": infatti per ottenere una relazione tra temperatura, salinità e correnti si suppone che i gradienti di temperatura e salinità inducano un campo di velocità che risente degli effetti della rotazione terrestre. Questo bilancio impone che nell'emisfero nord la circolazione sia antioraria attorno alle zone di bassa pressione, ovvero ciclonica, mentre al contrario attorno alle zone di alta pressione la circolazione sia oraria, ovvero anticiclonica.

La struttura più importante che emerge per tutti i mesi, anche se con diversa intensità, è una separazione netta dei regimi di circolazione tra la regione a nord e a sud dell'area tra Ravenna e Lido Adriano. In generale si può dire che la circolazione a nord di Ravenna sia molto variabile durante l'anno e sia rovesciata in direzione tra l'inverno e l'estate, mentre a sud la corrente, pressoché invariata in direzione durante l'anno, sia generalmente verso sud. Nella regione centrale attorno a Ravenna le correnti possono essere deboli e verso il largo (come nel caso di gennaio e dicembre) o deboli ma verso costa (come nel caso di settembre e ottobre). La circolazione a Nord di Ravenna è caratterizzata da un campo di velocità diretto verso il largo sotto la foce del Po (nella zona antistante il Lido di Volano e il Lido delle Nazioni) che si richiude a nord di Ravenna con correnti verso costa. Queste due correnti opposte sono generalmente disconnesse ma ci sono mesi, quali quelli di aprile, maggio, giugno, dove si può chiaramente vedere che le correnti verso il largo e verso costa si connettono, quasi chiudendosi ad anello, producendo lungo la batimetria dei 10-20 metri una corrente verso sud.

Questo anello è comunemente chiamato vortice in oceanografia ed in particolare in questo caso, vortice anticiclonico (Montanari *et al.*, 2006).

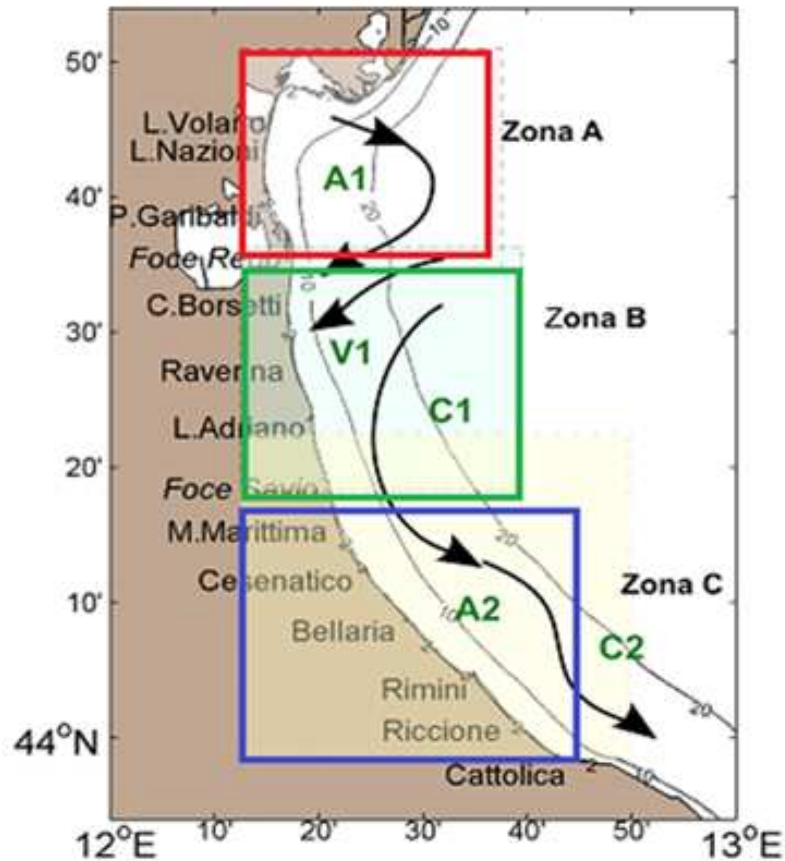
Tale vortice è sempre presente e la circolazione assume dei cambiamenti repentini in direzione nei vari mesi. Tra febbraio e marzo la corrente in questa area ha direzioni opposte, indicando ancora una volta un regime idrodinamico assai variabile ed instabile. Data l'importanza che questo tipo di circolazione può avere per i fenomeni eutrofici della zona costiera è necessario concentrarsi sulla circolazione dei mesi estivi di luglio, agosto e settembre.

A luglio e settembre le correnti sono generalmente verso costa e limitano una zona di alta temperatura e bassa salinità che naturalmente può condurre a fenomeni distrofici, non rari in queste aree. Questa circolazione può essere vista come il bordo del vortice che è però così accostato che non riesce a chiudersi lungo la costa. Il vortice tende a confinare le acque calde e poco salate e la circolazione in agosto è leggermente più "aperta" ovvero di scambio tra la costa ed il mare aperto, ma persiste una condizione di confinamento delle acque di tipo fluviale e ad alta temperatura verso la costa. Nella zona a sud di Ravenna e Lido Adriano le correnti sono generalmente verso sud e dell'ordine di 5-10 cm/sec tutto l'anno. È questa un segmento della famosa corrente del nord Adriatico, chiamata WACC che persiste tutto l'anno raggiungendo la massima intensità tra novembre e gennaio (questi massimi di corrente non si rilevano lungo la costa ma su una batimetria di 20–30 metri, circa 20–30 km da costa facendo sì che si formino delle zone di "ricircolo" ovvero di corrente vicino a costa con direzione verso nord).

Questo segmento di corrente è disconnesso dalla circolazione a nord di Ravenna eccetto che in novembre, settembre, agosto, giugno e febbraio, dove la corrente sembra formare un' unica struttura a curve alternanti (o meandri), ocludendo da un certo punto di vista la zona costiera dagli scambi con il mare aperto. Nella stessa area a sud di Ravenna vi sono mesi dove la componente della corrente lungo costa è decisamente molto debole (marzo e luglio) mentre la componente perpendicolare alla costa è molto forte come nel caso di maggio, luglio, agosto e settembre.

Questa circolazione è indicativa di dinamiche di 'downwelling' lungo la costa, tipiche del regime di venti di questa area. Infatti, il vento di Bora induce fenomeni di accumulo delle acque verso costa, seguiti da processi di sprofondamento e susseguente movimento verso il largo delle acque sul fondo. L'Emilia Romagna è dunque caratterizzata da tre aree, una a nord di Ravenna (area A), una seconda centrata attorno a Ravenna fino a Lido Adriano (zona B) e la terza a sud di Lido Adriano (area C) (Fig. 18).





**Figura 18** Schema della circolazione climatologica dell'Emilia Romagna in superficie (ARPA ER).

Nella zona A esiste un vortice anticiclonico (chiamato A1 nella Figura 19) più o meno sviluppato nei vari mesi dell'anno. Nei mesi di aprile, maggio, agosto, novembre e dicembre, il vortice è ben sviluppato ed è addossato alla costa. Questo accostamento alla linea di costa lascia evidente solo una corrente verso Sud con un meandro che rappresenta il lato orientale del vortice.

Nella zona B invece la corrente è quasi sempre diretta verso costa, fatta eccezione per i mesi di maggio, giugno, luglio e agosto dove la corrente è verso il largo. Questa regione è quella di transizione tra il regime anticiclonico prevalente a nord e quello della corrente intensificata verso sud. L'ipotesi che emerge dall'analisi di queste distribuzioni è che il vortice anticiclonico a nord, essendo più o meno sviluppato durante i diversi mesi dell'anno, possa creare situazioni idrodinamiche diverse che dipendono in larga parte dalla prossimità del vortice alla costa. Qui si può notare come Ravenna faccia da "separatrice di corrente", infatti la variabilità delle correnti costiere indotte dai gradienti termici e associata alla salinità dell'acqua, è molto accentuata nella zona a nord della città, mentre la zona sud è caratterizzata da correnti pressoché permanenti verso sud. La

zona C è invece assai più stabile dal punto di vista delle strutture (Montanari *et al.*, 2006).

Le dighe foranee del Porto canale di Ravenna si estendono fino a 2,6 km verso il largo, sono perpendicolari alla costa e costituiscono una barriera fisica che separa le acque costiere dell'Emilia Romagna in due zone, una a nord e l'altra a sud di Ravenna (Fig. 19).



**Figura 19** Estensione delle dighe foranee del Porto Canale di Ravenna.

## 2 SCOPO DELLA TESI

---

---

Il presente elaborato è frutto del lavoro svolto al Centro Ricerche Marine di Cesenatico (CRM), Laboratorio di Riferimento Nazionale per le Biotossine Marine.

Il Tirocinio per Tesi svolto presso i laboratori del CRM è durato complessivamente 8 mesi, durante i quali abbiamo effettuato analisi sui campioni di *Mytilus galloprovincialis*, provenienti dagli allevamenti situati lungo la fascia di mare antistante l'Emilia Romagna. Per assicurare il prodotto al consumo umano, infatti, i mitilicoltori devono sottoporre i propri organismi filtratori a controlli obbligatori per la rilevazione di biotossine marine. In particolare, sono state effettuate analisi per l'individuazione e quantificazione delle tossine responsabili della PSP (Paralytic Shellfish Poisoning), delle tossine responsabili della ASP (Amnesic Shellfish Poisoning) e delle tossine liposolubili (OAs, PTXs, AZAs e YTXs), responsabili di diverse patologie, tra cui la DSP (Diarrhetic Shellfish Poisoning).

Parallelamente, è stato effettuato il monitoraggio degli organismi in grado di rendere i mitili tossici e di conseguenza responsabili di tali biointossicazioni: le specie algali produttrici di biotossine marine.

Dunque, sono state identificate le specie fitoplanctoniche che possono generare Harmful Algal Blooms (HABs), lungo la costa oggetto di studio.

Tale attività è di fondamentale importanza in quanto, la presenza in mare di un certo numero di cellule di alghe tossiche (variabile a seconda della specie algale), è il primo segnale che ci indica la possibilità che si manifesti tossicità nei mitili.

Imprescindibile, al fine di una completa comprensione del fenomeno degli HABs lungo la costa dell'Emilia Romagna, è stato un attento studio della bibliografia esistente, nonché una dettagliata caratterizzazione dell'area di studio.

L'Adriatico settentrionale è infatti considerata una delle poche regioni del Mar Mediterraneo con produttività in genere alta. Le caratteristiche biologiche di questo ecosistema sono fortemente determinate dalla batimetria, dalla meteorologia, dall'idrodinamismo e dagli apporti fluviali che influenzano fortemente la composizione e l'attività delle comunità pelagiche.

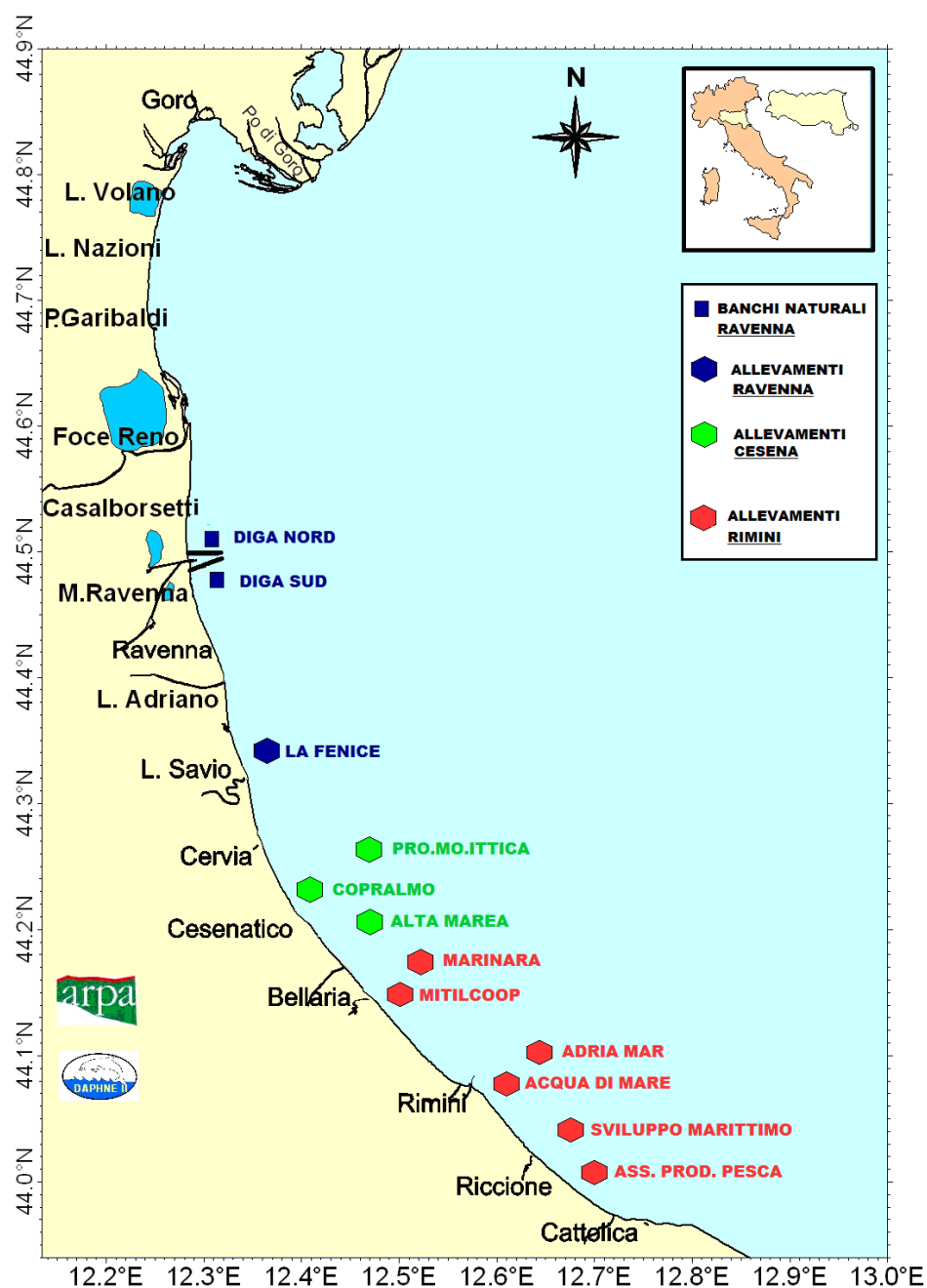
Lo scopo di questo lavoro è quello di determinare la distribuzione spaziale e temporale delle specie tossiche, con particolare riferimento alle specie produttrici di YTXs, e correlare la loro presenza alla rilevazione di biotossine marine nel tessuto dei mitili. Tale

lavoro intende offrire uno spunto, una base di partenza al fine di ottenere un quadro più dettagliato dell'andamento delle specie tossiche lungo la costa oggetto di studio.

### 3 MATERIALI E METODI

#### 3.1 RACCOLTA DEI CAMPIONI

I molluschi bivalvi analizzati durante il mio periodo di permanenza al Centro Ricerche Marine di Cesenatico, provengono dagli allevamenti e dai banchi naturali situati lungo la fascia di mare antistante l'Emilia Romagna (Fig. 20).



**Figura 20** Distribuzione degli allevamenti e dei banchi naturali di *Mytilus galloprovincialis* lungo la costa dell'Emilia Romagna.

La raccolta dei campioni viene effettuata dai tecnici dell'AUSL competente (AUSL di Ravenna, AUSL di Cesena e AUSL di Rimini).

Le calze destinate al prelievo dei molluschi devono essere almeno tre ed essere situate in porzioni diverse dell'allevamento, in modo che il campione risulti rappresentativo dello stato sanitario dell'intera zona di produzione.

Le calze vengono dunque raccolte a bordo della barca dei molluscoltori, al seguito degli operatori dell'AUSL che effettuano il prelievo; i mitili vengono prelevati in cima, al centro e sul fondo di ciascuna calza.

I campioni elementari vengono mescolati fra loro costituendo un campione globale dal quale viene prelevato il campione finale, formato da una sola aliquota di almeno 4 kg, che viene inviata al Centro Ricerche Marine di Cesenatico per le analisi.

Contemporaneamente alle operazioni di prelievo dei mitili vengono effettuate, presso le medesime stazioni di monitoraggio, le operazioni di prelievo dell'acqua di mare per il controllo qualitativo e quantitativo dei popolamenti fitoplanctonici. Per il prelievo di acqua tal quale in superficie vengono utilizzate delle bottiglie da 1 L, mentre per il prelievo lungo la colonna d'acqua (retinata), vengono utilizzate bottiglie da 250 mL, situate alla base di un retino da fitoplancton, ossia un retino di nylon a forma conica con maglie da 20  $\mu\text{m}$  (Fig. 21).



**Figura 21** Retino da fitoplancton.

L'apertura del retino è munita di un anello a cui sono legate cime che a loro volta fanno capo ad un unico cavo con il quale il retino viene trainato. Sul fondo è applicata la bottiglia-collettore nella quale si concentrano gli organismi fitoplanctonici.

Durante il mio periodo di permanenza al Centro Ricerche Marine, ho avuto modo di apprendere le tecniche utilizzate per il campionamento del fitoplancton grazie alla

possibilità, offertami dall'ARPA Emilia Romagna, di partecipare alle attività di monitoraggio a bordo della motonave Daphne II (Fig. 22).



**Figura 22** Campionamento del fitoplancton mediante retinata a bordo della motonave Daphne II.

La Struttura Oceanografica Daphne (Fig. 23) è una delle sezioni operative dell'Azienda Regionale Prevenzione e Ambiente (ARPA) dell'Emilia Romagna.

La sua sede operativa si trova a Cesenatico presso il Centro di Ricerche Marine. Questa Struttura Oceanografica è attiva fin dal 1978 in seguito alla Legge Regionale n.39, *“Interventi per la ricerca ambientale, norme per l'esercizio della Motonave Daphne”*, attualmente in vigore, con cui vennero istituite e disciplinate le attività di monitoraggio e di ricerca delle acque marino-costiere prospicienti la Regione.

L'attività prevalente della Struttura Oceanografica Daphne comprende il monitoraggio effettuato a frequenza settimanale sull'eutrofizzazione delle acque costiere regionali, finalizzato a:

- definire l'intensità e l'estensione delle fioriture microalgali;

- determinare quali-quantitativamente le specie fitoplanctoniche che sostengono i blooms algali;
- controllare le distrofie conseguenti ai processi di eutrofizzazione;
- individuare e determinare gli elementi causali e i fattori limitanti tali processi;
- rilevare i principali parametri fisico-chimici e il loro andamento lungo la colonna d'acqua.

Questo monitoraggio ha permesso la predisposizione di una banca dati informatizzata continuamente aggiornata. Tale banca dati rappresenta un patrimonio unico a livello del Mediterraneo, sia come periodicità di rilevazione ed informazione sul territorio che come contenuto delle variabili ambientali.



**Figura 23** La motonave Daphne II

Dopo essere stati prelevati, i campioni vengono trasferiti in bottiglie di vetro scure e portati in laboratorio, dove viene effettuata l'analisi quali-quantitativa del fitoplancton. Trattandosi di molluschi ad alto potere filtrante, i controlli biotossicologici vengono eseguiti almeno ogni 15 giorni; quando il sistema di controllo rileva la presenza di fitoplancton tossico, con aumento del rischio relativo all'accumulo di biotossine nella polpa dei molluschi, i prelievi vengono eseguiti con frequenza settimanale, o minore e i punti di campionamento possono essere aumentati.



Il trasporto dei campioni al laboratorio d'analisi avviene con contenitori frigoriferi per garantire la corretta conservazione del campione; la procedura prevede l'inizio delle analisi entro 24 ore dal prelevamento.

### **3.2 ANALISI EFFETTUATE AL CENTRO RICERCHE MARINE**

Le analisi per la rilevazione delle biotossine marine e del fitoplancton sono state eseguite presso i laboratori del Centro Ricerche Marine di Cesenatico (Fig. 24).



**Figura 24** Sede del Centro Ricerche Marine

Il CRM, fondato nel 1965 come Centro Universitario di Studi sulla Fauna Marina Commestibile in base ad una convenzione tra il Comune di Cesenatico e l'Università degli Studi di Bologna, nel 1993 è stato nominato dalla Comunità Europea Laboratorio Nazionale di Riferimento per le Biotossine Marine (NRL). Il CRM svolge un'intensa attività di studi e di ricerche sul mare Adriatico e assiste il Ministero della Salute nell'organizzazione del sistema di controllo delle biotossine marine, organizza e coordina le attività di ricerca e monitoraggio dei laboratori nazionali incaricati delle analisi, collabora e si coordina con il Laboratorio Comunitario di Riferimento di Vigo (Spagna).

I metodi utilizzati per la rilevazione di biotossine vengono suddivisi in due gruppi: i metodi biologici e i metodi chimico-strumentali.

I primi sono rapidi, molto sensibili e realizzabili a bassi costi, tuttavia non forniscono informazioni quantitative sul contenuto tossico di un campione biologico, sono soggetti a falsi positivi, e, soprattutto, non forniscono informazioni dettagliate sulla natura delle singole sostanze responsabili della tossicità. Infatti, il *Regolamento (CE) 15/2011 del 10 gennaio 2011*, prevede il superamento dei biotest in quanto l'Autorità Europea per la Sicurezza Alimentare (EFSA) ha espresso parere nel merito ritenendo che gli stessi presentano lacune e pertanto non sono considerati adeguati a causa dell'elevata variabilità dei risultati, della loro insufficiente capacità di rilevazione e della loro limitata specificità. Tuttavia, il test biologico potrà ancora essere utilizzato per un periodo transitorio fino al 31 dicembre 2014.

Le analisi chimico-strumentali, invece, oltre ad essere altamente sensibili, specifiche e selettive, consentono la determinazione qualitativa e quantitativa delle tossine nei molluschi.

### **3.2.1 Metodo biologico**

#### ***3.2.1.1 Determinazione di tossine PSP mediante biotest***

Il metodo di riferimento per la determinazione delle tossine PSP è, attualmente, il saggio di tossicità sul topo.

Il metodo si basa sulla inoculazione intraperitoneale dell'estratto dell'epatopancreas di molluschi in topi adulti albini di razza *Swiss* del peso di 18-20 g. La presenza di tossine genera paralisi e morte che interviene entro pochi minuti dall'inoculazione. Il saggio viene eseguito su 100-150 g di molluschi (peso sgocciolato), che vengono prima omogeneizzati e poi (pesandone 100 g) estratti con 100 mL di HCl 0.1 N. Il pH viene controllato dopo l'estrazione e deve essere inferiore a 4 (preferibilmente intorno a 3). La miscela viene portata ad ebollizione e lasciata bollire per 5 minuti. Si lascia raffreddare e si ricontrolla il pH che deve essere compreso tra 2-4 e comunque non superiore a 4.5. Per abbassare il pH si aggiunge HCl 5 N, mentre per alzarlo si aggiunge NaOH 0.1 N. Successivamente si porta a volume (200 mL) con acqua distillata e si centrifuga. Il soprannatante (di cui si controlla nuovamente il pH) viene iniettato intraperitoneo in tre topi (nella dose di 1 mL per topo). Il test è considerato positivo (tossina determinabile) se la morte del topo avviene entro i 60 minuti successivi all'iniezione.

### 3.2.2 Metodi chimici

#### 3.2.2.1 Determinazione di tossine ASP mediante HPLC

La cromatografia in fase liquida è una tecnica analitica che si può definire come un metodo fisico di separazione, nel quale i componenti da separare si distribuiscono tra due fasi: la fase fissa o stazionaria attraverso la quale si muove la fase definita mobile. La separazione è dovuta alla differenza nei coefficienti di distribuzione dei singoli componenti del campione tra le due fasi.

Nel nostro caso il metodo di cromatografia utilizzata è quello di “ripartizione a fase inversa”, nella quale la fase stazionaria è apolare e la fase mobile è un liquido polare, con eluizione isocratica, cioè con composizione della fase mobile costante nel tempo. La colonna cromatografica è costituita da impaccamento in silice derivatizzata con un idrocarburo lineare a 18 atomi di carbonio ( $C_{18}$ ); in questo modo la silice, fase stazionaria fortemente polare, grazie alla presenza delle catene  $C_{18}$  diventa una fase stazionaria fortemente apolare.

La moderna cromatografia in fase liquida è caratterizzata da pressioni d'ingresso molto elevate, per questo viene definita anche “cromatografia liquida ad alta pressione” o “cromatografia liquida ad alte prestazioni”, a differenza delle prime tecniche di cromatografia nelle quali il flusso della fase mobile veniva ottenuto semplicemente per gravità.

Il controllo del flusso della fase mobile viene fatto dalla pompa, che può regolare la pressione esercitata (pressione costante, in Pascal) oppure il flusso di essa (flusso costante, in mL/min.); tanto più veloce è il flusso della fase mobile, tanto più rapido è il movimento del campione attraverso il sistema. I campioni liquidi vengono iniettati direttamente, mentre i campioni solidi devono essere disciolti in un solvente, che può anche non essere quello impiegato come fase mobile; è inoltre conveniente allontanare eventuali particelle solide mediante filtrazione o centrifugazione perché potrebbero causare il blocco dello strumento di iniezione e delle colonne.

Generalmente si opera a temperatura ambiente o comunque non sopra i 60-70°C.

L'analisi qualitativa si basa sull'identificazione del picco e si esegue con l'ausilio dei “tempi di ritenzione” (che corrispondono al massimo del picco e quindi alla più alta concentrazione di analita), che vengono confrontati con i dati ottenuti analizzando nelle medesime condizioni, degli standard conosciuti. Per avere la certezza che non siano presenti interferenti è sempre consigliabile condurre anche delle analisi in bianco, utilizzando solventi, provette e pipette che verranno usate con i campioni, in modo da

determinare se introducono o meno delle contaminazioni indesiderate nell'analisi cromatografica.

L'analisi quantitativa è basata sulla misura delle aree dei picchi, che sono direttamente proporzionali alla quantità, ovvero alla concentrazione, dell'analita.

Da notare come altezza e area del picco cromatografico siano proporzionali. Una volta calcolata l'area del picco questa viene confrontata con l'area del picco che ci fornisce lo standard; questo procedimento richiede l'iniezione di campioni di uguale volume. Pertanto è raccomandabile iniettare innanzitutto ripetutamente un certo volume di soluzione standard a concentrazione nota, precedentemente preparata, per vedere se le analisi ripetute concordano con i limiti di riproducibilità richiesti.

Un campione quindi fluisce lungo la colonna cromatografica mediante la fase mobile e durante questo percorso le singole sostanze vengono rallentate dalla fase stazionaria in funzione delle interazioni che si generano tra i componenti del campione, la fase mobile e la fase stazionaria. Se non vi fossero interazioni le molecole del campione viaggerebbero attraverso la colonna con la stessa velocità della fase mobile.

Tale tecnica analitica permette l'identificazione e la determinazione degli acidi domoico ed epi-domoico (DA+epi-DA) in molluschi bivalvi.

L'acido domoico viene estratto dalla polpa dei molluschi con una soluzione metanolo:acqua 1:1 (v/v) e, dopo filtrazione, viene determinato mediante HPLC in isocratica su colonna C<sub>18</sub> a fase inversa, con rivelazione spettrofotometrica UV alla lunghezza d'onda di 242 nm (Fig. 25).



**Figura 25** Strumento per HPLC-UV.

I rivelatori ottici utilizzati in HPLC consistono in un raggio luminoso che viene fatto passare attraverso il liquido in uscita dalla colonna; le variazioni di intensità della luce, per assorbimento di raggi UV, emissioni fluorescenti, o mutamenti nell'indice di rifrazione (a seconda del rivelatore usato), provocate dal passaggio dei componenti del campione attraverso la cella, vengono trasformate in una variazione della tensione di uscita. Queste variazioni vengono inviate ad un registratore potenziometrico o immesse in un sistema di elaborazione computerizzato. Un rivelatore in grado di misurare l'assorbimento di raggi ultravioletti a lunghezza d'onda variabile operante tra 190 e 350 nm, è adatto alla rivelazione di quasi tutte le sostanze. Se si conoscono le proprietà del campione da analizzare è semplice decidere il tipo di rivelatore da utilizzare e la lunghezza d'onda di lavoro: si sceglierà di solito la lunghezza d'onda alla quale il campione presenta un massimo d'assorbimento.

La preparazione del campione consiste nell'apertura del mollusco mediante il taglio dei muscoli adduttori e nella rimozione della polpa, la quale viene lasciata scolare per 5 minuti; vengono pesati e omogeneizzati circa 100 g e un'aliquota di 4 g di campione viene addizionata con 16 mL di soluzione estraente metanolo:acqua 1:1 (v/v) in una provetta da 30 mL circa. Si estrae utilizzando un omogeneizzatore ad immersione per 3 minuti a 10.000 rpm e si centrifuga l'estratto a 3000 rpm per 10 minuti. Si filtra una porzione di surnatante attraverso un filtro da 0.20 µm e la si trasferisce in un vial per autocampionatore.

Per la separazione cromatografica si utilizza un'eluizione isocratica a 40°C, con un flusso della fase mobile di un 1 mL/min; il volume di campione iniettato è di 20 µl.

Prima di ogni serie analitica è indispensabile determinare il "bianco-reagente" applicando l'intero metodo di analisi, tralasciando la porzione di campione per l'analisi; nel cromatogramma non dovrebbero essere presenti picchi interferenti con l'acido domoico.

L'identificazione dell'acido domoico si ottiene confrontando il tempo di ritenzione del picco del campione ed il tempo di ritenzione del picco degli standard di acido domoico.

La determinazione quantitativa si ottiene interpolando l'area del picco dell'acido domoico con la curva di calibrazione (retta di taratura); la concentrazione, espressa in mg di acido domoico su kg di polpa viene calcolata secondo la seguente equazione:

$$C(\text{mgDA} + \text{epiDA} / \text{Kg}) = \frac{\mu\text{gDA} + \text{epiDA} / \text{mL di estratto iniettati}}{W} \times D \times V_T \times \frac{100}{R_m}$$

*Equazione della retta per la curva di taratura:  $y = ax + b$*

y: area del picco dell'acido domoico del campione

a: coefficiente angolare della curva di taratura

x: concentrazione della soluzione di riferimento

b: intercetta della curva sull'asse delle y

V<sub>T</sub>: volume totale dell'estratto (20 mL)

W: peso della polpa del campione in g (di solito 4 g)

D: fattore di diluizione (se l'estratto è stato diluito)

R<sub>m</sub>: recupero medio (%)

### ***3.2.2.3 Determinazione di tossine liposolubili mediante LC-MS***

Tra i metodi strumentali utilizzati per la rivelazione delle biotossine un posto di rilievo è occupato dalle tecniche di accoppiamento della cromatografia liquida con la spettrometria di massa (LC-MS).

L'LC-MS si è dimostrato uno strumento estremamente utile per la determinazione qualitativa e quantitativa delle tossine nel plankton e nei mitili, per l'identificazione di nuove tossine e la ricerca sul metabolismo delle tossine nei molluschi eduli (Quilliam, 1996).

Quattro gruppi di composti, classificati in base alle loro caratteristiche chimico-fisiche, fanno parte delle cosiddette tossine liposolubili: gruppo dell'acido okadaico, che include le dinophysistossine (AOs), gruppo delle pectenotossine (PTXs), gruppo degli azaspiracidi (AZAs), gruppo delle yessotossine (YTXs).

L'LC-MS è la sola tecnica che si è dimostrata valida per l'analisi di tutte le tossine e che soddisfa le esigenze sia dei laboratori interessati al monitoraggio che alla ricerca sulle biotossine marine.

L'accoppiamento HPLC-Massa fornisce infatti:

- ✓ Possibilità di rivelazione universale
- ✓ Alta sensibilità, con limiti di rivelazione nell'ordine delle parti per bilione
- ✓ Alta selettività e specificità
- ✓ Minimo clean-up del campione
- ✓ Possibilità di esaminare tossine labili e molto diverse strutturalmente
- ✓ Quantificazione accurata e precisa

- ✓ Ampio range di risposta lineare
- ✓ Possibilità di automazione
- ✓ Alta produttività
- ✓ Rapidità nella messa a punto di metodi analitici
- ✓ Accettabilità legale negli studi confirmatori
- ✓ Informazioni strutturali per l'identificazione di nuove tossine, analoghi di tossine note e metaboliti.

La spettrometria di massa consente di misurare le masse molecolari e di determinare quindi la formula di struttura di composti sconosciuti, anche avendone a disposizione piccole quantità. A differenza delle tecniche spettroscopiche, essa è un metodo d'analisi distruttivo (la molecola non rimane intatta dopo l'analisi), e soprattutto non si basa sull'interazione tra radiazioni e materia. Una molecola però, per poter essere osservata e misurata nelle sue proprietà di massa, deve essere prima volatilizzata e ionizzata in una componente dello spettrometro detta sorgente di ionizzazione. Per ottenere uno spettro di massa, infatti, il requisito essenziale è di produrre degli ioni in fase gassosa che saranno successivamente accelerati fino a raggiungere una velocità specifica mediante un campo elettrico, e poi proiettati in un analizzatore di massa appropriato che separa entità di masse diverse ed infine, rilevare ogni composto dotato di carica e con una certa massa sequenzialmente nel tempo. Ciò si traduce più sinteticamente col dire che in uno spettrometro di massa il campione è prima ionizzato in sorgente; gli ioni risultanti sono poi separati in funzione del loro rapporto massa/carica ( $m/z$ ) nell'analizzatore.

La procedura di estrazione consiste nel pesare accuratamente  $2,00 \pm 0,05$  g di tessuto omogenato in un tubo da centrifuga. Si aggiungono circa 9 mL di soluzione estraente (MeOH 100%) e si omogeneizza con omogeneizzatore ad immersione ad alta velocità per 1 minuto. Dopo centrifugazione per 10 minuti, si raccoglie il surnatante in una falcon da 50 mL. L'estrazione del pellet residuo viene ripetuta con altri 9 mL di MeOH 100% ed omogeneizzazione per 1 minuto con omogeneizzatore ad immersione. Dopo centrifugazione a  $2000 \times g$  o maggiore, per 10 min, il surnatante viene trasferito nella stessa falcon, combinandolo con il primo estratto. Si aggiunge alla falcon MeOH 100%, in modo da ottenere un volume finale di estratto pari a 20 mL.

Per la determinazione di AO e derivati non esterificati (PTXs, AZAs, YTXs), si filtra l'estratto con filtro siringa in cellulosa rigenerata di porosità  $0,20 \mu m$  e si trasferisce in

un vial per auto campionatore; 5  $\mu$ L di tale estratto filtrato vengono iniettati in LC-MS/MS (Fig. 26).



**Figura 26** Strumento per LC-MS/MS.

Invece, per la determinazione di AO e derivati totali si effettua, prima dell'iniezione in LC-MS, l'idrolisi alcalina, necessaria per la determinazione degli esteri dell'acido okadaico e delle dinophysistossine comunemente indicati come DTX3. Tramite idrolisi, gli esteri dell'AO e delle DTXs vengono trasformati nelle corrispondenti tossine non esterificate: il risultato finale è quindi la somma delle tossine cosiddette "libere" più i rispettivi esteri.

L'idrolisi viene eseguita in una provetta in pyrex da 10 mL con tappo a vite: ad 1 mL dell'estratto si aggiungono 125  $\mu$ l di NaOH 2,5 M. Dopo agitazione in vortex si pone in un bagno termostato (a  $76 \pm 3$  °C per 40 minuti), si lascia raffreddare a temperatura ambiente e si neutralizza con 125  $\mu$ l di HCl 2,5 M. L'estratto così trattato viene filtrato con filtro siringa in cellulosa rigenerata (o altro materiale idoneo) di porosità 0,20  $\mu$ m e trasferito in un vial per auto campionatore; 5  $\mu$ l di tale materiale, idoneo per la quantificazione dell'AO e derivati totali, vengono iniettati in LC-MS/MS.



### 3.3 ANALISI QUALI-QUANTITATIVA DEL FITOPLANCTON

---

Lo studio del fitoplancton, svolto presso i laboratori del CRM di Cesenatico, include: l'osservazione dei campioni al microscopio a luce invertita (Fig. 27), la classificazione a livello di specie del fitoplancton tossico, i conteggi tramite il metodo di Utermohl ed il calcolo della densità cellulare.

L'analisi qualitativa e quantitativa del fitoplancton segue il metodo della sedimentazione o metodo di Utermöhl (Utermöhl, 1958). Nella scelta del volume da sedimentare si può far riferimento ai valori di clorofilla *a* relativi al campione da

analizzare o alle caratteristiche del luogo del prelievo (ricco o povero di fitoplancton).

Il campione va randomizzato capovolgendolo delicatamente un centinaio di volte (o per circa 1 minuto) e successivamente viene fatto sedimentare un subcampione in camere di sedimentazione da 2, 5, 10, 25, 50 o 100 mL a seconda della densità fitoplanctonica; a questo punto si aggiunge il fissativo e si lascia completare la sedimentazione per un tempo pari a tre ore per ogni centimetro d'altezza del cilindro. Logicamente il tempo di sedimentazione deve essere tanto più lungo quanto più piccole sono le dimensioni del fitoplancton.

I fissativi maggiormente utilizzati per la conservazione dei campioni sono la soluzione di Lugol e la formaldeide (Thronsen, 1978). È buona pratica osservare prima della fissazione una frazione del campione fresco in quanto l'esame del campione non fissato può fornire utili informazioni per la caratterizzazione del colore, della morfologia e della motilità delle cellule fitoplanctoniche.

La soluzione di Lugol acida è il fissativo consigliato, in quanto meno tossico per l'operatore rispetto alla formaldeide. Il Lugol è adatto alla conservazione di Dinoflagellati, Diatomee anche poco salificate e piccoli flagellati; è meno indicato per i Coccolitoforidei in quanto può dissolvere il loro involucro di carbonato di calcio ( $\text{CaCO}_3$ ) se conservati per tempi superiori ad un mese.



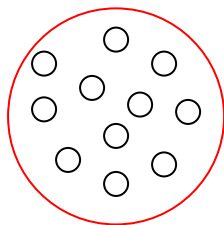
**Figura 27** Microscopio rovesciato

Le dosi consigliate sono di 0,5-1 mL di soluzione ogni 250 mL di campione. La colorazione bruna indotta da questa soluzione rende visibili cellule evanescenti, ma una concentrazione eccessiva può compromettere la completa visione. Per eliminare quest'ultimo aspetto è utile l'aggiunta di tiosolfato di sodio che ha effetto schiarente.

I campioni così fissati, mantenuti a temperatura ambiente e al buio, si mantengono anche 12 mesi. Col tempo però il colore della soluzione tende a schiarire a causa dell'ossidazione dello iodio riducendo le proprietà fissative.

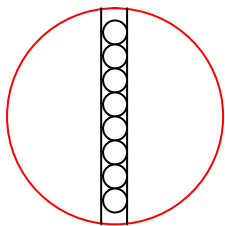
Il conteggio delle cellule algali viene effettuato sull'intera camera di sedimentazione per le specie di grandi dimensioni e poco abbondanti e per campi casuali o per transetti per quelle di più piccole dimensioni ed abbondanti.

*Conteggio per campi casuali:* il numero dei campi casuali deve corrispondere ad almeno un centesimo dell'area totale della camera di sedimentazione. Se il totale delle cellule fitoplanctoniche è inferiore a 200, si deve aumentare il numero dei campi. Il numero di campi dipende anche dalla distribuzione delle alghe, infatti ci deve essere omogeneità fra i conteggi dei vari campi.



- Bordo della camera di sedimentazione
- Campo visivo

*Conteggio per transetti:* si deve considerare un transetto diametrico ed effettuare i conteggi all'interno di questa area; in caso di densità planctonica ridotta è utile aumentare il numero dei transetti, in modo da contare almeno 200 cellule totali.



- Bordo della camera di sedimentazione
- Campo visivo

Per l'osservazione è utilizzato un microscopio rovesciato a contrasto di fase con ingrandimento di circa 400x.

Comunque, prima di ogni tipo di conteggio si effettua una lettura sul fondo della camera di sedimentazione che consiste nel porsi con il campo visivo in corrispondenza del bordo della camera e proseguire a zig-zag coprendo tutta la superficie. Questo metodo permette di osservare il fitoplancton di maggiori dimensioni ed i tipi algali poco abbondanti fra cui ritroviamo le microalghe produttrici di biotossine.

Il calcolo della densità fitoplanctonica va effettuato applicando le seguenti formule:

*a) per conteggi casuali su campi di dimensioni pari al campo visivo:*

$$C = (N \cdot 1000 \cdot A) / (n \cdot v \cdot a)$$

dove:

C = densità fitoplanctonica del campione, espressa in cellule/litro

N = totale cellule contate in tutti i campi

A = area totale della superficie di fondo della camera (in mm<sup>2</sup>)

n = numero dei campi sui quali si è effettuato il conteggio

v = volume (in mL) del campione messo a sedimentare

a = area del campo visivo considerato (in mm<sup>2</sup>)

*b) per conteggi su transetti passanti per il centro della camera di sedimentazione:*

$$C = (N \cdot \pi \cdot r \cdot 1000) / (2 \cdot h \cdot v \cdot n)$$

dove:

C = densità fitoplanctonica del campione, espressa in cellule/litro

N = numero totale di cellule contate su tutti i transetti

r = raggio (in mm) della camera di sedimentazione

h = altezza (in mm) del transetto

v = volume (in cm<sup>3</sup>) del campione messo a sedimentare

n = numero di transetti sui quali si è effettuato il conteggio

È importante specificare anche il limite di detenzione, ossia la concentrazione minimale di un taxon o gruppo specifico che permette la sua individuazione con una probabilità

specifica. Per un singolo taxon, il limite di detenzione può essere determinato attraverso il modello di Poisson secondo la formula:

$$n_{\text{det}} = - \ln (a) f_{\text{totale}} / V \cdot f_{\text{contato}}$$

dove:

$n_{\text{det}}$  = limite di detenzione

$a$  = livello di significatività (di solito 0,05 che corrisponde ad una probabilità del 95%)

$f_{\text{totale}}$  = numero totale dei campi sull'intero fondo della camera di sedimentazione

$f_{\text{contato}}$  = numero di campi esaminati

$V$  = volume del subcampione esaminato (in litri)

Si rende necessario specificare tale limite in quanto definisce il numero minimo di uno specifico taxon o gruppo di organismi in un campione che può essere contato con una certa probabilità.

Ad esempio, per un livello di significatività pari a 0,05 ed un volume di campione di 25 mL, il limite di detenzione, in caso di conteggio su tutto il fondo della camera, sarà uguale a 120.

Nel presente lavoro i conteggi sono stati effettuati sull'intero fondo della camera di sedimentazione, proprio per rilevare la presenza di microalghe tossiche poco abbondanti; molte delle specie indagate, infatti, sono in grado di produrre tossicità anche ad una bassa concentrazione.

Una volta completata la lettura del campione, si è passati alla compilazione delle schede di monitoraggio; la Figura 28 mostra una tipica scheda utilizzata al Centro Ricerche Marine di Cesenatico, per la rilevazione di specie potenzialmente tossiche.

<b>CAMPIONE N°</b> _____	<input type="checkbox"/> Acqua tq <input type="checkbox"/> Retinata	Data inizio analisi _____
DATA _____	Campione fissato <input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> NO	Ora inizio sedimentazione _____
Punto di prelievo _____	Fissativo: <input type="checkbox"/> Lugol <input type="checkbox"/> Formaldeide	Data fine analisi _____
		Ora inizio lettura _____

<b>TAXA</b>			
CAMPO 1			
CAMPO 2			
CAMPO 3			
CAMPO 4			
CAMPO 5			
CAMPO 6			
CAMPO ...			
CAMPO 15			
TRANSETTO 1			
TRANSETTO 2			
FONDO			
Cell/L			

<b>Fitoplancton potenzialmente tossico (cell/L):</b>	Volume sedimentato (mL)	<b>NOTE:</b>	
<i>Alexandrium</i> spp.	Camera di sedimentazione N°		
<i>Dinophysis</i> spp.	Campione condizionato <input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> NO		
<i>G. spinifera</i>	Microscopio <input type="checkbox"/> 50 B <input type="checkbox"/> 51 B		
<i>L. polyedrum</i>	Sigla operatore _____ Sigla controllo _____		
<i>P. reticulatum</i>			
<i>Pseudo-nitzschia</i> spp.			
Altre specie			
Diatomee tot	Dinoficee tot		Altri fitoflag.

**Figura 28** Scheda di monitoraggio per le specie tossiche e potenzialmente tossiche

### **3.4 ANALISI GRAFICA**

---

Nella realizzazione del presente elaborato sono stati utilizzati diversi software. Per l'analisi delle correlazioni tra i vari parametri esaminati sono stati impiegati Microsoft Excel e Grapher 9 di Golden Software.

Microsoft Excel è un programma prodotto da Microsoft, dedicato alla produzione ed alla gestione dei fogli elettronici e risulta attualmente il foglio elettronico più utilizzato.

Grapher 9 è in grado di generare grafici bidimensionali e tridimensionali a partire da equazioni matematiche.

Per la rappresentazione grafica, oltre ai due sopracitati software, è stato adoperato Surfer 9 di Golden Software. Quest'ultimo è un programma che converte i dati di interesse in rilevamenti, superfici, curve, immagini e mappe.

## 4 RISULTATI E DISCUSSIONE

---

---

### 4.1 ANALISI DEL FITOPLANCTON TOSSICO

Le analisi del fitoplancton tossico sono state effettuate al Centro Ricerche Marine di Cesenatico (CRM), Laboratorio Nazionale di Riferimento per le Biotossine Marine, nel periodo compreso tra aprile e novembre 2012.

Tra le specie algali sottoposte a monitoraggio vi sono quelle appartenenti al genere *Alexandrium*, noto per la produzione di STXs e responsabile della *Paralytic Shellfish Poisoning* (PSP). Questi dinoflagellati comprendono più specie neurotossiche di quelle appartenenti a qualsiasi altro genere di alga tossica. Specie tossiche molto diffuse sono *A. tamarense*, *A. catenella*, *A. fundyense*, *A. lusitanicum*, *A. minutum*. Tale genere comprende specie tossiche e non tossiche, a volte molto simili tra loro. Per questo motivo esistono una serie di chiavi di identificazione utilizzate per il riconoscimento a livello morfologico.

Il genere *Dinophysis*, noto per la produzione di DTXs e OA, è responsabile della *Diarrhetic Shellfish Poisoning* (DSP). Tutte le specie di *Dinophysis*, finora note, sono tossiche. Le diverse specie presentano morfologie facilmente distinguibili.

Le diatomee appartenenti al genere *Pseudo-nitzschia* sono invece responsabili della *Amnesic Shellfish Poisoning* (ASP), a causa della produzione di DA. Non tutte le specie sono tossiche e la stessa specie può risultare tossica in determinate circostanze e non in altre.

Sono inoltre sottoposte ad un continuo monitoraggio le specie produttrici di YTXs: *Gonyaulax spinifera*, *Lingulodinium polyedrum* e *Protoceratium reticulatum* (sinonimo di *Gonyaulax grindleyi*).

La grande varietà e abbondanza di yessotossine, lungo le coste dell'Emilia Romagna, costituisce uno dei principali problemi per la raccolta e commercializzazione dei molluschi bivalvi.

Di seguito sono riportati i dati del monitoraggio delle alghe tossiche e potenzialmente tossiche, effettuato mediante l'analisi dei campioni d'acqua di mare prelevati presso i banchi naturali e gli allevamenti di mitili situati lungo la costa oggetto di studio.

#### 4.1.1 Analisi del fitoplancton - Ravenna

La fascia di mare compresa tra Casalboretto e Lido di Savio, nel periodo compreso tra aprile e novembre, è caratterizzata da una maggiore abbondanza di specie tossiche.

In particolare, le analisi dei campioni d'acqua provenienti dalle Dighe Foranee di Ravenna, rivelano una concentrazione di *G. spinifera* che raggiunge valori ragguardevoli (evidenziati in giallo), partire dal mese di settembre in "Diga Sud" (Tab. 2) ed a partire dal mese di ottobre in Diga Nord (Tab. 1).

Fitoplancton potenzialmente tossico (cell/L):						
DATA	<i>Alexandrium</i> spp.	<i>Dinophysis</i> spp.	<i>G. spinifera</i>	<i>L. polyedrum</i>	<i>P. reticulatum</i>	<i>Pseudo-nitzschia</i> spp.
18-apr	0	0	0	0	0	560
10-mag	120	80	0	0	0	0
24-mag	680	0	0	0	0	0
07-giu	1040	80	0	0	240	0
21-giu	280	7720	0	40	0	160
05-lug	0	120	0	0	0	2840
19-lug	40	0	0	0	0	340564
07-ago	80	0	0	0	0	54080
22-ago	240	0	0	160	120	401025
11-set	200	160	0	0	440	279793
18-set	0	0	240	0	0	26420
01-ott	0	120	20440	2320	40	0
22-ott	0	40	4960	560	40	4000
19-nov	0	0	0	0	0	0

Tabella 1 Analisi del fitoplancton relativa al banco naturale "Diga Nord" (Ravenna). In giallo: aumento della concentrazione *G. spinifera*.

Fitoplancton potenzialmente tossico (cell/L):						
DATA	<i>Alexandrium</i> spp.	<i>Dinophysis</i> spp.	<i>G. spinifera</i>	<i>L. polyedrum</i>	<i>P. reticulatum</i>	<i>Pseudo-nitzschia</i> spp.
18-apr	120	0	0	0	0	61903
10-mag	800	560	0	0	0	0
24-mag	280	0	0	0	0	0
07-giu	320	200	0	0	0	0
21-giu	280	4200	0	40	40	0
05-lug	200	80	0	0	0	0
19-lug	200	0	0	0	0	81674
07-ago	0	0	0	0	0	2040
22-ago	120	0	0	0	40	111173
11-set	120	240	0	200	640	295124
18-set	0	0	3160	0	0	19311
01-ott	0	120	7920	600	0	0
22-ott	0	0	233030	4240	0	0
19-nov	40	0	0	40	40	120

Tabella 2 Analisi del fitoplancton relativa al banco naturale "Diga Sud" (Ravenna). In giallo: aumento della concentrazione *G. spinifera*.



Il dinoflagellato *G. spinifera* raggiunge valori molto elevati (233.030 cell/L) in “Diga Sud” il 22 ottobre.

Le comunità fitoplanctoniche in prossimità della “Diga Nord” possono differire significativamente, sia in composizione che in abbondanza, da quelle della “Diga Sud”. Infatti, le dighe foranee del Porto canale di Ravenna si estendono fino a 2,6 km verso il largo, sono perpendicolari alla costa e costituiscono una barriera fisica che separa le acque costiere dell’Emilia Romagna in due zone, una a nord e l’altra a sud di Ravenna.

In corrispondenza degli stessi siti si registra, nel mese di ottobre, anche un significativo aumento di *L. polyedrum* (Tab. 1 e 2).

Nonostante l’elevata presenza di specie fitoplanctoniche del genere *Pseudo-nitzschia*, in tutti gli allevamenti considerati, non sono mai state messe in evidenza nei molluschi tossine idrosolubili del tipo ASP, che superassero il limite previsto dalla legge. Questo perché alcune specie appartenenti a tale genere sono tossiche, altre no.

L’allevamento “La Fenice” non mostra invece concentrazioni particolarmente elevate delle specie produttrici di YTXs, mentre si registra un discreto aumento di *Dinophysis* spp. in data 27 giugno (Tab. 3). Non si sono mai verificati, tuttavia, fenomeni di tossicità legati a questi dinoflagellati, nel periodo di tempo esaminato.

Fitoplancton potenzialmente tossico (cell/L):						
DATA	<i>Alexandrium</i> spp.	<i>Dinophysis</i> spp.	<i>G. spinifera</i>	<i>L. polyedrum</i>	<i>P. reticulatum</i>	<i>Pseudo-nitzschia</i> spp.
16-apr	0	0	0	0	0	2680
30-apr	0	0	0	0	0	0
23-mag	120	0	0	0	0	0
14-giu	120	0	0	0	0	0
27-giu	400	2600	0	0	40	0
11-lug	0	40	0	0	0	0
26-lug	0	80	0	0	40	116659
14-ago	80	40	0	0	0	1000
28-ago	0	0	0	0	120	2240
18-set	0	0	120	0	0	26367
03-ott	0	80	40	0	0	160

Tabella 3 Analisi del fitoplancton relativa all’allevamento “La Fenice” (Ravenna).

#### 4.1.2 Analisi del fitoplancton - Cesenatico

Il monitoraggio del fitoplancton tossico degli allevamenti situati al largo di Cesenatico, mostra aumenti meno significativi di *G. spinifera* (Tab. da 4 a 6).

Fitoplancton potenzialmente tossico (cell/L):						
DATA	<i>Alexandrium</i> spp.	<i>Dinophysis</i> spp.	<i>G. spinifera</i>	<i>L. polyedrum</i>	<i>P. reticulatum</i>	<i>Pseudo-nitzschia</i> spp.
3-apr	120	0	0	0	0	15680
23-apr	40	0	0	0	0	1000
9-mag	3200	0	0	0	0	80
24-mag	120	0	0	0	0	0
6-giu	360	0	0	0	0	0
21-giu	560	520	0	40	440	0
4-lug	80	360	0	0	0	0
17-lug	120	0	0	0	40	600
1-ago	40	0	0	0	0	6560
16-ago	0	0	0	0	0	240
30-ago	0	0	0	0	0	2120
18-set	0	0	760	0	0	2480
2-ott	0	40	40	0	0	207585
18-ott	0	40	40	80	0	34720
08-nov	0	160	200	40	0	320

Tabella 4 Analisi del fitoplancton relativa all'allevamento "Alta Marea" (Cesenatico).

Fitoplancton potenzialmente tossico (cell/L):						
DATA	<i>Alexandrium</i> spp.	<i>Dinophysis</i> spp.	<i>G. spinifera</i>	<i>L. polyedrum</i>	<i>P. reticulatum</i>	<i>Pseudo-nitzschia</i> spp.
03-apr	280	0	0	0	0	18560
23-apr	280	0	0	0	0	2680
09-mag	1600	0	0	0	0	0
24-mag	120	0	0	0	0	0
06-giu	320	40	0	0	0	0
21-giu	560	920	0	0	240	0
04-lug	0	200	0	0	0	0
17-lug	0	40	0	0	0	80
01-ago	0	200	0	0	0	12280
16-ago	0	0	0	0	0	3000
30-ago	0	0	0	0	0	2320
18-set	0	0	1840	0	0	4320
02-ott	0	0	80	0	0	54240
18-ott	0	0	240	120	0	720
08-nov	0	0	240	40	0	800

Tabella 5 Analisi del fitoplancton relativa all'allevamento "Copralmo" (Cesenatico).

Fitoplancton potenzialmente tossico (cell/L):						
DATA	<i>Alexandrium</i> spp.	<i>Dinophysis</i> spp.	<i>G. spinifera</i>	<i>L. polyedrum</i>	<i>P. reticulatum</i>	<i>Pseudo-nitzschia</i> spp.
03-apr	200	0	0	0	0	16720
23-apr	280	0	0	0	0	840
09-mag	1440	0	0	0	0	0
24-mag	80	40	0	0	0	0
06-giu	720	0	0	0	0	0
21-giu	200	200	0	0	320	160
04-lug	40	200	0	0	0	0
17-lug	0	0	0	0	40	0
01-ago	80	80	0	0	0	12720
16-ago	40	0	40	0	0	1480
30-ago	0	0	0	0	0	1280

Tabella 6 Analisi del fitoplancton relativa all'allevamento "Pro. Mo. Ittica" (Cesenatico).

Anche se non paragonabili alle concentrazioni algali degli allevamenti di Ravenna, si registrano comunque discreti livelli delle specie produttrici di YTXs, anche negli allevamenti al largo di Cesenatico.

#### 4.1.3 Analisi del fitoplancton - Rimini

Le analisi dei campioni d'acqua di mare provenienti dagli allevamenti situati nella fascia di mare compresa tra Bellaria e Cattolica, rivelano dei risultati del tutto differenti (Tab. da 7 a 12).

Fitoplancton potenzialmente tossico (cell/L):						
DATA	<i>Alexandrium</i> spp.	<i>Dinophysis</i> spp.	<i>G. spinifera</i>	<i>L. polyedrum</i>	<i>P. reticulatum</i>	<i>Pseudo-nitzschia</i> spp.
04-mag	120	0	0	0	0	0
22-mag	400	40	0	0	0	0
14-giu	160	0	0	40	0	0
25-giu	160	480	0	0	160	0
02-lug	80	440	0	40	40	0
19-lug	0	120	0	0	120	3040
06-ago	0	0	0	0	0	1040
21-ago	40	0	0	0	40	4080
12-set	0	0	0	0	320	247109
11-ott	0	0	0	0	0	8080

Tabella 7 Analisi del fitoplancton relativa all'allevamento "Mitolcoop" (Bellaria).

Fitoplancton potenzialmente tossico (cell/L):						
DATA	<i>Alexandrium</i> spp.	<i>Dinophysis</i> spp.	<i>G. spinifera</i>	<i>L. polyedrum</i>	<i>P. reticulatum</i>	<i>Pseudo-nitzschia</i> spp.
04-mag	400	0	0	0	0	0
22-mag	40	0	0	0	0	0
14-giu	120	0	0	0	40	0
25-giu	120	240	0	0	200	0
02-lug	120	840	0	40	80	0
19-lug	120	40	0	0	80	800
06-ago	0	80	0	0	0	2720
21-ago	0	0	0	0	0	2760
12-set	0	0	0	0	840	229163
11-ott	0	40	0	0	0	7840

Tabella 8 Analisi del fitoplancton relativa all'allevamento "Marinara" (Bellaria).

Fitoplancton potenzialmente tossico (cell/L):						
DATA	<i>Alexandrium</i> spp.	<i>Dinophysis</i> spp.	<i>G. spinifera</i>	<i>L. polyedrum</i>	<i>P. reticulatum</i>	<i>Pseudo-nitzschia</i> spp.
19-apr	0	0	0	0	0	32400
04-mag	320	0	0	0	0	360
22-mag	160	0	0	0	0	1560
14-giu	120	0	0	0	0	0
25-giu	80	760	0	40	240	0
09-lug	0	0	0	0	0	0
19-lug	0	0	80	0	40	0
06-ago	40	120	0	0	0	4800
21-ago	40	40	0	0	0	2880
12-set	0	0	0	0	320	104422
11-ott	0	0	0	0	0	28320

Tabella 9 Analisi del fitoplancton relativa all'allevamento "Acqua di Mare" (Rimini).

Fitoplancton potenzialmente tossico (cell/L):						
DATA	<i>Alexandrium</i> spp.	<i>Dinophysis</i> spp.	<i>G. spinifera</i>	<i>L. polyedrum</i>	<i>P. reticulatum</i>	<i>Pseudo-nitzschia</i> spp.
19-apr	40	0	0	0	0	24400
04-mag	600	0	0	0	0	0
24-mag	120	40	0	0	0	0
14-giu	160	0	0	0	0	0
25-giu	200	480	0	0	400	0
05-lug	0	0	0	0	0	0
19-lug	40	0	0	0	80	0
06-ago	0	80	0	0	0	5920
21-ago	0	0	0	0	0	5480
12-set	0	0	0	0	80	139396
11-ott	0	40	0	0	0	69920

Tabella 10 Analisi del fitoplancton relativa all'allevamento "Adria Mar" (Rimini).

Fitoplancton potenzialmente tossico (cell/L):						
DATA	<i>Alexandrium</i> spp.	<i>Dinophysis</i> spp.	<i>G. spinifera</i>	<i>L. polyedrum</i>	<i>P. reticulatum</i>	<i>Pseudo-nitzschia</i> spp.
19-apr	120	0	0	0	0	15200
04-mag	520	0	0	0	0	2760
22-mag	480	40	0	0	0	1040
14-giu	240	0	0	0	0	0
25-giu	560	280	0	0	240	0
09-lug	0	40	0	0	0	0
19-lug	0	0	40	0	0	0
06-ago	80	0	0	0	0	3680
21-ago	40	0	0	0	0	8320
12-set	0	0	0	0	40	183505
11-ott	0	0	0	0	0	83034

Tabella 11 Analisi del fitoplancton relativa all'allevamento "Sviluppo Marittimo" (Cattolica).

Fitoplancton potenzialmente tossico (cell/L):						
DATA	<i>Alexandrium</i> spp.	<i>Dinophysis</i> spp.	<i>G. spinifera</i>	<i>L. polyedrum</i>	<i>P. reticulatum</i>	<i>Pseudo-nitzschia</i> spp.
19-apr	0	0	0	0	0	43680
04-mag	360	0	0	0	0	720
22-mag	320	0	0	0	0	4560
14-giu	120	0	0	0	0	0
25-giu	120	120	0	0	640	0
09-lug	40	80	0	0	80	0
19-lug	0	0	0	0	40	320
06-ago	40	0	0	0	0	1440
21-ago	0	0	0	0	0	3840
12-set	0	0	0	0	40	229704
11-ott	0	0	0	0	0	90922

Tabella 12 Analisi del fitoplancton relativa all'allevamento "Associazione Produttori Pesca" (Cattolica).

Infatti, dalle precedenti tabelle si può notare che i dinoflagellati *G. spinifera* e *L. polyedrum* sono quasi del tutto assenti, per il periodo di tempo considerato, in tutti gli allevamenti esaminati.

È interessante notare un aumento significativo della presenza di *P. reticulatum*, terza specie produttrice di YTXs.

## 4.2 PARAMETRI TOSSICOLOGICI

---

Le analisi tossicologiche sono state effettuate mediante il mouse test per valutare la presenza di tossine PSP nei mitili, mediante l'HPLC per le tossine ASP e mediante l'LC-MS per le tossine liposolubili.

I dati riportati sono disponibili all'indirizzo web: [www.algaeadria.org](http://www.algaeadria.org), una rete di monitoraggio per l'intero bacino dell'Adriatico, che raccoglie ed elabora, in maniera omogenea ed uniforme, informazioni circa la presenza in mare di biotossine.

Questa rete di monitoraggio è continuamente aggiornata dal CRM di Cesenatico, che pubblica i risultati delle analisi effettuate sui molluschi eduli della Regione Emilia Romagna destinati alla commercializzazione.

I risultati ottenuti tramite le analisi biotossicologiche confermano il trend atteso a seguito delle analisi fitoplanctoniche. Infatti, i mitili di tutti gli allevamenti considerati sono risultati tossici a causa dell'elevato contenuto di YTXs.

Invece, le tossine PSP e ASP, l'acido okadaico e derivati (OAs), le pectenotossine (PTXs), l'azaspiracido e derivati (AZAs), non hanno mai superato il limite di legge nel periodo di tempo esaminato.

Per questo motivo verranno riportati, di seguito, esclusivamente i dati relativi al contenuto di YTXs nei mitili, ottenuti mediante l'analisi chimica in LC-MS. Inoltre, data la disponibilità degli standard, è stato possibile determinare e quantificare la yessotossina (YTX), la homo-yessotossina (homo-YTX), la 45-idrossi-yessotossina (45-OH-YTX) e la 45-idrossi-homo-yessotossina (45-OH-homo-YTX).

I risultati hanno messo in evidenza che le tossine più abbondanti ritrovate nei tessuti dei mitili sono la homo-YTX e la 45-OH-homo-YTX.

### 4.1.1 Analisi biotossicologiche – Ravenna

In Tabella 13 sono riportati i risultati relativi alle analisi effettuate sui campioni di *Mytilus galloprovincialis*, pervenuti al CRM di Cesenatico dal mese di aprile al mese di novembre.

DATA	YTXs mg/kg p.e.		DATA	YTXs mg/kg p.e.
	DIGA NORD	DIGA SUD		LA FENICE
18/04/2012	<0,2	<0,2	16/04/2012	<0,2
10/05/2012	<0,2	<0,2	30/04/2012	<0,2
24/05/2012	<0,2	<0,2	23/05/2012	<0,2
07/06/2012	<0,2	<0,2	14/06/2012	<0,2
21/06/2012	<0,2	<0,2	27/06/2012	0,27
05/07/2012	<0,2	<0,2	11/07/2012	<0,2
19/07/2012	<0,2	<0,2	26/07/2012	<0,2
07/08/2012	<0,2	<0,2	14/08/2012	<0,2
22/08/2012	<0,2	<0,2	28/08/2012	<0,2
11/09/2012	0,74	0,61	18/09/2012	0,64
18/09/2012	0,62	1,31	03/10/2012	0,76
	01/10/2012	1,23		3,06
	22/10/2012	4,94		2,49
	19/11/2012	4,63		5,85

**Tabella 13** Risultati delle analisi biotossicologiche effettuate sui mitili provenienti dai banchi naturali “Diga Nord” e “Diga Sud” e dall’allevamento “La Fenice”, mediante analisi in LC-MS. Sono evidenziati in giallo i campioni che superano i limiti di legge.

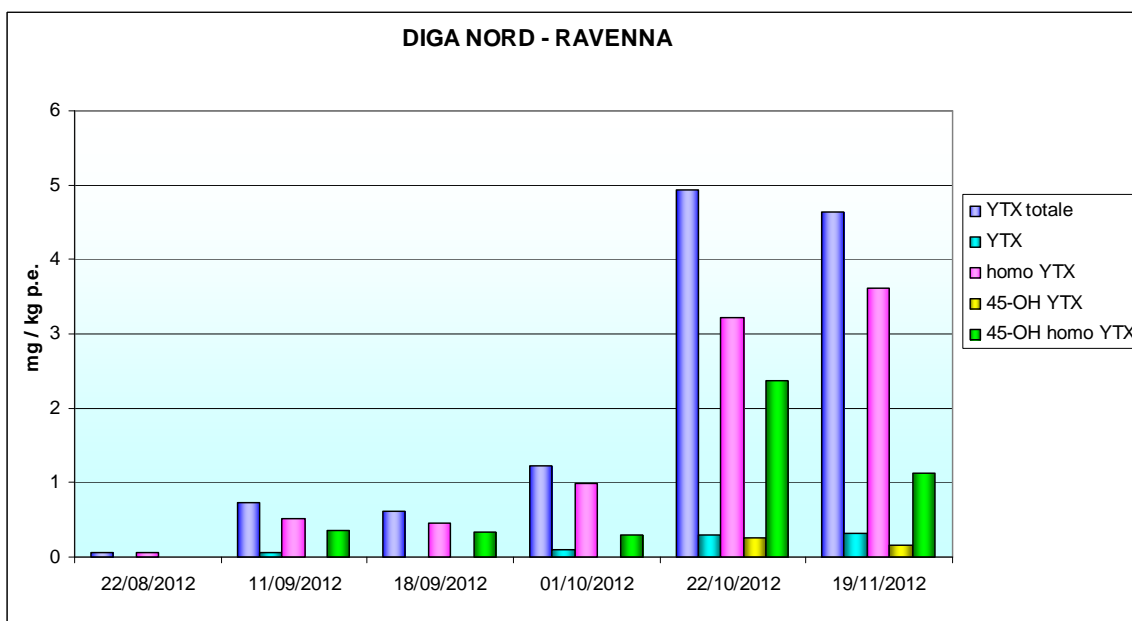
Dalla precedente tabella si può notare che in data 11 settembre, nei mitili provenienti dalle Dighe Foranee di Ravenna, comincia ad aumentare la concentrazione di YTXs. Tale concentrazione raggiunge valori superiori al limite di legge (1 mg di YTXs/kg p.e.) il 18 settembre in “Diga Sud”, mentre il primo ottobre in “Diga Nord” (Tab. 13)

Nel mese di novembre il contenuto di yessotossine nei mitili è risultato quasi sei volte superiore al limite, mostrando un trend in aumento. In particolare, in “Diga Sud” la YTXs raggiunge il valore 5,85 mg di YTXs/kg p.e., valore massimo rilevato, fino a questo momento, nei mitili della costa emiliano-romagnola.

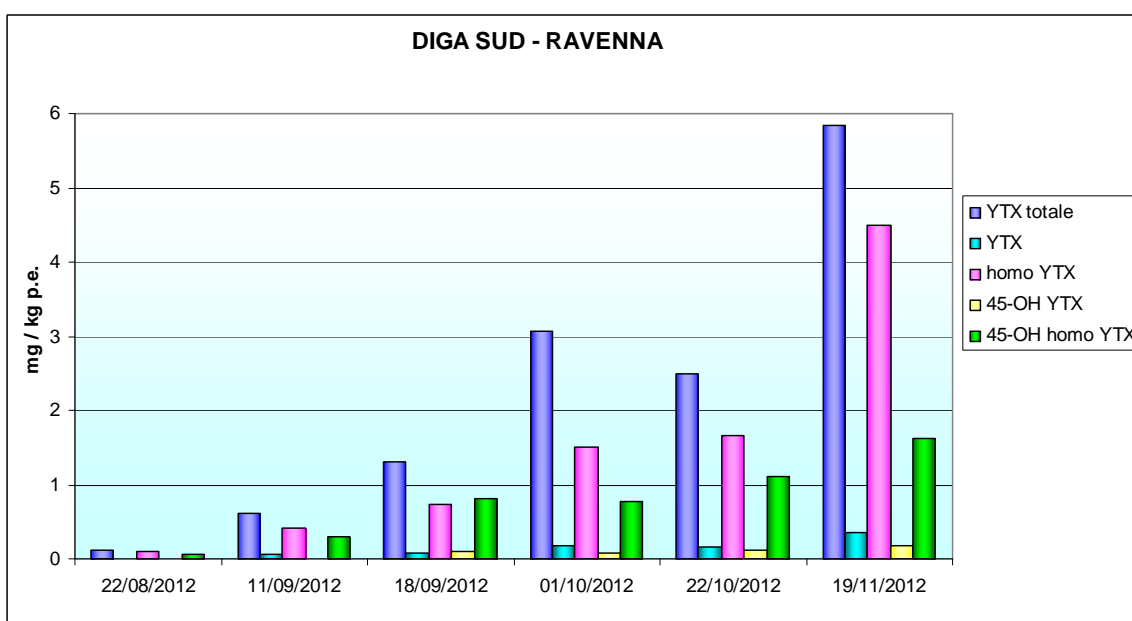
Per quanto riguarda l’allevamento “La Fenice”, risulta attualmente chiuso in quanto ha deciso di autosospendere la vendita del prodotto per mancanza di materiale. Al momento non sono stati effettuati autocontrolli per verificare un eventuale aumento della tossicità in questa area. Data la presenza di YTXs in tutti gli allevamenti circostanti, possiamo tuttavia ipotizzare, con ragionevole certezza, che anche questo impianto sia caratterizzato da valori superiori al limite di legge.

I dati fin qui riportati si riferiscono al contenuto di yessotossine totali.

Di seguito vengono invece rappresentate le concentrazioni dei diversi analoghi, dal mese di agosto al mese di novembre, periodo durante il quale le YTXs sono comparse per la prima volta nei tessuti dei mitili, per l’anno 2012.



**Figura 29** Quantificazione di YTXs e derivati mediante LC-MS nei campioni di “Diga Nord”.



**Figura 30** Quantificazione di YTXs e derivati mediante LC-MS nei campioni di “Diga Sud”.

Dalle analisi in LC-MS risulta che la tossina più abbondante, rilevata nei mitili delle dighe foranee di Ravenna, è la homo-YTX, seguita dalla 45-OH-homo-YTX (Fig. 29 e 30).



#### 4.1.2 Analisi biotossicologiche - Cesenatico

Anche i campioni provenienti dagli allevamenti al largo di Cesenatico, sono risultati positivi alle analisi per la rilevazione delle yessotossine (Tab. 14).

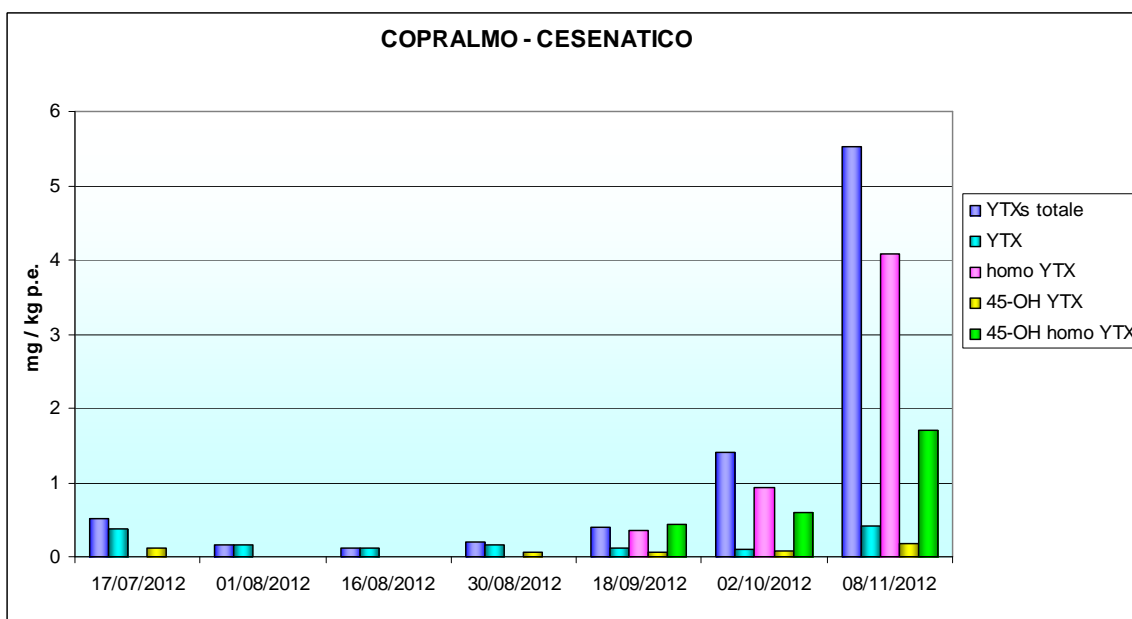
DATA	YTXs mg/kg p.e.		
	PRO. MO. ITTICA	COPRALMO	ALTAMAREA
03/04/2012	<0,2	<0,2	<0,2
23/04/2012	<0,2	<0,2	<0,2
09/05/2012	<0,2	<0,2	<0,2
24/05/2012	<0,2	<0,2	<0,2
06/06/2012	<0,2	<0,2	<0,2
21/06/2012	<b>0,21</b>	<0,2	<0,2
04/07/2012	<0,2	<0,2	<0,2
17/07/2012	<0,2	<b>0,51</b>	<b>0,34</b>
01/08/2012	<0,2	<0,2	<0,2
16/08/2012	<b>0,31</b>	<0,2	<0,2
30/08/2012	<b>0,56</b>	<b>0,21</b>	<0,2
18/09/2012	n.p.	<b>0,40</b>	<b>1,40</b>
02/10/2012	n.p.	<b>1,41</b>	<b>1,97</b>
18/10/2012	n.p.	n.p.	<b>1,47</b>
08/11/2012	n.p.	<b>5,52</b>	<b>3,1</b>

**Tabella 14** Risultati delle analisi biotossicologiche effettuate sui mitili degli allevamenti “Alta Marea”, “Coprpalmo”, e “Pro. Mo. Ittica”, mediante analisi in LC-MS. Sono evidenziati in giallo i campioni che superano i limiti di legge. n.p.= campione non pervenuto.

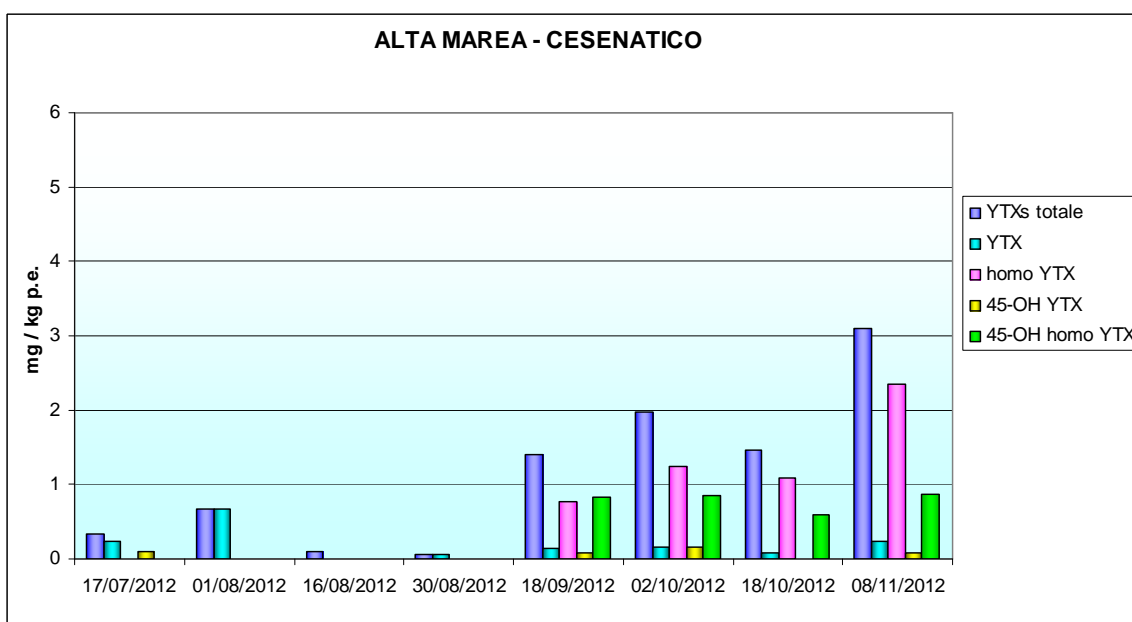
I mitili provenienti dagli allevamenti “Coprpalmo” e “Alta Marea” sono risultati tossici per YTXs, rispettivamente il 2 ottobre e il 18 settembre, mentre l’allevamento “Pro. Mo. Ittica” è attualmente chiuso in quanto ha deciso di autosospendere la vendita del prodotto per mancanza di materiale. In ogni caso, dagli autocontrolli effettuati successivamente dagli stessi mitilicoltori, viene confermata la presenza di livelli di YTXs superiori ai limiti di legge anche in questa area.

In data 8 novembre, gli allevamenti a largo di Cesenatico raggiungono una concentrazione davvero notevole di YTXs (5.52 mg/kg p.e.). Tale andamento della tossicità è analogo a quello riscontrato al largo di Ravenna (Tab. 13).

L’analogo che maggiormente contribuisce alle yessotossine totali è, anche in questo caso, la homo-YTX (Figg. 31 e 32).



**Figura 31** Quantificazione di YTXs e derivati mediante LC-MS nei campioni di “Coprpalmo”.



**Figura 32** Quantificazione di YTXs e derivati mediante LC-MS nei campioni di “Alta Marea”.

Nell’allevamento “Coprpalmo”, in particolare, la homo-YTX raggiunge valori considerevoli (4,08 mg/kg p.e.) nel mese di novembre (Fig. 31).

Nelle precedenti figure è interessante notare che, dal 17 luglio al 30 agosto le YTXs sono costituite, quasi esclusivamente da YTX.

### 4.1.3 Analisi biotossicologiche - Rimini

Di seguito sono riportati i risultati delle analisi biotossicologiche effettuate sui campioni di *Mytilus galloprovincialis* prelevati dall'AUSL di Rimini. Anche in questo caso i mitili sono risultati tossici a causa della presenza di yessotossine (Tab. 15 a 17).

DATA	YTXs mg/kg p.e.	
	MITILCOOP	MARINARA
04/04/2012	<0,2	<0,2
19/04/2012	<0,2	<0,2
04/05/2012	<0,2	<0,2
22/05/2012	<0,2	<0,2
14/06/2012	<0,2	<0,2
25/06/2012	<0,2	<0,2
02/07/2012	<0,2	<0,2
19/07/2012	<b>0,25</b>	<0,2
06/08/2012	<0,2	<0,2
21/08/2012	<0,2	<b>0,27</b>
12/09/2012	<b>0,26</b>	<0,2
25/09/2012	<b>1,09</b>	<b>1,57</b>
11/10/2012	<b>3,09</b>	<b>1,89</b>

**Tabella 15** Risultati delle analisi biotossicologiche effettuate sui mitili degli allevamenti "Mitilcoop" e "Marinara" (Bellaria), mediante analisi in LC-MS. Sono evidenziati in giallo i campioni che superano i limiti di legge.

DATA	YTXs mg/kg p.e.	
	ACQUA DI MARE	ADRIA MAR
04/04/2012	<0,2	<0,2
19/04/2012	<0,2	<0,2
04/05/2012	<0,2	<0,2
22/05/2012	<0,2	n.p.
24/05/2012	n.p.	<0,2
14/06/2012	<0,2	<0,2
25/06/2012	<b>0,35</b>	<0,2
05/07/2012	n.p.	<b>0,44</b>
09/07/2012	<b>0,3</b>	n.p.
19/07/2012	<b>0,56</b>	<0,2
06/08/2012	<b>0,42</b>	<b>0,44</b>
21/08/2012	<b>0,26</b>	<0,2
12/09/2012	<b>0,2</b>	<0,2
25/09/2012	<b>1,25</b>	<b>0,97</b>
11/10/2012	<b>1,36</b>	<b>1,32</b>

**Tabella 16** Risultati delle analisi biotossicologiche effettuate sui mitili degli allevamenti "Acqua di mare" e "Adria Mar" (Rimini), mediante analisi in LC-MS. Sono evidenziati in giallo i campioni che superano i limiti di legge. n.p.= campione non pervenuto.

DATA	YTXs mg/kg p.e.	
	SVILUPPO MARITTIMO	ASS. PROD. PESCA
04/04/2012	<0,2	<0,2
19/04/2012	<0,2	<0,2
04/05/2012	<0,2	<0,2
22/05/2012	<0,2	<0,2
14/06/2012	<0,2	<0,2
25/06/2012	<0,2	<0,2
09/07/2012	<0,2	<0,2
19/07/2012	<0,2	<0,2
06/08/2012	<0,2	<0,2
21/08/2012	<0,2	<0,2
12/09/2012	0,24	<0,2
25/09/2012	<b>1,26</b>	<b>1,13</b>
11/10/2012	<b>1,71</b>	<b>3,69</b>

**Tabella 17** Risultati delle analisi biotossicologiche effettuate sui mitili degli allevamenti “Sviluppo Marittimo” e “Associazione Produttori Pesca” (Cattolica), mediante analisi in LC-MS.

Sono evidenziati in giallo i campioni che superano i limiti di legge.

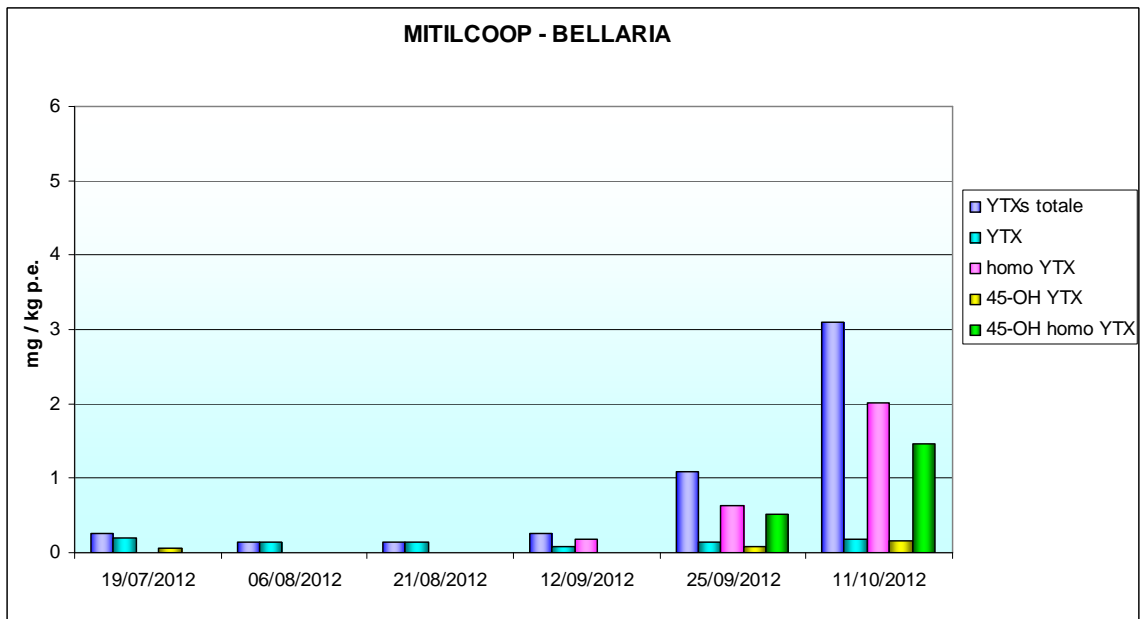
Come si evince dai dati riportati nelle precedenti tabelle, tutti i campioni analizzati sono risultati positivi alle YTXs, a partire dal 25 settembre 2012.

In realtà, l'allevamento “Adria Mar” supera il limite di legge in data 11 ottobre; tuttavia le analisi in LC-MS del 25 settembre rilevano un valore di YTXs molto prossimo al limite (0,97 mg/kg p.e.) (Tab. 16).

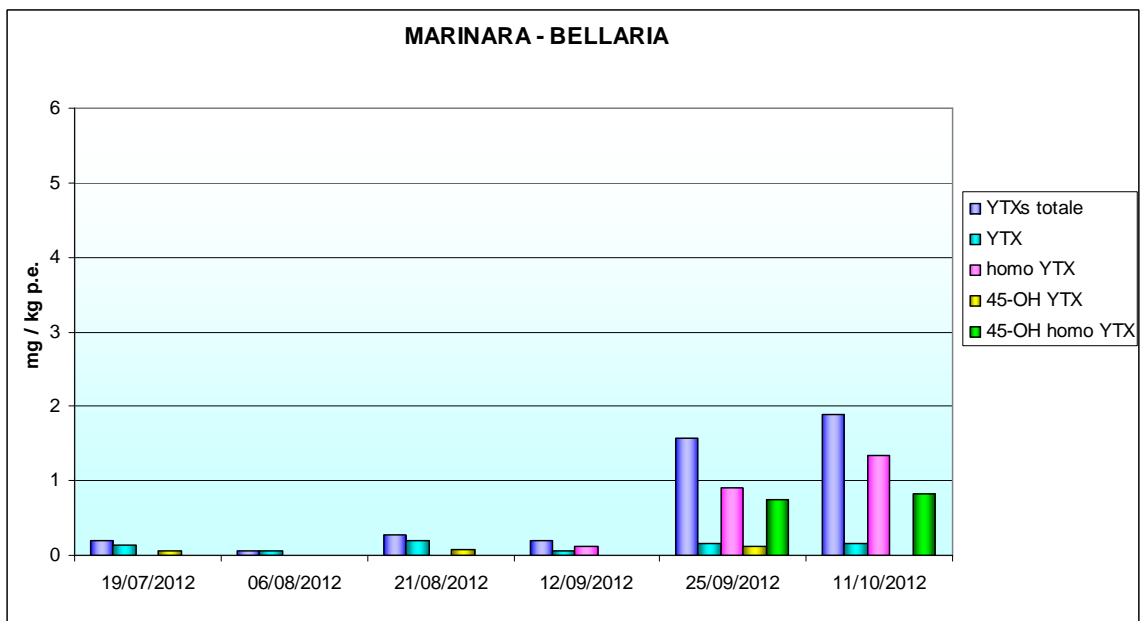
La quantificazione in LC-MS dei diversi analoghi delle YTXs rivela, anche nel tessuto dei mitili raccolti negli allevamenti situati tra Bellaria e Cattolica, la prevalenza della homo-yessotossina (Figg. 33 a 38).

Bisogna evidenziare che, nel periodo compreso tra luglio ed agosto viene rilevata prevalentemente YTX nel tessuto dei mitili, mentre a partire dal mese di settembre, la homo-YTX diventa predominante.

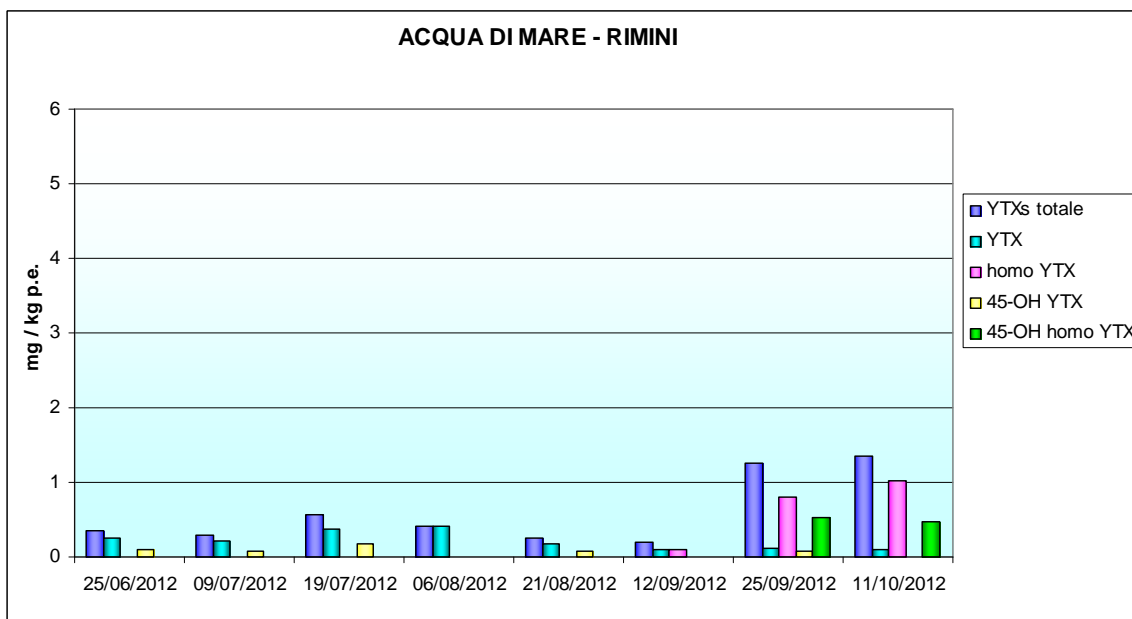
Tale andamento è analogo a quello riscontrato negli allevamenti di Cesenatico.



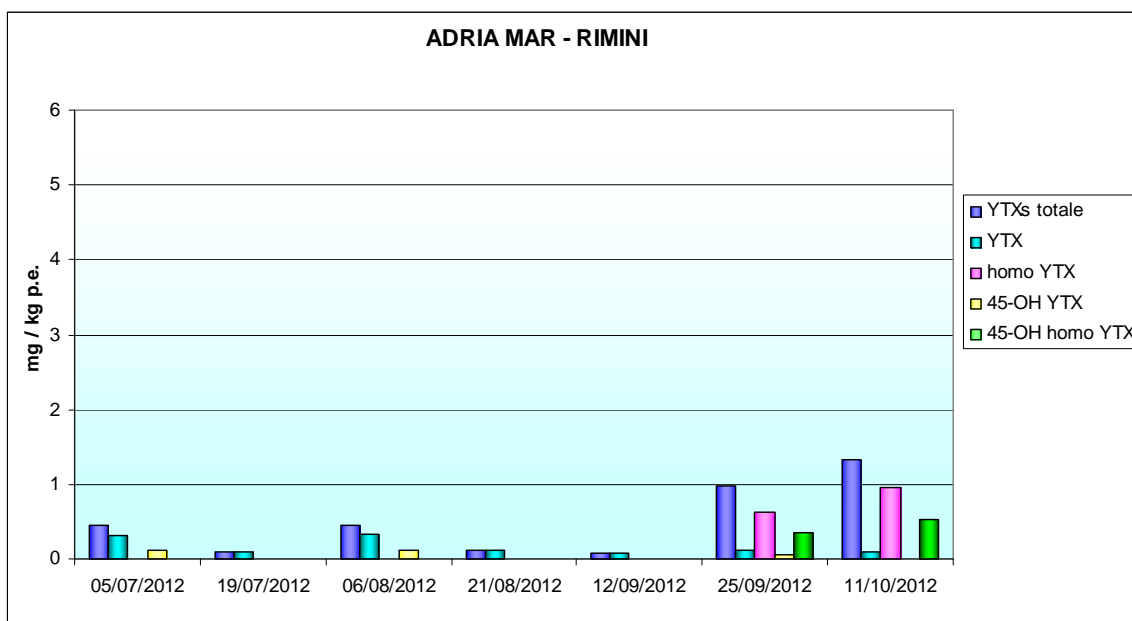
**Figura 33** Quantificazione di YTXs e derivati mediante LC-MS nei campioni di “Mitalcoop”.



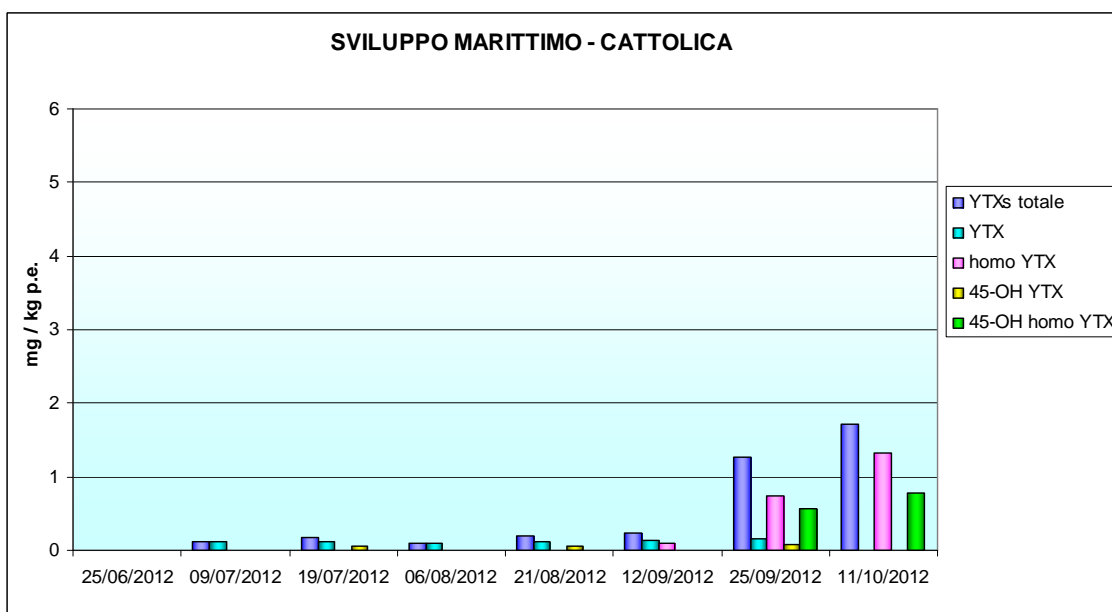
**Figura 34** Quantificazione di YTXs e derivati mediante LC-MS nei campioni di “Marinara”.



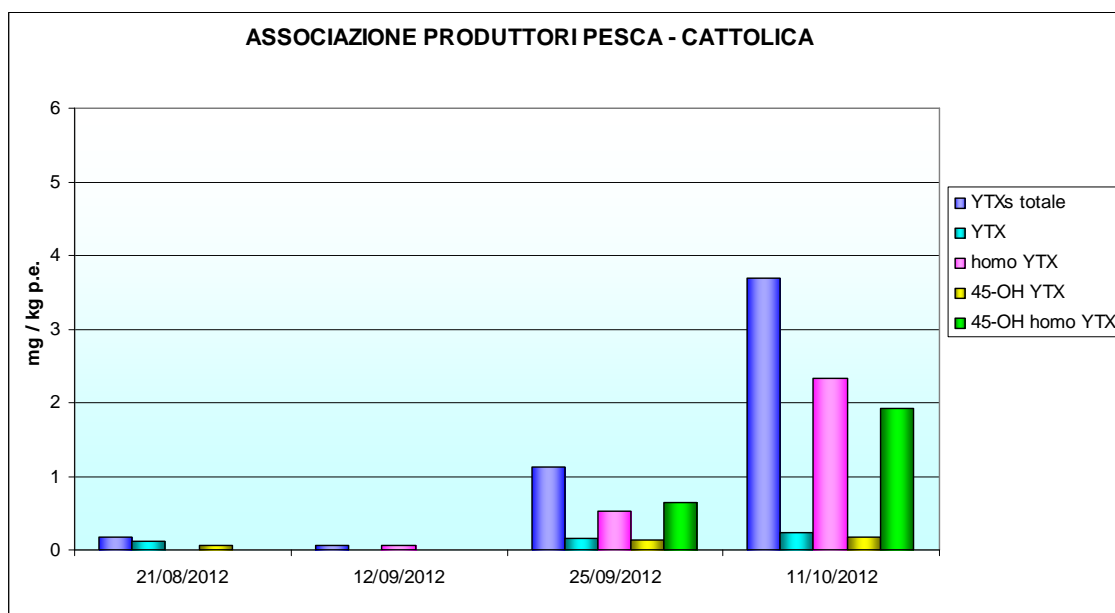
**Figura 35** Quantificazione di YTXs e derivati mediante LC-MS nei campioni di “Acqua di Mare”.



**Figura 36** Quantificazione di YTXs e derivati mediante LC-MS nei campioni di “Adria Mar”.



**Figura 37** Quantificazione di YTXs e derivati mediante LC-MS nei campioni di “Sviluppo Marittimo”.



**Figura 38** Quantificazione di YTXs e derivati mediante LC-MS nei campioni di “Associazione Produttori Pesca”.

In generale è possibile notare che i valori di YTXs, e di conseguenza dei diversi analoghi, sono inferiori rispetto a quelli registrati nei campioni di Ravenna e di Cesenatico. Anche in questo caso, vi è una prevalenza di YTX fino al 12 settembre, dopodiché comincia ad aumentare al homo-YTX.

## 4.3 SPECIE ALGALI RESPONSABILI DELLA TOSSICITÀ DEI MITILI

### 4.3.1 Alghe produttrici di YTXs

Le alghe responsabili della produzione di YTXs appartengono alle specie *Gonyaulax spinifera*, *Lingulodinium polyedrum* e *Protoceratium reticulatum* (sinonimo di *Gonyaulax grindeyi*).

#### ***Gonyaulax spinifera* (Claparède et Lachmann) Diesing 1886**

##### **Descrizione**

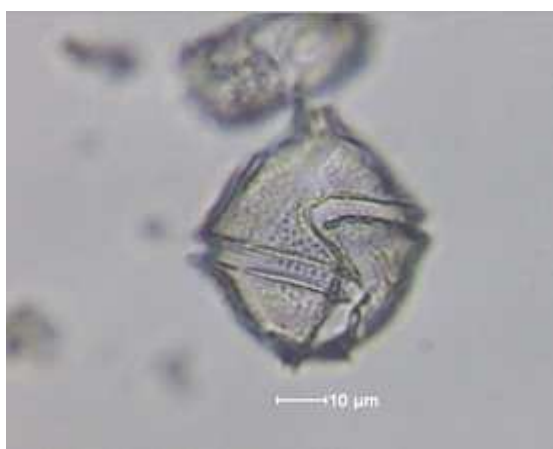
Cellula da piccola a medio-piccola. Epiteca a lati convessi angolati con corno apicale, ipoteca con due piccole spine (talvolta assenti). Cingolo profondo e nettamente sfalsato. Lunghezza 24-50µm, larghezza 30-40µm. Forma cisti.

##### **Distribuzione**

Specie marina, planctonica, bioluminescente. Compare prevalentemente a fine estate e inizio autunno. Lungo la costa emiliano-romagnola ha causato maree colorate (acque di color marrone-ruggine) con concentrazioni di diversi milioni di cell/L.

##### **Tossicità**

Solo recentemente è stata scoperta la sua capacità di produrre tossine liposolubili (yessotossine) che potrebbero essere causa del divieto di raccolta e commercializzazione dei mitili in allevamento nel Nord Adriatico.



**Teca;** è ben evidente il solco nettamente sfalsato; barra: 10µm.



**Cisti;** barra 10 µm.

**Figura 39** Scheda di *G. spinifera*, (Microalghe tossiche del Medio ed Alto Adriatico, Pompei *et al.*, 2005).



## *Lingulodinium polyedrum* (Stein) Dodge 1989

### Descrizione

Cellule di forma poliedrica con placche tecali spesse, ben definite e grossolanamente areolate, con pori nelle depressioni, lunghezza 40-54 $\mu$ m, larghezza 37-53 $\mu$ m. Cloroplasti arancione scuro-marroni. Specie bioluminescente. Origina cisti caratteristiche, denominate: *Lingulodinium machaerophorum* (Deflandre et Cookson) Wall 1967; *Hystrichosphaeridium machaerophorum* Deflandre et Cookson 1955, incolori, sferiche (diametro 35-50 $\mu$ m), con spine che possono superare i 17 $\mu$ m di lunghezza e presentano spinule nella parte distale. Le cisti sono in grado di fossilizzare.

### Distribuzione

Specie marina, planctonica, bioluminescente. Compare prevalentemente dalla tarda primavera all'autunno, con picchi estivi. Lungo la costa emiliano-romagnola ha causato maree colorate di color marrone-ruggine per circa un decennio (1976-1985), raggiungendo anche concentrazioni di  $15 \times 10^6$  cell/L con conseguenti fenomeni di anossia e moria di organismi bentonici. Dal 1997 è stata riconosciuta la sua capacità di produrre tossine liposolubili, la sua presenza è quindi causa del divieto di raccolta e commercializzazione dei mitili.

### Tossicità

Specie potenzialmente produttrice di yessotossine (tossine liposolubili, storicamente incluse nel gruppo delle DSP).



Cellula a fresco; barra: 10 $\mu$ m.



Cisti; barra: 10 $\mu$ m.

**Figura 40** Scheda di *L. polyedrum*, (Microalghe tossiche del Medio ed Alto Adriatico, Pompei *et al.*, 2005).

***Gonyaulax grindleyi* Reinecke 1967**

**Sinonimo** *Protoceratium reticulatum*

**Descrizione**

Cellule da piccole a medio-piccole, di forma poliedrica; placche marcatamente reticolate. Epiteca ad ampio cono con i lati più o meno dritti, più corta dell'ipoteca. L'ipoteca presenta margini da dritti a convessi con antapice di forma arrotondata o squadrata, senza spine. Cingolo profondo, leggermente sfalsato. Lunghezza 28-43µm, larghezza 25-35µm. Forma cisti caratteristiche, sferiche dotate di una fitta corona di sottili spine dalle punte uncinata. Specie bioluminescente.

**Distribuzione**

E' poco abbondante, presente dalla primavera all'autunno inoltrato.

**Tossicità**

Produce yessotossine, liposolubili, storicamente incluse nel gruppo DSP.



**Cellula a fresco;** barra: 10µm.

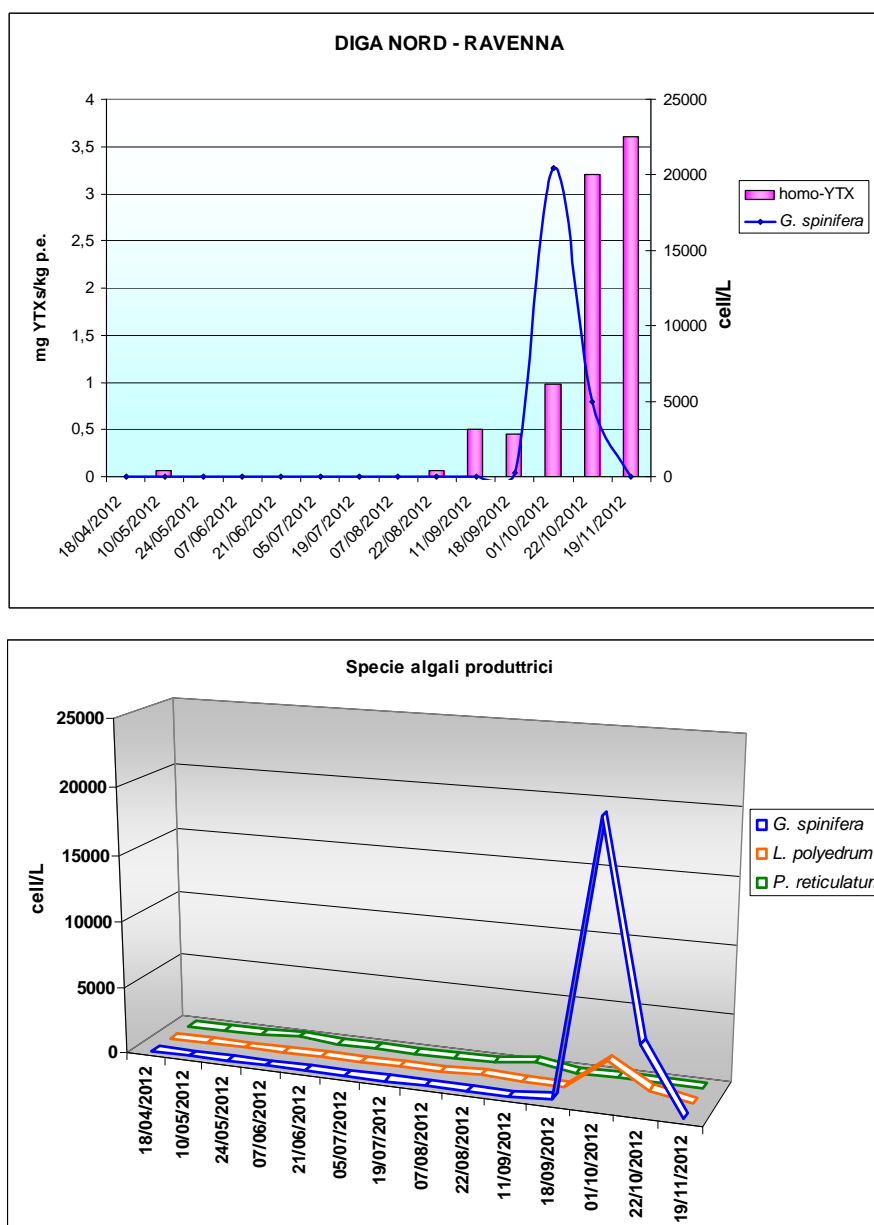


**Cisti;** barra: 10µm.

**Figura 41** Scheda di *P. reticulatum* (sinonimo di *G. grindleyi*), (Microalghe tossiche del Medio ed Alto Adriatico, Pompei *et al.*, 2005).

### 4.3.2 Correlazioni tra andamento delle alghe e andamento della tossicità

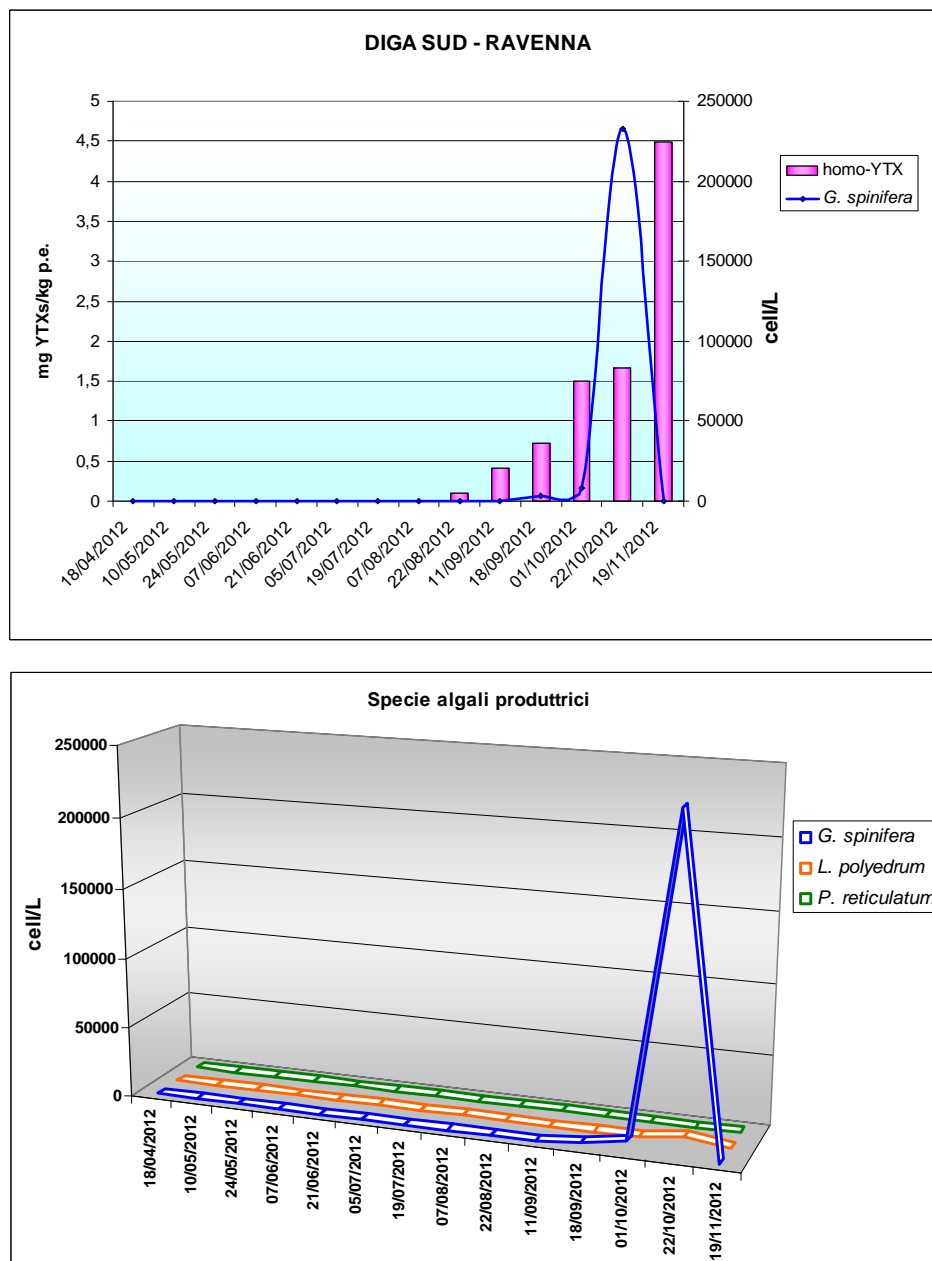
È significativo vedere come sono variate, nel tempo e nello spazio, le concentrazioni algali di *G. spinifera*, *L. polyedrum* e *P. reticulatum*, rispetto alle concentrazioni di YTXs.



**Figura 42** In alto: correlazione tra andamento di *G. spinifera* e homo-YTX rilevata nel tessuto dei mitili; in basso: abbondanza relativa delle tre specie di interesse (“Diga Nord” – Ravenna).

In “Diga Nord” (Fig. 42), la massima abbondanza del dinoflagellato *G. spinifera* (20.440 cell/L), precede immediatamente, in ordine temporale, la concentrazione massima di homo-YTX (3,609 mg/kg p.e.). Le correlazioni effettuate confermano, quindi, che tale specie algale produce homo-YTX, come tossina principale (Riccardi *et al.*, 2009).

L'elevata tossicità rilevata nei mitili di questo sito è favorita anche dalla contemporanea presenza di *L. polyedrum* (2.320 cell/L), ritenuta una specie produttrice di homo-YTX (Tubaro *et al.*, 1998).

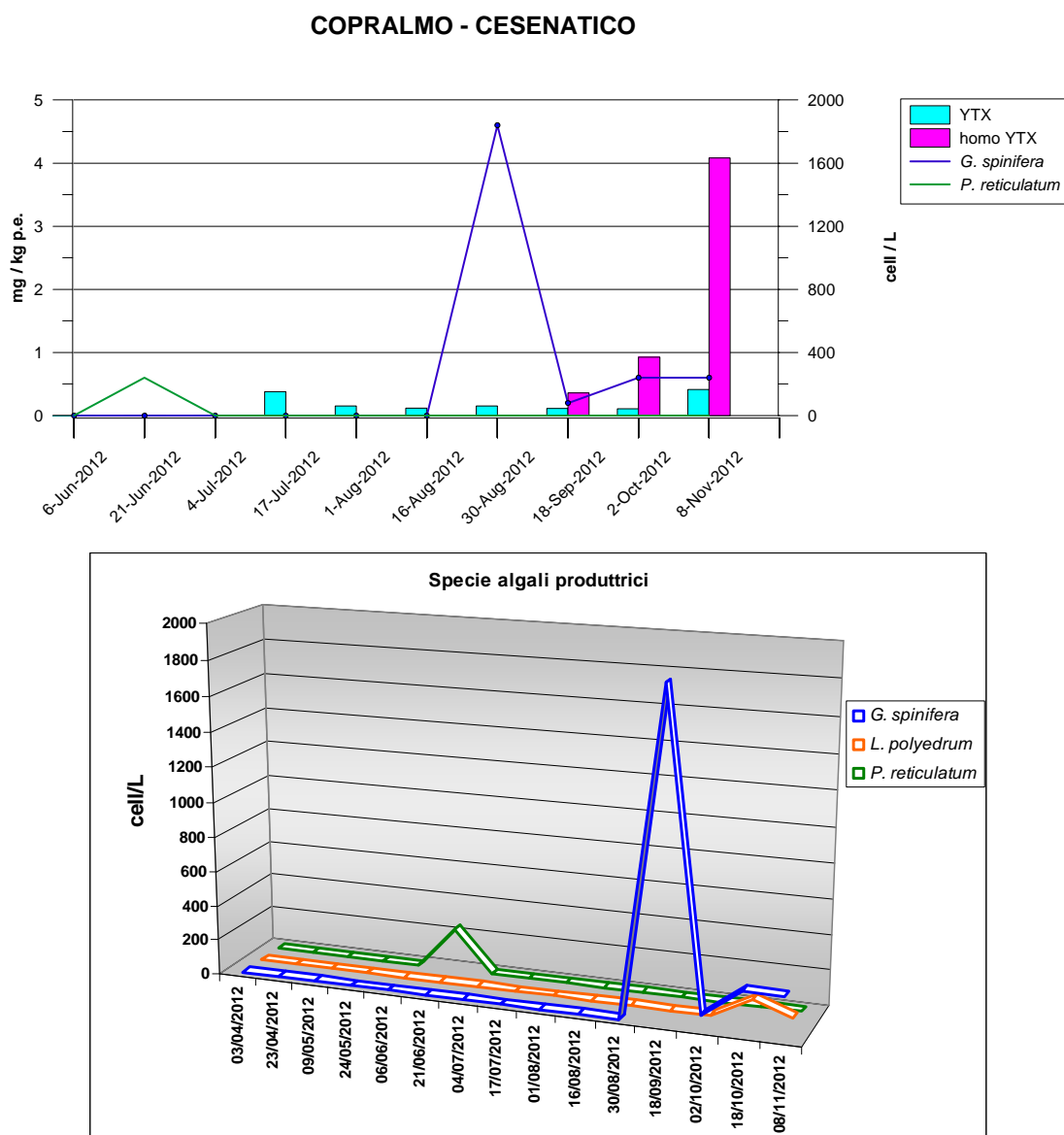


**Figura 43** In alto: correlazione tra andamento di *G. spinifera* e homo-YTX rilevata nel tessuto dei mitili; in basso: abbondanza relativa delle tre specie di interesse (“Diga Sud” – Ravenna).

Lo stesso andamento caratteristico della “Diga Nord” viene rilevato in “Diga Sud” (Fig. 43). Nel mese di ottobre, le concentrazioni di *G. spinifera* in questo sito, raggiungono valori ancor più elevati (233.030 cell/L). Tale aumento in abbondanza si riflette sull’aumento della tossicità dovuta a homo-YTX che, da sola, raggiunge un valore di 4,487 mg/kg p.e., su un valore di yessotossine totali di 5,85 mg/kg p.e..

Anche in questo caso, le elevate concentrazioni di tossina sono influenzate dalla contemporanea presenza di 4.240 cell/L di *L. polyedrum*.

Le concentrazioni di *P. reticulatum* sono troppo esigue per influenzare, in modo significativo, l'andamento della tossicità rilevata nel tessuto dei mitili di quest'area.



**Figura 44** In alto: correlazione tra andamento di *G. spinifera* con homo-YTX e di *P. reticulatum* con YTX; in basso: abbondanza relativa delle tre specie di interesse (“Copralmo” – Cesenatico).

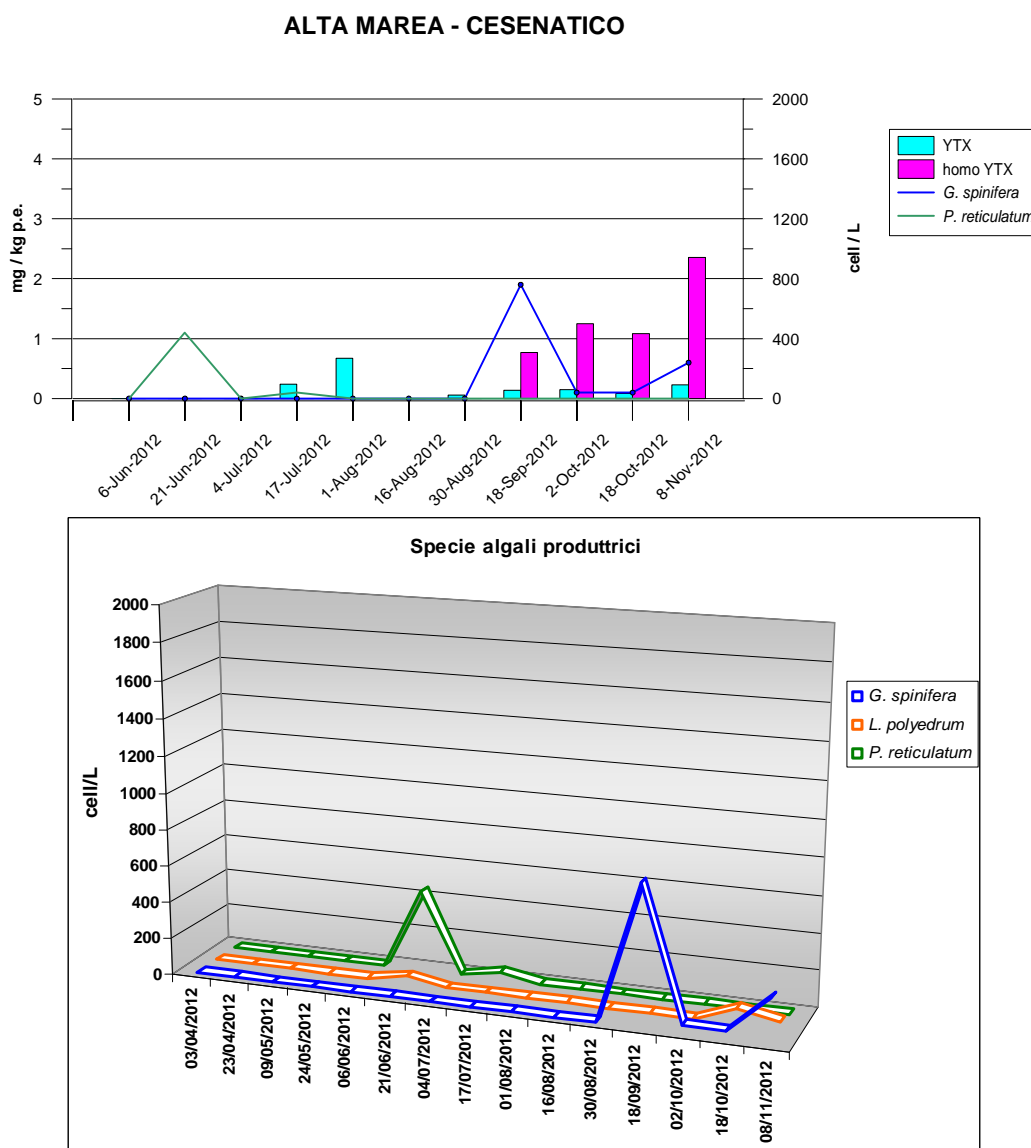
Anche all'interno dei siti posizionati al largo di Cesenatico è possibile notare una stretta correlazione tra andamento di *G. spinifera* e andamento di homo-YTX (Fig. 44).

In questo caso è stato possibile effettuare, inoltre, la correlazione tra *P. reticulatum* e YTX. Quest'ultima, è risultata la tossina prevalente nei campioni analizzati tra giugno, luglio ed agosto (Fig. 31), dunque prima della comparsa di *G. spinifera* lungo la costa emiliano-romagnola.

Dall'analisi del fitoplancton è emerso che, il 21 giugno era presente *P. reticulatum*, a concentrazioni apprezzabili (240 cell/L). Tale dato conferma che questa specie algale produce principalmente YTX (Ciminiello *et al.*, 2003).

Le indagini effettuate nel sito “Alta Marea” evidenziano un andamento del tutto analogo a quello riscontrato nel sito “Coprpalmo”, con la specie *P. reticulatum* che precede la comparsa di YTX e la specie *G. spinifera* che precede la rilevazione di homo-YTX nei mitili (Fig. 45). Il motivo di tale analogia è facilmente intuibile se si considera la vicinanza dei due allevamenti (Fig. 20).

Inoltre, possiamo notare che la tossicità dovuta a YTXs si manifesta prima nel sito “Alta Marea” e poi nel sito “Coprpalmo” (Tab. 14). Possiamo ipotizzare, dunque, che *G. spinifera* si sia avvicinata alla costa per effetto dei flussi di marea e di corrente.



**Figura 45** In alto: correlazione tra andamento di *G. spinifera* con homo-YTX e di *P. reticulatum* con YTX; in basso: abbondanza relativa delle tre specie di interesse (“Alta Marea” – Cesenatico).

Osservando i dati relativi alle concentrazioni di *Gonyaulax spinifera* (Tab. da 7 a 12) nei campioni prelevati presso gli allevamenti dell'area antistante Bellaria, Rimini e Cattolica, risulta che questa specie è scarsamente presente tanto da non giustificare le alte concentrazioni di homo-YTX riscontrata nei mitili di queste zone (Figg. Da 33 a 38). Questo ci ha indotto ad integrare questi risultati con quelli ottenuti nei campioni prelevati durante l'attività di monitoraggio della Struttura Oceanografica Daphne (Tab. 18).

18 settembre			
	<i>G. spinifera</i> cell/L	<i>L. polyedrum</i> cell/L	<i>P. reticulatum</i> cell/L
<b>RIMINI</b>			
0,5 km dalla costa	1760	0	0
3 km dalla costa	1760	80	0
<b>CATTOLICA</b>			
0,5 km dalla costa	1120	0	0
3 km dalla costa	31528	80	0
2 ottobre			
	<i>G. spinifera</i> cell/L	<i>L. polyedrum</i> cell/L	<i>P. reticulatum</i> cell/L
<b>RIMINI</b>			
0,5 km dalla costa	560	0	0
3 km dalla costa	800	0	0
<b>CATTOLICA</b>			
0,5 km dalla costa	31528	0	0
3 km dalla costa	1600	0	0

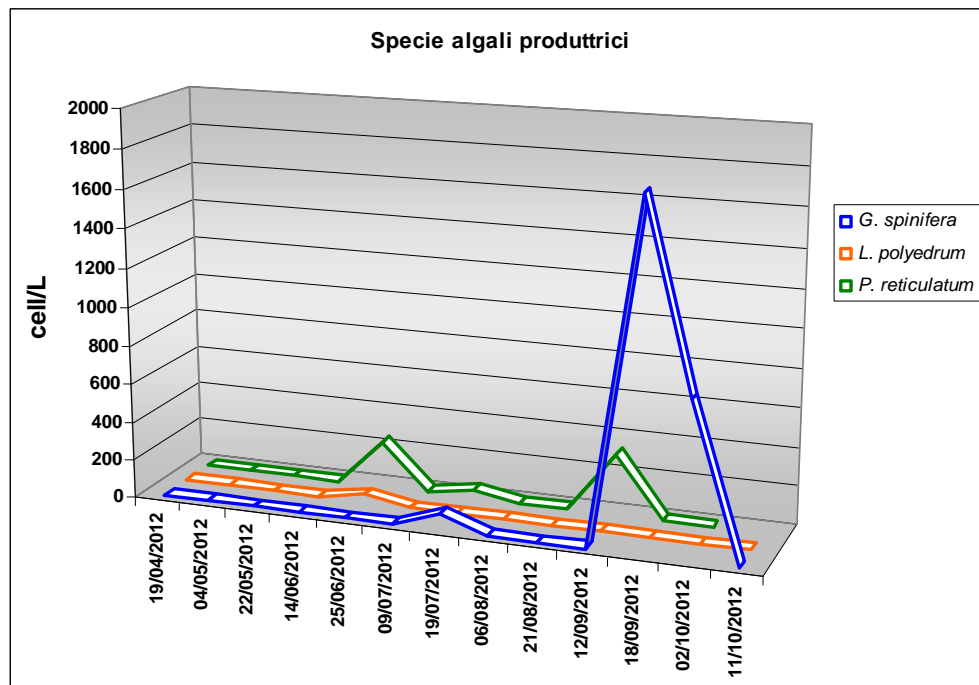
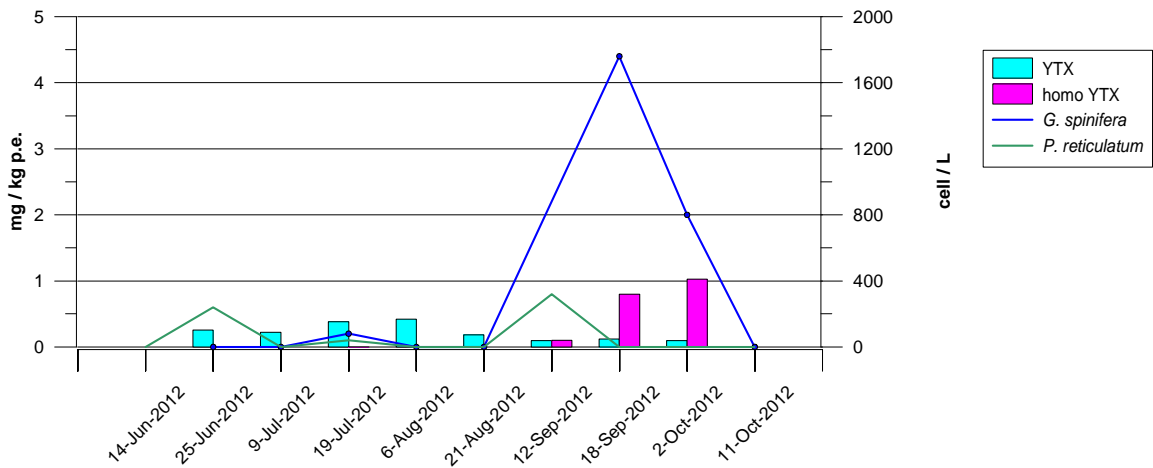
**Tabella 18** Analisi del fitoplancton relativa alle stazioni di Rimini e Cattolica, sia a 0,5 km che a 3 km dalla costa (Mn Daphne).

I dati riportati nella precedente tabella, mettono in evidenza la presenza di *G. spinifera*, a concentrazioni piuttosto elevate, sia nella stazione di Rimini che in quella di Cattolica (a 0,5 km che a 3 km dalla costa).

Ai fini della nostra ricerca, sono stati scelti i dati del monitoraggio a 3 km dalla costa, in quanto giudicati rappresentativi degli allevamenti. Non disponiamo, tuttavia, dei dati relativi alla fascia di mare antistante Bellaria, in quanto il monitoraggio Daphne, in tale stazione, viene effettuato solo a 0,5 km dalla costa.

L'integrazione di questi dati con quelli ottenuti presso gli impianti di molluschicoltura, mostra come, in realtà, la specie *G. spinifera* sia responsabile, anche in quest'area, della tossicità dovuta a homo-YTX, rilevata nei mitili (Figg. 46 e 47).

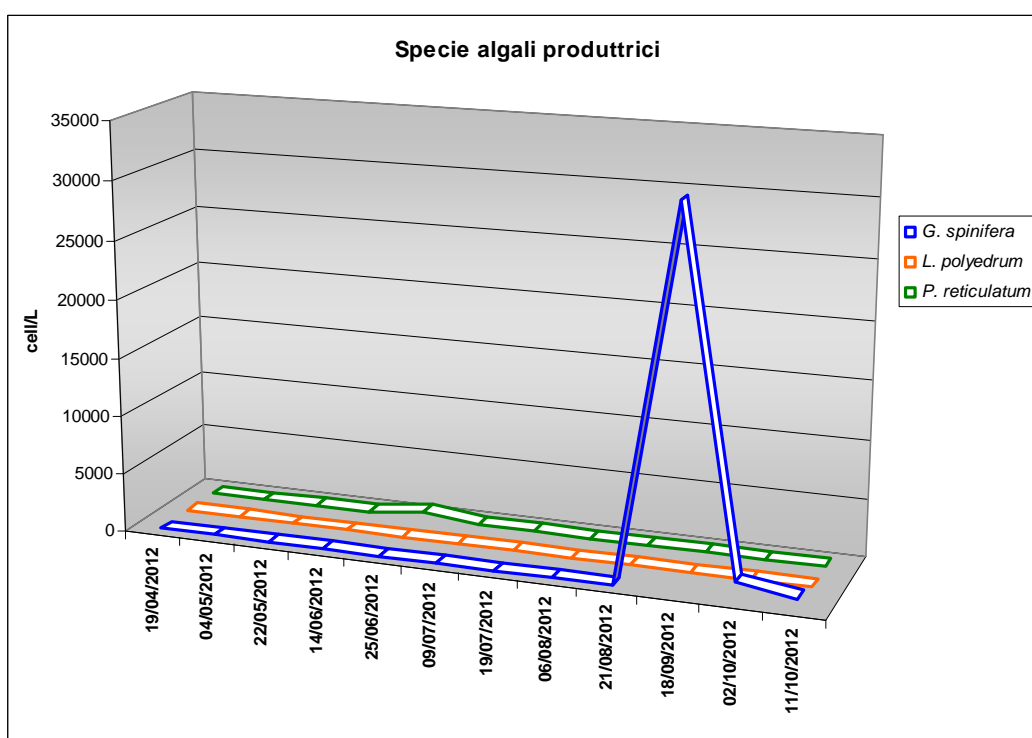
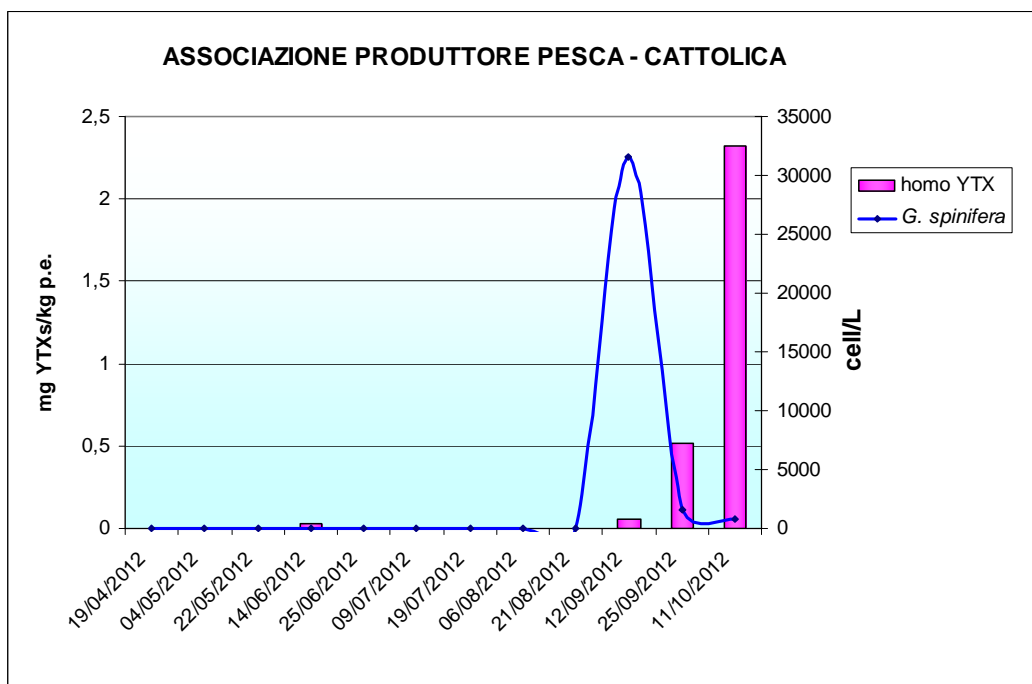
### ACQUA DI MARE - RIMINI



**Figura 46** In alto: correlazione tra andamento di *G. spinifera* e homo-YTX rilevata nel tessuto dei mitili; in basso: abbondanza relativa delle tre specie di interesse (“Acqua di Mare – Rimini”).

Inoltre, anche al largo di Rimini, la presenza di *P. reticulatum* è correlata alla rilevazione di YTX nei mitili, a conferma che tale specie sia responsabile della produzione di YTX, come tossina principale (Ciminiello et al., 2003).





**Figura 47** In alto: correlazione tra andamento di *G. spinifera* e homo-YTX rilevata nel tessuto dei mitili; in basso: abbondanza relativa delle tre specie di interesse (“Associazione Produttori Pesca - Cattolica”).

Integrando ed elaborando i dati fin qui acquisiti, relativi alle concentrazioni di fitoplancton lungo la costa dell’Emilia Romagna, abbiamo ottenuto la distribuzione spaziale e temporale delle specie produttrici di YTXs (Figg. da 48 a 50)

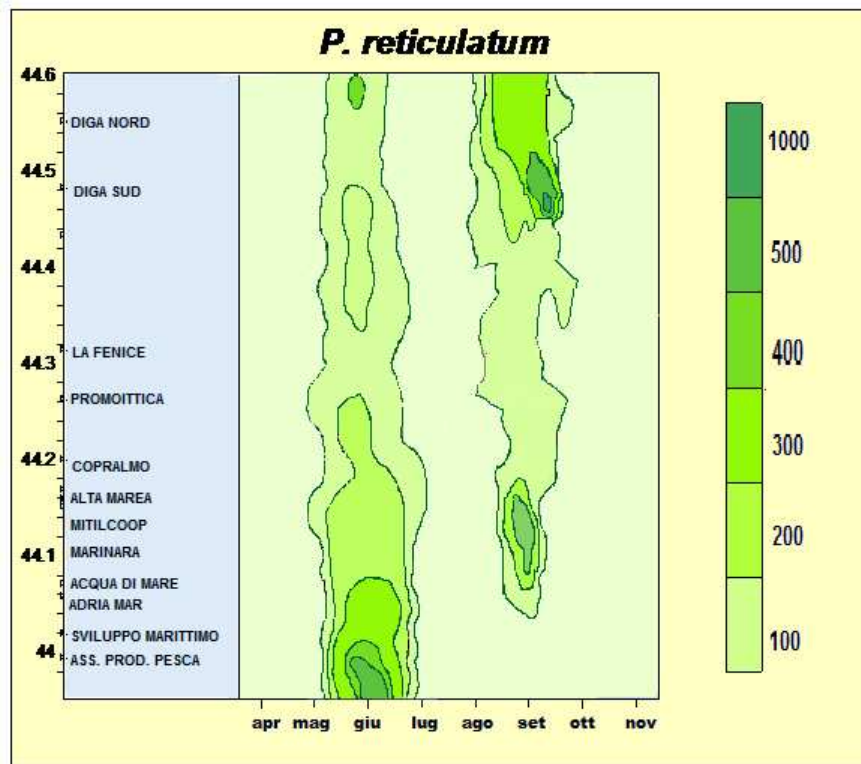


Figura 48 Distribuzione delle concentrazioni di *P. reticulatum* lungo la costa emiliano romagnola.

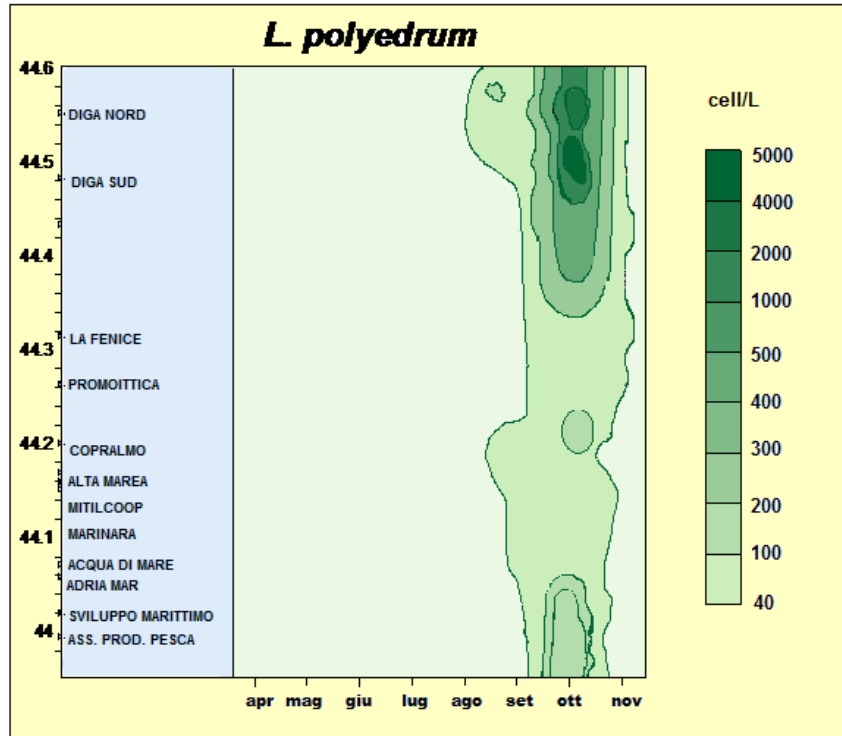
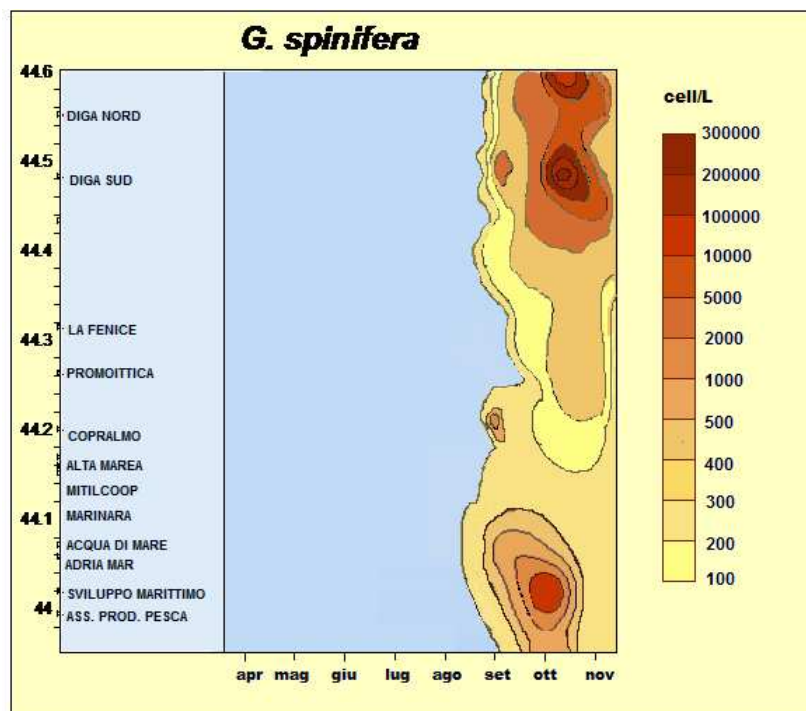
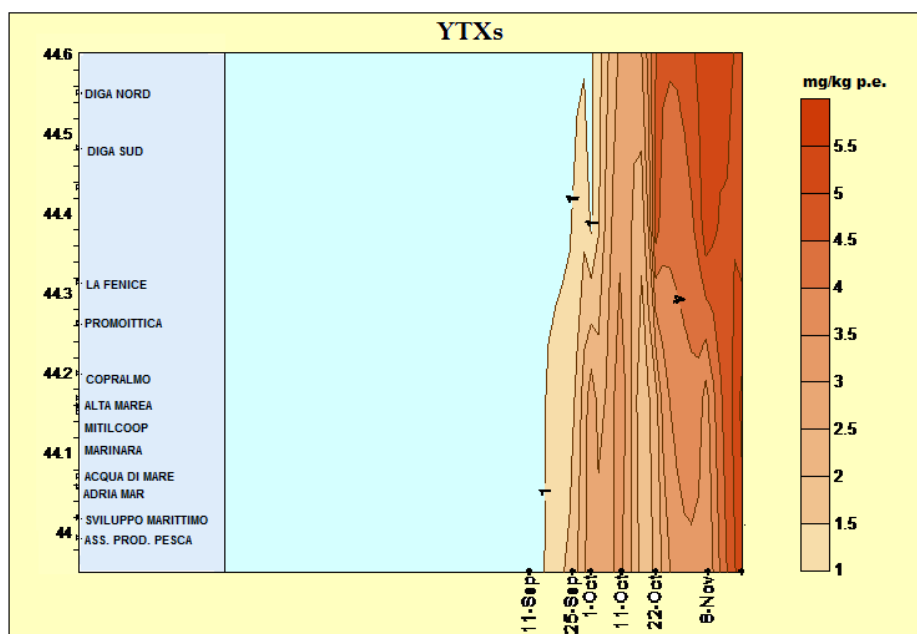


Figura 49 Distribuzione delle concentrazioni di *L. polyedrum* lungo la costa emiliano romagnola.



**Figura 50** Distribuzione delle concentrazioni di *Gonyaulax spinifera* lungo la costa emiliano romagnola.

L'andamento spaziale e temporale delle tre alghe produttrici di YTXs lungo la costa conferma che, nel periodo di tempo esaminato, l'alga tossica *G. spinifera* è la principale responsabile della rilevazione della tossicità dei molluschi. Le maggiori concentrazioni di YTXs, sono infatti state rilevate nel tessuto dei mitili provenienti dai banchi naturali "Diga Nord" e "Diga Sud", al largo di Ravenna (Fig. 51), area nella quale sono stati registrati i più alti valori di *G. spinifera* (Fig. 50).



**Figura 51** Distribuzione delle concentrazioni di YTXs totali lungo la costa emiliano romagnola

## 5 CONCLUSIONI

---

L'attività di monitoraggio, oggetto di questo lavoro, ha evidenziato concentrazioni di yessotossine (YTXs) nel tessuto dei mitili, tali da comportare la chiusura di tutti gli allevamenti situati nella fascia di mare compresa tra Ravenna e Cattolica.

La tossicità dovuta a YTXs è stata rilevata, per la prima volta, nel mese di settembre.

L'analisi dei campioni di acqua di mare prelevati in prossimità degli allevamenti e dei banchi naturali di mitili, nel periodo antecedente la manifestazione della tossicità, ha messo in luce la presenza delle alghe tossiche *Gonyaulax spinifera*, *Lingulodinium polyedrum* e *Protoceratium reticulatum* (sinonimo di *Gonyaulax grindleyi*), note per la produzione di YTXs.

Dall'analisi quali-quantitativa del fitoplancton tossico, è emerso che la specie *G. spinifera* è presente a concentrazioni molto elevate nella fascia di mare antistante Ravenna. Per quanto concerne le dighe foranee a protezione del porto di Ravenna tale specie algale si è sviluppata prima in "Diga Sud" e poi in "Diga Nord", probabilmente per effetto dei flussi di marea e della corrente. Nel mese di ottobre, nel banco naturale "Diga Sud", la specie tossica *G. spinifera* raggiunge i valori di concentrazione massimi registrati lungo tutta la costa (Fig. 50).

Le analisi del fitoplancton hanno rilevato, lungo il tratto di costa antistante Ravenna, nel medesimo periodo, concentrazioni apprezzabili di *L. polyedrum*, che sembra rispecchiare l'andamento di *G. spinifera*, seppur con concentrazioni del tutto inferiori. Entrambe le specie diminuiscono nell'area di Cesenatico e di Rimini, per poi aumentare nuovamente lungo la costa antistante Cattolica (Fig. 49 e 50).

*P. reticulatum* è distribuita lungo tutta la costa oggetto di studio, prevalentemente nei mesi di giugno e settembre (Fig. 48). È interessante notare che questa specie raggiunge concentrazioni più elevate, in periodi diversi rispetto a *G. spinifera* e *L. polyedrum*.

Dalle analisi biotossicologiche è risultato che la tossina prevalente, rilevata nel tessuto dei mitili è la homo-YTX. Tale analogo è presente nella totalità dei campioni analizzati tra settembre, ottobre e novembre, dunque a partire dal momento in cui l'analisi del fitoplancton rileva la presenza di *G. spinifera*.

Effettuando correlazioni tra andamento delle specie produttrici di yessotossine ed analoghi delle YTXs nei mitili, è emerso che la principale specie algale responsabile della tossicità dei mitili dovuta ad homo-YTX, è *Gonyaulax spinifera*. Tale dato

conferma quanto è stato osservato da esperimenti condotti in laboratorio, su un ceppo isolato in Adriatico (Riccardi *et al.*, 2009).

Nella fascia di mare antistante Ravenna la concentrazione di homo-YTX nei mitili, da sola, raggiunge valori circa 5 volte superiori al limite di legge, costituendo la quasi totalità delle YTXs. L'elevata tossicità è dovuta al fatto che *G. spinifera*, in quest'area, è presente a concentrazioni molto elevate. Alla tossicità può aver inoltre contribuito la contemporanea presenza della specie *L. polyedrum*, rilevata a concentrazioni apprezzabili seppur nettamente inferiori rispetto a quelle di *G. spinifera*. È ritenuto, infatti, che anche *L. polyedrum* produca homo-YTXs (Tubaro *et al.*, 1998).

Dalle analisi biotossicologiche, inoltre, la YTX è risultata la tossina prevalente nei campioni analizzati dal mese di aprile al mese di settembre, dunque prima della comparsa di *G. spinifera* lungo la costa emiliano-romagnola. L'analisi per la rilevazione delle specie fitoplanctoniche esaminate, mostra come l'unica specie presente in tale periodo sia *P. reticulatum*. Le correlazioni tra andamento di quest'ultima ed andamento di YTX nei mitili, designano tale specie algale come responsabile della produzione di YTX, a conferma del dato di letteratura (Ciminiello *et al.*, 2003)

Infatti, gli 11 ceppi isolati in coltura, tra il 1998 e il 2005, hanno dimostrato di essere tossici per la produzione di YTX come la tossina principale (Pistocchi *et al.*, 2012).

Attualmente (3 dicembre 2012, data di consegna della presente tesi), nonostante la scarsa presenza delle specie tossiche oggetto di studio, lungo la costa dell'Emilia Romagna, permane il divieto di raccolta di molluschi. Le YTXs possono infatti rimanere a lungo nel tessuto dei mitili, prima di essere metabolizzate.

Il presente lavoro rappresenta il primo studio in campo in cui viene correlata la presenza delle due tossine, YTX e homo-YTX, con quella delle due alghe produttrici, confermando quanto riportato dalla letteratura e ponendo le basi per la comprensione dei meccanismi che stanno alla base dell'andamento spaziale e temporale tipico delle principali specie microalgali tossiche la cui presenza interessa le acque marine prospicienti la regione Emilia Romagna e più in generale l'Adriatico nord-occidentale.

Le specie prese in esame in tale studio, mostrano presenze ricorrenti lungo la costa; integrando i dati ricavati dal continuo monitoraggio e attraverso la interpretazione dei principali parametri chimico-fisici nel tempo acquisiti, potremmo avere un quadro ecosistemico molto più dettagliato sulla distribuzione delle specie tossiche e sui fattori causali che ne favoriscono la proliferazione. Un insieme di condizioni che, oltre a

rappresentare un rischio per la salute umana, provocano un notevole danno economico al settore della molluschicoltura.

## 6 BIBLIOGRAFIA

---

Ade P., Funari E., Poletti R., **2003**. Il rischio sanitario associato alle tossine di alghe marine. *Ann. Ist. Super. Sanità.* 39(1): 53-68.

Andersen P., **1996**. Design and Implementation of some Harmful Algal Monitoring Systems. *IOC Technical Series* No. 44, UNESCO.

Anderson D.M. & Keafer B.A., **1985**. Dinoflagellate cyst dynamics in coastal and estuarine waters. In: Anderson DM, White AW, Baden DG (Ed.). *Toxic dinoflagellates*. New York: Elsevier;. p. 219-24.

Anderson D.M., Okaichi T., Remoto T., **1989**. Red tides: biology, environmental science and technology. New York. Elsevier Science Publishing Co.; p. 11.

Anderson D.M., **1994**. Le maree rosse. *Le Scienze*; 314 (10): 74-81

Anderson D. M., **1997**. Turning back the harmful red tide. *Nature* 388:513.

Auerbach P.S., **1988**. Clinical therapy of marine envenomation and poisoning. In: Tu AT (Ed.). *Handbook of natural toxins-marine toxins and venoms*. New York and Basel: M Dekker Inc.;. p. 493.

Bao W.Y., Satuito C., Yang J., Kitamura H., **2007**. Larval settlement and metamorphosis of the mussel *Mytilus galloprovincialis* in response to biofilms, *Mar. Biol.*, 150,(4), p. 564-574.

Bates S.S., **2000**. Domoic-acid-producing diatoms: another genus added! *J. Phycol.* 36: 978- 983.

Bolch C.J. & Hallegraeff G.M., **1993**. Chemical and physical options to kill toxic dinoflagellate cysts in ships' ballast water. *J Mar Environ Engineering* 1, p. 23.

Boni L., Mancini L., Milandri A., Poletti R., Pompei M., Viviani R., **1992**. First cases of DSP in the Northern Adriatic Sea. In: Vollenweider R.A., Marchetti R., Viviani R. (Ed.). *Marine coastal eutrophication*. Proc. Inter. Conf. Bologna, 21-24 March 1990. *Sci Total Environ* (suppl.):419-26.

Bordner J., Thiessen W.E., Bates H.A., Rapoport H., **1975**. Structure of a crystalline derivative of saxitoxin. Structure of saxitoxin. *J. Am. Chem. Soc.*, 97, 6008–6012.

Burkholder J.M., Avanza R.V., Sako Y., **2006**. 5. The ecology of harmful dinoflagellates. In: Ecology of harmful algae. E. Granéli and J.T. Turner Eds. Springer Verlag, Berlin Heidelberg, pp. 53-66.

Chang F.H., Anderson D.M., Kulis D.M., Till D.G., **1997**. Toxin production of *Alexandrium minutum* (Dinophyceae) from the Bay of Plenty New Zealand. *Toxicon*; 35: 393-409.

Ciminiello P., Fattorusso E., Magno S., Oshima Y., Poletti R., Viviani R., Yasumoto T., **1995**. Determination of PSP toxins in mussels from the Adriatic sea. *Mar Pollut Bull*; 30:733-5.

Ciminiello P., Fattorusso E., Forino M., Magno S., Poletti R., Viviani R., **1998**. Isolation of adriatoxin, a new analogue of yessotoxin from mussels of the Adriatic Sea. *Tetrahedron Lett*; 39: 8897-900.

Ciminiello P., Dell'Aversano C., Fattorusso E., Forino M., Magno S., Guerrini F., Pistocchi R., Boni L., **2003**. Complex yessotoxins profile in *Protoceratium reticulatum* from north-western Adriatic sea revealed by LC-MS analysis. *Toxicon* 2003 Jul; 42(1) :7-14.

Ciminiello P., Dell'Aversano C., Fattorusso E., Forino M., Magno S., Tartaglione L., Quilliam M.A., Tubaro A., Poletti R., **2005**. Hydrophilic interaction liquid chromatography/mass spectrometry for determination of domoic acid in Adriatic shellfish. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 19: 2030-2038.



Cordier S., Monfort C., Miossec L., Richardson S., Belin C., **2000**. Ecological analysis of digestive cancer mortality related to contamination by diarrhetic shellfish poisoning toxins along the coasts of France. *Environ Res (Section A)*;84:145-50.

Corsini S., Casazza G., Silvestri C., **2008**. I nostri mari minacciati da fioriture di alghe tossiche. APAT: IdeAmbiente, anno 05, n° 38.

Cosper E.M., Carpenter E.J., Bricelj V.M., **1989**. Novel phytoplankton blooms: causes and impacts of recurrent brown tides and other unusual blooms. Berlin; Springer Verlag; p. 449.

Doucette G.J., Maneiro I., Riveiro I., Svensen C., **2006**. Phycotoxin pathways in aquatic food webs: Transfer, accumulation and degradation. In *Ecology of Harmful Algae*; Graneli E., Turner J.T., Eds.; Springer-Verlag: Berlin Heidelberg; Vol. 189, p. 283.

Draisici R., Lucentini L., Giannetti L., Boria P., Poletti R., **1996**. First report of pectenotoxin-2 (PTX-2) in algae (*dinophysis fortii*) related to seafood poisoning in Europe. *Toxicon*;34: 923-35.

FAO/WHO/IOC, **2004**. Report of the Joint FAO/IOC/WHO and hoc Expert Consultation on Biotoxins in Bivalve Molluscs, *UNESCO 2005 IOC/INF-1215*, Workshop, Oslo, Norway, Sept. 26-30.

Fujiki H., Suganuma M., Yoshizawa S., Nishiwaki S., Winyar B., Sugimura T., **1991**. Mechanisms of action of okadaic acid class tumor promoters on mouse skin. *Environ Health Perspect*;93:211-4.

Fukuyo Y., **2006**. Threats to global food security. Harmful algal blooms, microbial and chemical agents. *Series on Sea and Human Security*, Workshop on Food Security, 1-6 October 2006, Hiroshima, Japan.

Furey A., Moroney C., Magdalena A.B., Saez M.J.F., Lehane M., James K.J., **2003**. Geographical, temporal, and species variation of the polyether toxins, azaspirazids, in shellfish. *Environ. Sci. Technol.*, 37: 3078–3084.

Gainey L., Shumway J., Shumway S., **1988**. A compendium of the responses of bivalve molluscs to toxic dinoflagellates. *J. Shellfish Res.*, 7, 623–628.

Gardenghi G., **1978**. Elementi di zoologia. *CLUEB*. p.379-382, 393-399.

Giacobbe M.G., Penna A., Ceredi A., Milandri A., Poletti R., Yang X., **2000**. Toxicity and ribosomal DNA of the dinoflagellate *dinophysis sacculus* (dinophyta). *Phycologia*;39(3):177-82.

Granéli E. & Turner J. T., **2006**. 1. An introduction to harmful algae. In: “Ecology of harmful algae”.

Halim Y., **1960**. *Alexandrium minutum*, n. gen. n. sp. dinoflagellé provocant des "eaux rouges". *Vie et Milieu* 11, p. 102.

Hallegraeff G.M., Bolch C.J., Blackburn S.I., Oshima Y., **1991**. Species of the toxigenic dinoflagellate genus *Alexandrium* in southeastern Australian waters. *Bot Mar.* 34, p. 575.

Hallegraeff G.M. & Bolch C.J., **1992**. Transport of diatoms and dinoflagellates resting spores in ships' ballast water: implications for plankton biogeography and aquaculture. *J Plankton Res* 14(8):1067.

Hallegraeff, G.M., Anderson D.M., Cembella A.D., **1995**. (Ed.) Manual on harmful marine microalgae. Paris : UNESCO.

Hallegraeff G.M., **1998**. Transport of toxic dinoflagellate via ship's ballast water: bioeconomic risk assessment and efficacy of possible ballast water management strategies. *Mar Ecol Prog Ser*; 168: 297-309.

Hallegraeff G.M., Munday B.L., Baden D.G., Whitney P.L., **1998**. *Chattonella marina* Raphidophyte bloom associated with mortality of cultured bluefin tuna (*Thunnus maccoyii*) in South Australia. In Reguera B., Blanco, J., Fernandez, M. A. and Wyatt, T. (eds), *Harmful Algae*. IOC-UNESCO, Paris, pp. 93–96.

Ishige M., Satoh N., Yasumoto T., **1988**. *Pathological studies on the mice administered with the causative agent of diarrhetic shellfish poisoning (okadaic acid and pectenotoxin-2)*. Hokkaido Institute of Health;. (Report, 38). p. 15-9.

James K.J., Moroney C., Roden C., Satake M., Yasumoto T., Lehane M., Furey A., **2003**. Ubiquitous ‘benign’ alga emerges as the cause of shellfish contamination responsible for the human toxic syndrome, azaspiracid poisoning. *Toxicon*, 41: 145–154.

Kao C.Y., **1972**. Pharmacology of tetrodotoxin and saxitoxin. *Fed Proc*;31:1117-23.

Krock B., Tillmann U., John U., Cembella A.D., **2008**. Characterization of azaspiracids in plankton size-fractions and isolation of an azaspiracid-producing dinoflagellate from the North Sea. *Harmful Algae*, 10.1016.

Landsberg, J.H, **2002**. The Effects of Harmful Algal Blooms on Aquatic Organisms. *Rev. Fish. Sci.*, 10, 113-390.

Lee J.S., Igarashi T., Fraga S., Dahl E., Hovgaard P., Yasumoto T., **1989**. Determination of diarrhetic shellfish toxins in various dinoflagellate species. *J Appl Phycol*;1:147-52.

Lefebvre K.A., Bill B.D., Erickson A., Baugh K.A., O'Rourke L., Costa P.R., Nance S., Trainer V.L., **2008**. Characterization of intracellular and extracellular saxitoxin levels in both field and cultured *Alexandrium* spp. samples from Sequim Bay, Washington. *Mar. Drugs*, 6, 103–116.

Llewellyn L.E., **2006**. Saxitoxin, a toxic marine natural product that targets a multitude of receptors. *Nat. Prod. Rep.*, 23, 200–222.

LoCicero V.R., **1975**. Proceedings of the first international conference on toxic dinoflagellates blooms. Boston, Massachusetts Science and Technology Foundation, p. 541.

Maclean J.L., **1989**. Indo-Pacific red tides, 1985-1988. *Mar. Poll. Bull.* Vol. 20, No. 7, p. 304.

Madigan T.L., Lee K.G., Padula D.J., McNabb P., Pointon A.M., **2006**. Diarrhetic shellfish poisoning (DSP) toxins in South Australian shellfish. *Harmful Algae*; 5:119-23.

Masò M. & Garcés E., **2006**. Harmful microalgae blooms (HAB); problematic and conditions the induce them. *Marine Pollution Bulletin* 53: 620-630.

McMahon T., Silke J., **1996**. West coast of Ireland; winter toxicity of unknown aetiology in mussels. *Harmful Algae News*, 14: 2

McMinn A., **1989**. Late Pleistocene dinoflagellate cysts from Botany Bay, New South Wales, Australia. *Micropaleontology*, 35(1): 1-9.

Mengoli A., **1998**. Aspetti morfo-funzionali dei mitili, *Laguna*, 4, p.12-19.

Montanari G., Rinaldi A., Pinardi N., Simoncelli S., Giacomelli L., **2006**. Le correnti costiere dell'Emilia-Romagna nel periodo dal 1995 al 2002. I quaderni di ARPA ER: pp.62

Mosetti F., **1983**. A tentative attempt at determining the water flow through the Otranto Strait: the mouth of Adriatic Sea. Criterion for applying the computation of dynamic height anomalies on the water budget problems. *Boll. Oceanol. Teor. Appl.* 1: 143-163

Murata T., Kumagai M., Lee J.S., Yasumoto T., **1987**. Isolation and structure of yessotoxin, a novel polyether compound implicated in diarrhetic shellfish poisoning. *Tetrahedron Lett*; 28: 5369-872.

Naar J.P., Flewelling L.J., Lenzi A., Abbott J.P., Granholm A., Jacocks H.M., Gannon D., Henry M., Pierce R., Baden D.G., Wolny J., Landsberg J.H., **2007**. Brevetoxins, Like Ciguatoxins, are Potent Ichthyotoxic Neurotoxins That Accumulate in Fish. *Toxicon*, 50, 707-723.

Oshima Y., Blackburn S.I., Hallegraeff G.M., **1993**. Comparative study on paralytic shellfish toxin profiles of the dinoflagellate *Gymnodinium catenatum* from three different countries. *Mar. Biol.*, 116, 471–476.

Paz B., Riobó P., Fernández M.L., Fraga S., Franco J.M., **2004**. Production and release of yessotoxins by the dinoflagellates *Protoceratium reticulatum* and *Lingulodinium polyedrum* in culture – *Toxicon*, - 44:251- 58

Pistocchi, R., Guerrini, F., Pezzolesi, L., Riccardi, M., Vanucci, S., Ciminiello, P., Dell'Aversano, C., Forino, M., Fattorusso, E., Tartaglione, L., Milandri, A., Pompei, M., Cangini, M., Pigozzi, S., and Riccardi, E. **2012**. Review. Toxin Levels and Profiles in Microalgae from the North-Western Adriatic Sea - 15 Years of Studies on Cultured Species. *Mar. Drugs*, 10: 140-162.

Poletti R., Viviani R., Casadei C., Lucentini L., Giannetti L., Draisci R., **1995**. Decontamination dynamics of diarrhetic toxins contaminated mussels in a pond of the Adriatic Sea. Seventh International Conference on Toxic Phytoplankton.

Poletti R., Viviani R., Casadei C., Lucentini L., Giannetti L., Funari E., Draisci R., **1996**. Decontamination dynamics of mussels naturally contaminated with diarrhetic toxins relocated to a basin of the Adriatic Sea. In: Yasumoto T, Oshima Y, Fukuyo Y, ed. Harmful and toxic algal blooms Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO; p. 429-432.

Poletti R., Cettul K., Bovo F., Milandri A., Pompei M., Frate, R., **1998**. Distribution of toxic dinoflagellates and their impact on shellfish along the northwest Adriatic coast. Reguera B., Blanco J., Fernandez M.L., Wyatt T., *Harmful Algae*. Xunta de Galicia and Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO 1998 p.88-90

Poletti R., Viviani R., **1999**. Tossine acquatiche diffusione e controllo, parte seconda, *Laguna*,6, p. 26-39.

Poletti R., Milandri A., Pompei M., **2003**. Algal biotoxins of marine origin: new indication from the European Union, *Veterinary research communication*, 27, suppl, p. 173-182.

Poletti R. **2007**. Lo stato delle conoscenze di alcune biotossine marine prodotte da microalghe bentoniche lungo le coste italiane, *Corso ARPA-APAT sulle alghe tossiche*, CRM, Cesenatico, 15-17/05.

Poletti R., **2011**. Problematiche da biotossine acquatiche. In: “Malattie trasmesse da alimenti di origine animale: pericoli e rischi chimici”. Casalecchio d Reno, Bologna, 20 maggio 2011.

Pompei M., Cangini M., Boni L., Guerrini F., Pistocchi R., Cucchiari E., Romagnoli T., Totti C., **2005**. *Microalghe tossiche del Medio ed Alto Adriatico – Guida per Acquacoltori e Operatori Sanitari*. Editore Fernandel (Ravenna).

Quilliam M. A., **1996**. *Applications of LC-MS in Environmental Chemistry*, Elsevier Science Publ. BV, Amsterdam, , p 415.

Rehmann N., Hess P., Quilliam M.A., **2008**. Discovery of new analogs of the marine biotoxin azaspirazid in blue mussels *Mytilus edulis* by ultra-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rap. Commun. Mass Spektrom.*, 22: 549–558.

Rhodes L., McNabb P., de Salas M., Briggs L., Beuzenberg V., Gladstone M., **2006**. *Yessotoxin production by Gonyaulax spinifera* - Harmful Algae, - 5:148-55

Riccardi M., Guerrini F., Roncarati F., Milandri A., Cangini M., Pigozzi S., Riccardi E., Ceredi A., Ciminiello P., Dell’Aversano C., Fattorusso E., Forino M., Tartaglione L., Pistocchi R., **2009**. *Gonyaulax spinifera* from the Adriatic sea: Toxin production and phylogenetic analysis - Harmful Algae, 8: 279-290.

Rinaldi A., Montanari G., Ferrari C.R., Ghetti A., Vollenweider R.A., **1995**. Evoluzione dello stato trofico nelle acque costiere Emiliano-Romagnole nel periodo 1982-1994. Evoluzione dello stato trofico in Adriatico: analisi degli interventi attuati e future linee di intervento. Atti del convegno, Marina di Ravenna, 28-29 settembre 1995.

Satake M., Terasawa K., Kadowaki Y., Yasumoto T., **1996**. Relative configuration of yessotoxin and isolation of two new analogs from toxic scallop. *Tetrahedron Lett*; 37:5955-8.

Schantz E.J., Mold J.D., Stanger D.W., Shavel J., Riel F.J., Bowden J.P., Lynch J.M., Wyler R.S., Riegel B.R., **1957**. Sommer H. Paralytic shellfish poisoning. VI. A procedure for the isolation and purification of the poison from toxic clams and mussel tissues. *J Am Chem Soc*; 72: 5230-35.

Schantz E.J., Mold J.D., Howard W.L., Bowden J.P., Stanger D.W., Lynch J.M., Wintersteiner O.P., Dutcher J.D., Walters D.R., Riegel B., **1961**. Paralytic shellfish poisoning. VIII. Some chemical and physical properties of purified clam and mussel poisons. *Can J Chem*; 39: 2117-23.

Schantz E.J., Ghazarossian V.E., Schnoes H.K., Strong F.M., Springer J.P., Pezzanite J.O., Clardy J., **1975**. Structure of saxitoxin. *J. Am. Chem. Soc.*, 97, 1238–1239.

Sellner K.G., Doucette G.J., Kirkpatrick G.J. **2003**. Harmful algal blooms: causes, impacts and detection. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 30: 383-406.

Shibata S., Ishida Y., Ditano H., Ohizumi Y., Habon J., Kikuchi H., **1982**. Contractile effects of okadaic acid, a novel ionophore-like substance from black sponge, on isolated smooth muscles under the condition of Ca deficiency. *J Pharmacol Exp Ther*; 223: 135-43.

Sidari L. & Honsell G., **1994**. Il genere *Dinophysis ehrenberg* (pyrrophyta) in Adriatico: revisione bibliografica. *Boll Soc Adr Sci*; 75:413-22.

Sournia A., Chretiennot-Dinet M.J., Ricard M., **1991**. Marine phytoplankton: how many species in the world ocean? *J Plankton Res.* 13, p. 1093.

Steidinger K.A. & Baden D.G., **1984**. Toxic marine dinoflagellates. In: Spector DL (Ed.). *Dinoflagellates*. Orlando, Florida: Academic Press Inc.; p. 201-49.

Steidinger K.A., Garcés E. **2006**. Importance of life cycles in the ecology of harmful microalgae. In: "Ecology of harmful algae". Granéli E., Turner J.T (Eds.). *Ecological Studies*, Vol 189. Springer Verlag, Berlin Heidelberg, pp 37-52.

Suganuma M., Suttajit M., Suguri H., Ojika M., Yamada K., Fujiki K., **1989**. Specific binding of okadaic acid, a new tumor promoter, in mouse skin. *FEBS Lett*;250:615-8.

Taylor F.Y.R., **1984**. Toxic dinoflagellates: taxonomic and biogeographic aspects with emphasis on seafood toxins. In: Ragelis EP (Ed.) *Seafood toxins ACS Symposium*. Washington DC: American Chemical Society; Series 262: p. 77.

Terao K., Ito E., Oarada M., Murata M., Yasumoto T., **1990**. Histopathological studies on experimental marine toxins poisoning. 5. The effects in mice of yessotoxin isolated from *Patinopecten yessoensis* and of a desulfated derivative. *Toxicon*; 28:1095-104.

Tillmann U., Elbrächter M., Krock B., John U., Cembella A., **2009**. *Azadinium spinosum* gen. et sp. nov. (Dinophyceae) identified as a primary producer of azaspiracid toxins. *European Journal of Phycology*. Volume 44, Issue 1, 2009 pages 63-79.

Todd E.C.D., **1993**. Domoic acid and amnesic shellfish poisoning; a review. *J Food Prot*;56:69-83.

Toyofuku H., **2006**, Joint FAO/WHO/IOC activities to provide scientific advice on marine biotoxins (research report), *Marine Pollution Bulletin*, 52, p. 1735-1745.

Tredici M.R., **2006**. Colture massive di microalghe: calamità o risorsa? Dipartimento di Biotecnologie Agrarie - Università degli Studi di Firenze, P.le delle Cascine, 24 (da una lettura tenuta in occasione della giornata di studio dedicata a: "Coltura massiva delle



microalghe: il contributo della scuola fiorentina” - Accademia dei Georgofili, Firenze, 30.11.2006).

Tubaro A., Sidari L., Della Loggia R., Yasumoto T., **1998**. Occurrence of yessotoxin-like toxins in phytoplankton and mussels from northern Adriatic Sea. In: Reguera B, Blanco J, Fernandez ML, Wyatt T (Ed.). *Proceedings of the VIII International Conference on Harmful algae*. Vigo, Spain 25-29 June 1997. Paris: Xunta de Galicia and IOC of UNESCO; p. 470-2.

Tubaro A. & Hungerford J., **2007**. Toxicology of marine toxins, *Veterinary Toxicolog*, chap 60, p. 725-752.

Twiner M. J., Rehmann N., Hess P., Doucette G. J., **2008**. Azaspiracid Shellfish Poisoning: A Review on the Chemistry, Ecology, and Toxicology with an Emphasis on Human Health Impacts *Mar. Drugs*, 6, 39-72.

UNESCO, **1988**. Eutrophication in the Mediterranean Sea.

Usup G., Kulis D.M., Anderson D.M., **1994**. Growth and toxin production of the toxic dinoflagellate *Pyrodinium bahamense* var. *compressum* in laboratory cultures. *Nat. Toxins*, 2, 254–262.

Viviani R., Boni L., Cattani O., Milandri A., Poletti R., Pompei M., Sansoni G., **1995**. ASP, DSP, NSP and PSP monitoring in “mucilaginous aggregates” and in mussels in a coastal area of the Northern Adriatic sea facing Emilia Romagna in 1988, 1989 and 1991. In: Vollenweider RA, Rinaldi A(Ed.). *Proceedings of International Workshop. Cesenatico 10-12 Sept 1992. Sci Total Environ*; 165:203-11.

Vollenweider R.A., Rinaldi A., Montanari G., **1992**. Eutrophication, structure and dynamics of a marine coastal system: results of ten-year monitoring along the Emilia-Romagna coast (Northwest Adriatic Sea). In: Vollenweider RA, Marchetti R, Viviani G (Ed.). *Marine coastal eutrofication Proceedings of an International Conference*. Bologna 21-24 March 1990. Italy. p. 63-106. *Science of Total Environment*. Elsevier Science Publishers B.V. Amsterdam.

Whittle K. & Gallacher S., **2000**, Marine toxins, *British Medical Bulletin*, 56(1).

World Health Organization (WHO), **1984**. *Aquatic (marine and freshwater) biotoxin*. Geneva. (Environmental Health Criteria, 37). p. 1.

Wright J.L.C., Boyd R.K., De Freitas A.S.W., Falk M., Foxall R.A., Jamieson W.D., Loycock M.V., McCulloch A.W., McInnes A.G., Odense P., Pathak V.P., Quilliam M.A., Ragan M.A., Sim P.G., Hibault P., Walter J.A., Gilgan M., Richard D.G.A., Dewar D., **1989**. Identification of domoic acid, a neuroexcitatory aminoacid, toxic mussels from eastern Prince Edward Island. *Can J Chem*; 67:481-90.

Wright L.C., **1995**. Dealing with seafood toxins: present approaches and future options. *Food Res Int*;28:347-58.

Yasumoto T., Oshima Y., Yamaguchi M., **1978**. Occurrence of a new type of shellfish poisoning in the Tohoku district. *Bull Jpn Soc Sci Fish*; 44:1249-55.

Yasumoto T., Oshima Y., Sugawara W., Fukuyo Y., Oguri H., Igarashi T., Fujita N., **1980**. Identification of *dinophysis fortii* as the causative organism of diarrhetic shellfish poisoning. *Bull Jpn Soc Sci Fish*; 46:1405-11.

Yasumoto T., Murata M., Oshima Y., Matsumoto C.K., Clardy J., **1984**. Diarrhetic shellfish poisoning. In: Rageli EP (Ed.). *Seafood toxins*. Washington DC: American Chemical Society; (ACS Symposium Series, 262). p. 207-14.

Yasumoto, T. & Murata, M. **1993**. Marine toxins. *Chem. Rev.*, 93, p. 1897.

Yasumoto T., **2001**. The chemistry and biological function of natural marine toxins. *Chemical Record*, 1: 228–242.

Yuki K., **1994**. First report of *Alexandrium minutum* Halim (Dinophyceae) from Japan. *Jpn. J. Phycol.* 42, 425–430.

Zingone A., Oksfeldt Enevoldsen H., **2000**. The diversity of harmful algal blooms: a challenge for science and management. *Ocean & Coastal Management* 43: 725-748.

## **RINGRAZIAMENTI**

---

Giunta al termine di tale percorso desidero ringraziare prima di tutto il Professor Attilio Rinaldi, il quale mi ha dato l'opportunità di realizzare questo lavoro.

Un doveroso e sincero ringraziamento va la Dottoressa Marinella Pompei, per i preziosi insegnamenti e per il grande aiuto che mi ha fornito. Per la disponibilità concessami, ringrazio la Dottoressa Anna Milandi. Un sentito grazie va a Monica, Silvia, Elena, Filippo, Alfiero, Donatella, Katiusca, Luca e a tutti i dipendenti del Centro Ricerche Marine di Cesenatico. Ognuno di loro mi ha insegnato qualcosa che porterò dentro di me. Ringrazio il Dottor Roberto Poletti, per aver condiviso un po della sua esperienza con me.

Per avermi fatta sentire a casa, ringrazio Stefano, Enza, Patricia, Claudio, Alessandra e tutti i dipendenti della Daphne ARPA ER, non dimenticherò tutti i momenti divertenti trascorsi con voi! Un gigantesco GRAZIE va a Sandro, il quale mi ha supportata e "sopportata", aiutandomi a risolvere le difficoltà incontrate lungo questo percorso.

Un grazie speciale va alla Professoressa Pistocchi, per aver suscitato in me, fin dalle prime lezioni universitarie, un grande interesse verso il microscopico e così diversificato mondo delle microalghe.

Per esserci sempre stata nel momento del bisogno, per avermi sostenuta e consigliata, un grazie enorme va alla Dottoressa Franca Guerrini.

Per i momenti indimenticabili trascorsi insieme, ringrazio TUTTI i miei compagni di corso, avete reso questa esperienza universitaria ancora più bella!

Grazie di cuore ai miei genitori, senza i quali niente di tutto questo sarebbe stato possibile. Mi avete incoraggiata sempre a seguire i miei sogni, e spero adesso di realizzarli tutti! Grazie a Sissy e Raffaella, perché, ognuna a "modo suo", mi siete sempre state vicine!

**Dodo...il grazie più grande va a te, perché sei la mia forza! Abbiamo iniziato questo tragitto insieme ed ora che siamo giunti al termine, la gioia è ancor più grande, perché condivisa con te! Non vedo l'ora di iniziare il prossimo capitolo della nostra vita..**

*Ringrazio me stessa... per l'impegno, la dedizione e la passione che hanno consentito la realizzazione di questo lavoro!*