

ALMA MATER STUDIORUM
UNIVERSITA' DI BOLOGNA

SCUOLA DI SCIENZE
Corso di laurea Magistrale in Biologia Marina
Campus di Ravenna

**Dinamica del fitoplancton in relazione alle
variabili abiotiche con particolare attenzione alle
specie dannose.**

Materia di tesi: Botanica Marina Applicata

Relatore:
Prof.ssa Rossella Pistocchi

Presentata da:
Irene Servadei

Correlatori:
Dott.ssa Franca Guerrini
Dott.ssa Monica Cangini

III sessione

Anno Accademico 2012-2013

INDICE

1. INTRODUZIONE	01
1.1 Il Mare Adriatico: caratteristiche generali	01
1.1.1 Batimetria	01
1.1.2 L'Alto Adriatico	02
1.1.3 Apporti fluviali	02
1.1.4 Le correnti	03
1.1.5 Nutrienti	04
1.1.5.1 Azoto Nitrico ($N-NO_3$)	05
1.1.5.2 Azoto nitroso ($N-NO_2$)	07
1.1.5.3 Azoto ammoniacale ($N-NH_3$)	07
1.1.5.4 Fosforo reattivo ($P-PO_4$)	08
1.1.5.5 Silice reattiva ($Si-SiO_2$)	09
1.2 Marine Strategy	10
1.2.1 Descrittore 1: biodiversità	11
1.2.2 Descrittore 5: eutrofizzazione	14
1.2.3 Il monitoraggio nella costa emiliano-romagnola	17
1.3 Harmful Algal Bloom (HABs)	19
1.3.1 Le HAS tossiche	23
1.4 Fitoplancton dell'Adriatico settentrionale	29
1.4.1 Storicità degli HAB avvenuti lungo la costa emiliano-romagnola	32
2. SCOPO DELLA TESI	34
3. MATERIALI E METODI	36
3.1 Area di studio e preparazione dei campioni.	36
3.2 Analisi dei nutrienti inorganici	39
3.2.1 Fosfati inorganici	40
3.2.1.1 Principio del metodo	40
3.2.1.2 Procedimento	40
3.2.2 Nitrati e Nitriti inorganici	41
3.2.2.1 Principio del metodo	41
3.2.2.2 Procedimento	42

3.2.3	Ammonio	46
3.2.3.1	<i>Principio del metodo</i>	46
3.2.3.2	<i>Procedimento</i>	46
3.2.4	Silicati	47
3.2.4.1	<i>Principio del metodo</i>	47
3.2.4.2	<i>Procedimento</i>	47
3.3	<u>Analisi quali-quantitativa</u>	49
3.3.1	Metodica di Utermöhl (1958) per il conteggio del fitoplancton.	50
3.3.1.1	<i>Conteggio per campi casuali.</i>	50
3.3.1.2	<i>Conteggio per transetti.</i>	51
3.3.1.3	<i>Conteggio sul fondo</i>	51
3.4	<u>Analisi dei dati</u>	52
3.4.1	Analisi univariate	53
3.4.2	Analisi multivariate	53
3.4.2.1	<i>Variabili biotiche</i>	53
3.4.2.2	<i>Variabili abiotiche</i>	55
3.4.2.3	<i>Interazione fra le variabili biotiche e abiotiche</i>	55
3.4.3	Indici di diversità	56
3.4.3.1	<i>Indice di Shannon (H)</i>	56
3.4.3.2	<i>Indice di Evenness (J)</i>	57
4.	RISULTATI E DISCUSSIONI	58
4.1	<u>Variabili abiotiche</u>	58
4.1.1	Temperatura e salinità	58
4.1.2	Nutrienti inorganici	60
4.1.3	Rapporto N/P	62
4.1.4	Principal Component Analysis (PCA)	64
4.2	<u>Fitoplancton</u>	65
4.2.1	Abbondanza percentuale dei principali componenti del fitoplancton	65
4.2.2	Rilevanza numerica del fitoplancton	66
4.2.3	Diversità specifica	68
4.2.4	Specie potenzialmente tossiche rilevate	73
4.2.5	Multidimensional scaling non metrico (nMDS)	77
4.3	<u>Interazioni fra Fitoplancton e variabili abiotiche</u>	78

5. CONCLUSIONI	82
6. BIBLIOGRAFIA	85
6.1 Libri e articoli	85
6.2 Siti internet	94

ALLEGATO 1 (Analisi quali-quantitativa per il sito DIGA SUD)

ALLEGATO 2 (Analisi quali-quantitativa per il sito GEOMAR)

ALLEGATO 3 (Variabili abiotiche per il 2 siti)

ALLEGATO 4 (ANOVA variabili abiotiche e “Box Plot”)

ALLEGATO 5 (ANOVA variabili biotiche e “Box Plot”)

ALLEGATO 6 (Procedura BIOENV)

ALLEGATO 7 (Procedura RELATE)

ALLEGATO 8 (Spearman Rank Order Correlations)

ALLEGATO 9 (Numero taxa e indici di diversità)

1. INTRODUZIONE

1.1 Il Mare Adriatico: caratteristiche generali

1.1.1 Batimetria

Il Mare Adriatico è poco profondo e può essere schematicamente suddiviso in tre bacini, con batimetria crescente da nord a sud (Figura 1).

Il bacino settentrionale (Alto Adriatico) corrisponde alla porzione chiusa a nord dalla congiungente fra le città di Ancona e Zara e ha come profondità media 35 m e come massima 70 m.

Il sottostante bacino centrale raggiunge la profondità massima di 270 m in corrispondenza della fossa di Pomo, ed è separato dall'Adriatico Meridionale da una soglia alla profondità di circa 130 m.

Quest'ultimo bacino presenta una vasta depressione centrale, la cui profondità supera i 1200 m (al largo di Bari), ed è a sua volta separato dal Mar Ionio da una soglia localizzata a 800 m che rappresenta lo stretto di Otranto (Tagliapietra *et al.*, 2008)

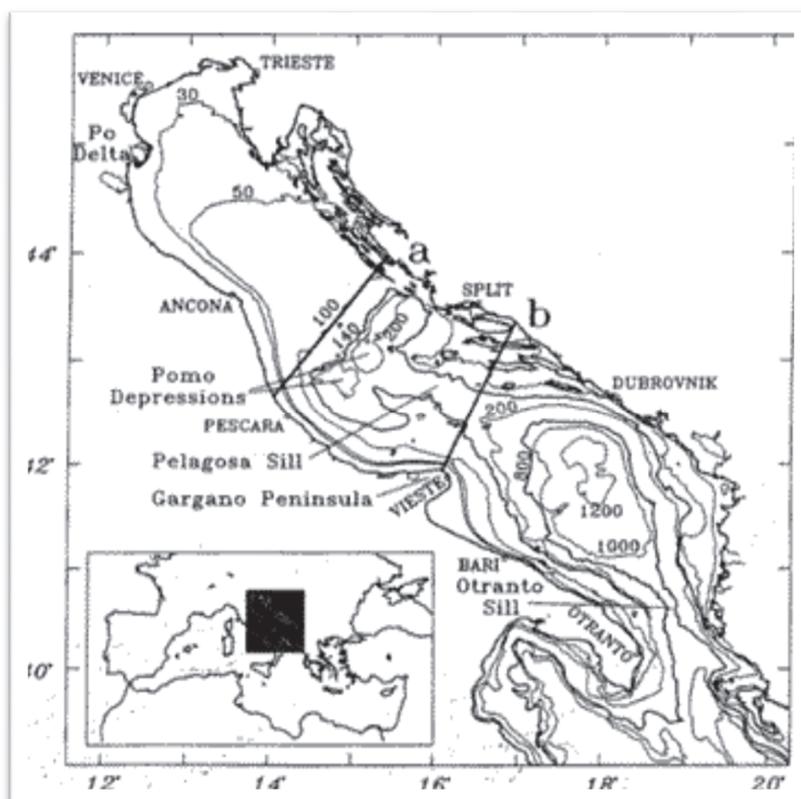


Figura 1: batimetria Mar Adriatico.

1.1.2 L'Alto Adriatico

L'Alto Adriatico (AA) è l'area marina di piattaforma continentale più settentrionale del Mare Mediterraneo.

E' un'area poco profonda (massima profondità: 70 m) dominata da una circolazione prevalentemente ciclonica.

Le caratteristiche biologiche di questo ecosistema sono fortemente determinate dalla batimetria, dalla meteorologia, dall'idrodinamismo e dagli apporti fluviali, che rappresentano circa il 20 % di quelli di tutto il Mare Mediterraneo (Russo e Artegiani, 1996).

Gli apporti d'acqua dolce dal Fiume Po, la frequenza dei venti da Nord e Nord-Est (Bora) e gli scambi di masse d'acqua con l'Adriatico Meridionale influenzano fortemente la composizione e l'attività delle comunità pelagiche.

L'Adriatico Settentrionale è particolarmente sensibile alle variazioni stagionali e pluriennali del carico di nutrienti, i cui effetti sono fortemente modulati da cambiamenti nelle condizioni oceanografiche, determinati da fluttuazioni climatiche (Degobbis *et al.*, 2000).

L'Alto Adriatico essendo un bacino semichiuso, poco profondo e circondato da aree continentali sempre più urbanizzate, risente di un notevole impatto antropico. Apporti continentali e atmosferici di nutrienti e di inquinanti, uniti ad un'alta urbanizzazione costiera, ad intense attività di pesca e acquacultura, al turismo e al traffico navale, influenzano significativamente la qualità delle acque.

L'AA è stato soggetto inoltre ad intensi fenomeni di eutrofizzazione e a ripetuti episodi di formazione di aggregati mucilluginosi (Giani *et al.*, 2005).

1.1.3 Apporti fluviali

Il Mare Adriatico, nonostante le sue modeste dimensioni (2504000 Km²), riceve 1/3 di tutti gli apporti fluviali confluenti nel Mediterraneo.

Nell'Alto Adriatico si riversano importanti fiumi che nel loro insieme rappresentano il reticolo drenante del Bacino Padano; una vasta valle compresa tra le Alpi a nord e la Catena Appenninica a sud. Nell'arco di costa nord occidentale troviamo infatti le foci dell'Isonzo, del Tagliamento, del Piave, del Brenta, dell'Adige, del Po e del Reno.

L'Adriatico viene considerato un bacino di diluizione poiché la somma delle precipitazioni e degli apporti fluviali superano i processi di evaporazione, conferendo a questo mare un guadagno di acqua pari a $1,14 \pm 0,20 \text{ m}^3$ l'anno.

Il bilancio salino viene tuttavia mantenuto dagli scambi che si verificano attraverso la soglia di Otranto: da qui le acque adriatiche, relativamente fredde e diluite, lasciano il bacino scorrendo lungo le coste italiane e vengono rimpiazzate da quelle più calde e salate provenienti dal Mar Ionio (Russo e Artegiani, 1996).

In Adriatico settentrionale i deflussi fluviali apportano circa $9,41 \cdot 10^9$ m³ di acque dolci ogni anno e metà di quest'apporto è a carico del fiume Po (Franco, 1973).

1.1.4 Le correnti

In Adriatico l'effetto della diluizione delle acque, unito alla rotazione terrestre e all'intensità dei venti di Bora (Nord, Nord-Orientale), innesca una circolazione ciclonica antioraria (Franco, 1973; Mosetti, 1984): masse d'acqua entrano in questo mare attraverso la soglia di Otranto, risalgono a nord lungo le coste della penisola balcanica per arrivare a mescolarsi con le acque diluite nell'Alto Adriatico per poi ridiscendere verso sud lungo le coste italiane, uscendo di nuovo nella sezione più occidentale dal canale di Otranto (Franco e Michelato, 1992) (Figura 2).



Figura 2: Correnti marine del Mar Adriatico.

Per quanto riguarda l'Adriatico settentrionale si possono identificare due situazioni tipo, intervallate da brevi periodi di transizione: una situazione estiva che va da aprile a ottobre e una invernale che va da dicembre a febbraio. Nella prima si ha stabilità e stratificazione termalina della colonna d'acqua mentre nella seconda si hanno instabilità e moti turbolenti (Artegiani *et al.*, 1997; Mauri e Poulain, 2001).

Nei mesi estivi viene trasmesso calore dall'atmosfera agli strati superficiali e si forma un gradiente termico verticale (termoclino), il quale stabilizza la colonna d'acqua. Le acque dolci provenienti dai fiumi con bassa densità rimangono in questo modo confinate sulla superficie. Il risultato è una separazione di acque poco dense e calde in superficie e salate e fredde in profondità. Nel caso l'apporto fluviale sia elevato lo strato diluito forma una lamina superficiale che si distanzia dalla costa e al largo va a dividersi in due componenti: una che decorre verso sud lungo la costa emiliano-romagnola e l'altra che si dirige a nord-ovest andando a formare nel Golfo di Venezia un vortice ciclonico che va a isolare al suo centro una massa di acqua fredda (Franco, 1986).

A partire dalla fine dell'autunno il sistema comincia a disperdere calore e il termoclino tende ad affondare fino a che non viene raggiunta in pieno inverno l'omogeneità termica. In questo caso la colonna d'acqua perde stabilità e le acque di deflusso padano e dei fiumi minori scorrono adiacenti alla costa, in una fascia molto ristretta, in direzione sud (Franco, 1986).

1.1.5 Nutrienti

L'Alto Adriatico presenta caratteristiche sia di mare oligotrofico, per l'ingressione di acque salate e povere di nutrienti dal Mediterraneo Orientale, che di elevata produttività, limitatamente alla sua porzione occidentale (Franco, 1983; Fonda Umani *et al.*, 1992; Zavatarelli *et al.*, 1998).

La distribuzione dei nutrienti, che assieme alla temperatura e alla luce solare costituiscono i principali fattori di crescita per il fitoplancton, è fortemente influenzata dalla stratificazione della colonna d'acqua (Franco *et al.* 1979).

I nutrienti in estate vengono immessi nel Nord Adriatico tramite le acque dolci del Po, le quali contengono concentrazioni medie di 85-90 μM di azoto inorganico disciolto, di 1,5 μM di ortofosfato e 90 μM di orto silicato. Queste acque vanno a supportare i *bloom* fitoplanctonici che trasferiscono azoto, fosforo e silicio dalla fase disciolta a quella particellata biogenica (Franco, 1983).

Al di fuori di questo strato di acqua dolce che tende a rimanere in superficie (*plume*), i nutrienti sono presenti a più basse concentrazioni: mediamente 3-4 μM di nitrati, 0,1 μM di fosfati e 2 μM di silicati (Franco, 1983). Queste basse concentrazioni a fine estate, nelle acque più profonde, salate e fredde, tendono ad aumentare a causa della rigenerazione operata da batteri eterotrofi, dalla quale ha origine il 50% della produzione

di nutrienti nell'Adriatico settentrionale (Degobbis *et al.*, 1986; Degobbis e Gilmartin, 1990).

Nelle acque che formano il *plume* prevalgono le forme ossidate dell'azoto (soprattutto nitrato), mentre nelle acque segregate del fondo sono in maggioranza le forme ridotte, come l'azoto ammoniacale (Franco, 1983).

In inverno si hanno elevato apporto di nutrienti dal Po e scarsa assimilazione del fitoplancton. Al largo, dove il rimescolamento per l'instabilità della colonna d'acqua impedisce una netta stratificazione termalina, i nutrienti vengono prodotti principalmente da batteri eterotrofi e derivano anche dall'apporto di masse d'acqua provenienti da sud.

In questo caso la concentrazione di azoto, fosforo e silice sono maggiori rispetto a quelli riscontrati nelle acque dolci provenienti dalla regione padana (Franco, 1983).

Essendoci un'elevata presenza di ossigeno disciolto in queste zone e in questa stagione prevalgono le forme ossidate dei nutrienti rispetto a quelle ridotte.

1.1.5.1 Azoto nitrico (N-NO₃)

L'Azoto nitrico rappresenta una delle componenti solubili dell'azoto ed è la forma che in quest'area incide maggiormente sul DIN e la sua concentrazione dipende principalmente dalla portata del fiume Po.

Dai valori medi stagionali di nitrati (riportati nei rapporti annuali di ARPA Emilia-Romagna) su campioni raccolti lungo la costa emiliano romagnola che si estende per 130 Km dal Po di Goro al porto Canale di Cattolica (Figura 3), si evidenzia una concentrazione maggiore di nitrati in inverno e primavera e minore in estate.

Il calo estivo avviene in corrispondenza di una diminuzione di portata del bacino padano e questa relazione fra calo di portata e diminuzione di NO₃ è particolarmente evidente dai dati raccolti nel 2003, anno nel quale si ha avuto prolungata siccità nei mesi estivi.

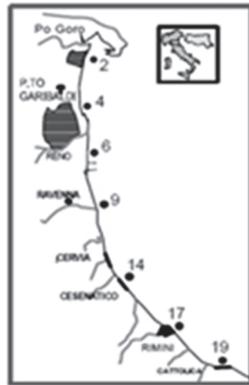


Figura 3: stazioni di monitoraggio lungo la costa emiliano-romagnola.

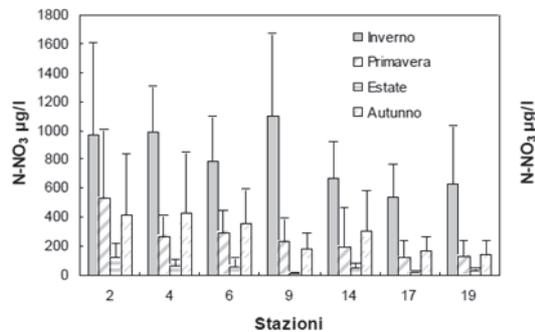


Figura 4: andamenti stagionali delle medie delle concentrazioni dei nitrati lungo la costa emiliano-romagnola per l'anno 2011 (ARPA 2012).

Dai dati raccolti dalla Struttura Oceanografica Daphne (Arpa Emilia-Romagna) è visibile inoltre un trend di diminuzione nord-sud dei nitrati (con eccezione della stazione 9) (Figura 4) e questo conferma la maggiore sensibilità della zona settentrionale agli apporti del bacino padano.

Questa situazione tende in generale a presentarsi sia lungo la costa che al largo, ma nella zona centro-meridionale (stazioni da Cesenatico a Cattolica) si ha una diminuzione di azoto nitrico allontanandosi dalla costa.

Le portate del fiume Po vanno quindi a determinare una maggior variabilità nella concentrazione di NO_3 , soprattutto in superficie, mentre le acque degli strati sul fondo rimangono sempre omogenee e con valori minimi.

1.1.5.2 *Azoto nitroso (N-NO₂)*

Un'altra componente solubile dell'azoto, presente a minori concentrazioni, è l'azoto nitroso il cui andamento temporale presenta variazioni analoghe a quello nitrico e quindi correlabili alle portate fluviali.

Lungo la costa emiliano-romagnola le fluttuazioni superficiali sono più marcate nelle zone settentrionali, mentre in quelle meridionali i valori tendono ad essere più contenuti e questo è dovuto alla influenza delle acque dolci provenienti dal fiume Po.

Anche in questo caso dai dati annualmente riportati da ARPA Emilia-Romagna si conferma il trend nord-sud con concentrazioni maggiori in inverno; è inoltre visibile una maggiore variabilità di concentrazione nelle acque superficiali rispetto a quelle del fondo che si mantengono più omogenee.

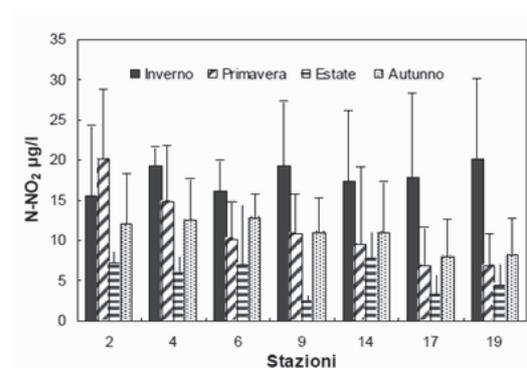


Figura 5: andamenti stagionali delle medie delle concentrazioni dei nitriti lungo la costa emiliano-romagnola per l'anno 2011 (ARPA 2012).

1.1.5.3 *Azoto ammoniacale (N-NH₃)*

L'azoto ammoniacale rappresenta un'altra forma solubile dell'azoto. La sua presenza nelle acque superficiali è normalmente di origine fluviale ed è legata anche all'immissione di reflui generati dagli insediamenti urbani costieri.

Dai dati raccolti dalla Struttura Oceanografica Daphne è visibile una diminuzione della concentrazione di questo componente azotato spostandosi dalla costa verso il mare aperto (Figura 6).

Nelle acque di fondo, inoltre, le concentrazioni dell'ammonio tendono a superare quelle presenti nelle acque superficiali e questo è dovuto alla mineralizzazione della sostanza organica che avviene sul fondo, operazione che va a rendere solubile l' $N-NH_3$ nella colonna d'acqua.

Stagionalmente le fluttuazioni di questo elemento risultano molto variabili e collegate all'influenza diretta del territorio sull'ambiente marino (Figura 7).

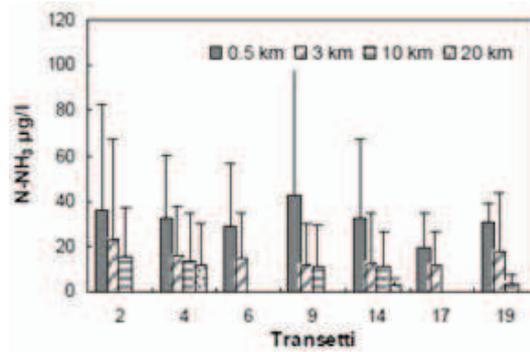


Figura 6: andamenti delle medie delle concentrazioni dell'ammonio lungo transetti nella costa emiliano-romagnola per l'anno 2011 (ARPA 2012).

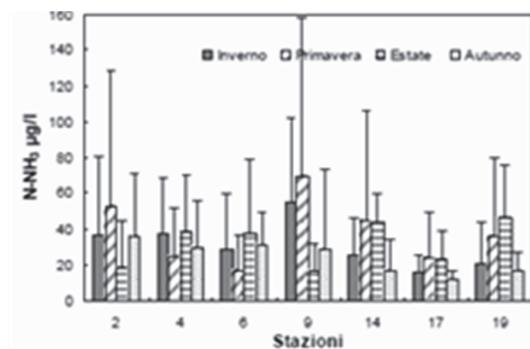


Figura 7: andamenti stagionali delle medie delle concentrazioni dell'ammonio lungo la costa emiliano-romagnola per l'anno 2011 (ARPA 2012).

1.1.5.4 Fosforo reattivo (P-PO₄)

L'andamento della concentrazione del fosforo reattivo, sempre dai rapporti di ARPA Emilia-Romagna, mostra nell'area di costa emiliano-romagnola un'elevata variabilità soprattutto nell'area più settentrionale, strettamente correlata agli apporti dei bacini fluviali, in particolare dal bacino padano che, come più volte sottolineato, contribuisce a condizionare la qualità ambientale dell'ecosistema marino in questa zona.

L'andamento stagionale delle concentrazioni di questo nutriente registra valori massimi in autunno, mentre i valori minimi si riscontrano in estate (Figura 8).

I fosfati mostrano inoltre un trend di crescita avvicinandosi da largo a costa (Figura 9).

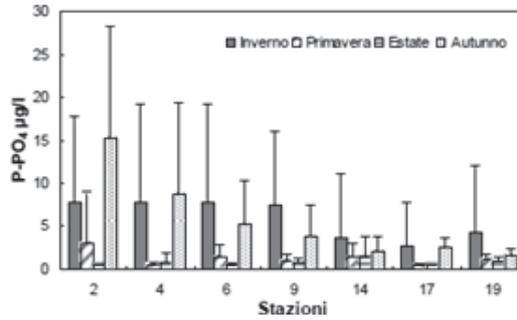


Figura 8: andamenti stagionali delle medie delle concentrazioni dei fosfati lungo la costa emiliano-romagnola per l'anno 2011 (ARPA 2012).

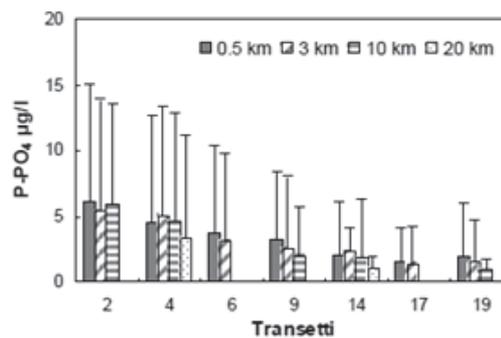


Figura 9: andamenti delle medie delle concentrazioni dei fosfati lungo transetti nella costa emiliano-romagnola per l'anno 2011 (ARPA 2012).

1.1.5.5 *Silice reattiva (Si-SiO₂)*

Anche le concentrazioni di Si-SO₂, dai monitoraggi eseguiti dalla Struttura Oceanografica Daphne, mostrano un trend di crescita, nelle acque superficiali, nord-sud e avvicinandosi alla zona di costa, in linea con l'andamento degli altri nutrienti.

La diminuzione di concentrazione della silice allontanandosi dalla terra ferma (Figura 10) nelle acque superficiali è maggiormente evidente nelle aree meridionali, mentre in quelle settentrionali la diminuzione è minima (se non assente) e questo è dovuto all'influenza degli apporti padani che insistono su queste zone.

Le acque superficiali a ridosso del delta padano si presentano ricche di silicati soprattutto in primavera e autunno e l'afflusso di acque dolci rende maggiore la variabilità di questo parametro nell'area settentrionale.

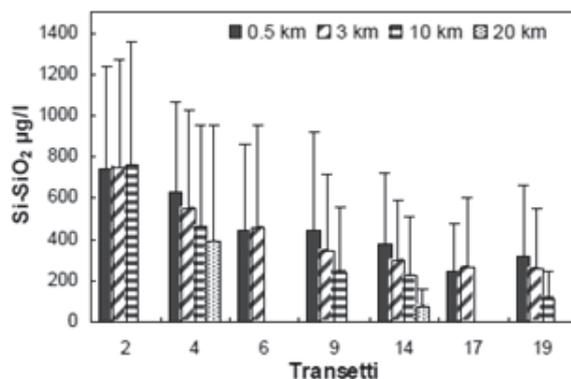


Figura 10: andamenti delle medie delle concentrazioni della silice lungo transetti nella costa emiliano-romagnola per l'anno 2011 (ARPA 2012).

1.2 Marine Strategy

La Direttiva europea 2008/56/CE, Marine Strategy Framework Directive (MSFD), recepita in Italia con il D. Lgs 190/10 (<http://www.camera.it/parlam/leggi/deleghe/10190dl.htm>), istituisce un quadro all'interno del quale gli stati membri devono adottare le misure necessarie per mantenere o conseguire un buono stato ecologico dell'ambiente marino entro il 2020 (ARPA 2013).

Il perseguimento o il mantenimento di tale obiettivo deve avvenire, secondo la MSFD, attraverso l'elaborazione e l'attuazione di strategie di gestione integrata (GIZ) finalizzate a: proteggere, preservare e prevenire il degrado dell'ambiente marino riducendo inoltre gli apporti di inquinanti e garantendo un uso sostenibile delle risorse marine (Figura 11).

Il buono stato ecologico deve essere determinato a livello regionale (o sottoregionale) sulla base di "descrittori qualitativi" (Figura 12) definiti a loro volta da ben precisi indicatori.



Figura 11: obiettivi descritti nella Marine Strategy.



Figura 12: descrittori qualitativi elencati nella Marine Strategy.

1.2.1 Descrittore 1: biodiversità

Tra gli undici descrittori qualitativi, per i quali deve essere raggiunto il Buono Stato Ambientale (*Good Environmental Status* o GES), il primo tratta la biodiversità.

La prima definizione di biodiversità fu coniata durante la conferenza delle Nazioni Unite sull'ambiente e sullo sviluppo, tenutasi a Rio de Janeiro nel 1992 (art. 2 della Convenzione sulla diversità biologica): "Per diversità biologica si intende la variabilità degli organismi viventi, degli ecosistemi terrestri e acquatici e dei complessi ecologici che essi costituiscono; la diversità biologica comprende la diversità intraspecifica, interspecifica e degli ecosistemi" (<http://bch.miniambiente.it/IT/Presentazione/convenzione>).

La biodiversità intraspecifica riguarda la variabilità a livello genetico che esiste tra membri appartenenti alla stessa specie, l'interspecifica considera la varietà delle specie presenti sul nostro pianeta e, infine, la biodiversità degli ecosistemi comprende tutte quelle comunità biologiche che interagiscono tra loro e con l'ambiente fisico circostante.

In mare la biodiversità è minacciata da più fattori come: *overfishing*, degrado degli habitat, inquinamento, eutrofizzazione, bioinvasioni di specie non-indigene e dall'impatto dei cambiamenti climatici. Per proteggere la diversità di questo ambiente la *Marine Strategy* va a valutare gli effetti negativi dei fattori precedentemente elencati imponendo la raccolta di informazioni su questi (ISPRA, 2013).

Le informazioni, al fine di considerare le forti interdipendenze, devono essere gestite in modo integrato e andranno a supportare le decisioni che lo Stato dovrà prendere per raggiungere il GES; dovranno essere relative a tre, ben distinte, dimensioni: ambientale, economica e sociale.

La Direttiva Quadro per la Strategia Marina tramite il Descrittore 1 asserisce che: “La biodiversità è mantenuta. La qualità e la presenza di habitat nonché la distribuzione e l’abbondanza delle specie sono in linea con le prevalenti condizioni fisiografiche, geografiche e climatiche” e identifica ufficialmente tutta una serie di “caratteristiche” che devono essere prese in considerazione dagli Stati membri, sia per quanto riguarda i “tipi di habitat” che le “caratteristiche biologiche” (Tabella 1) (ISPRA, 2013).

Tabella 1: tabella 1 dell’Allegato III della Marine Strategy.
(https://www.assembla.com/spaces/RetePesca/wiki/Gruppo_di_Lavoro_Marine_Strategy_MIPAAF).

Tipi di habitat	<ul style="list-style-type: none"> — Tipofi di habitat predominante/i sul fondo marino e nella colonna d’acqua con descrizione delle caratteristiche fisico-chimiche tipiche, quali profondità, regime delle temperature dell’acqua, correnti e altra circolazione delle masse d’acqua, salinità, struttura e composizione dei substrati del fondo marino — Identificazione e mappatura di tipi di habitat particolari, segnatamente quelli riconosciuti o identificati nell’ambito della legislazione comunitaria (direttive Habitat e Uccelli selvatici) o delle convenzioni internazionali come habitat di particolare interesse sotto il profilo scientifico o della biodiversità — Habitat in zone che, per le loro caratteristiche, ubicazione o importanza strategica, meritano una menzione particolare. Tra queste possono figurare aree soggette a pressioni intense o specifiche oppure aree che meritano un regime di protezione specifico
Caratteristiche biologiche	<ul style="list-style-type: none"> — Descrizione delle comunità biologiche associate agli habitat predominanti sul fondo marino e nella colonna d’acqua. Sono comprese informazioni sulle comunità di fitoplancton e zooplancton, comprese le specie e la variabilità stagionale e geografica — Informazioni su angiosperme, macrofite e invertebrati del fondo marino, in particolare la composizione delle specie, la biomassa e la variabilità annuale/stagionale — Informazioni sulla struttura delle popolazioni ittiche, compresa l’abbondanza, la distribuzione e la struttura per età/dimensione delle popolazioni — Descrizione della dinamica delle popolazioni, dell’area di distribuzione naturale ed effettiva e dello stato delle specie di mammiferi e rettili marini presenti nella regione o sottoregione marina — Descrizione della dinamica delle popolazioni, dell’area di distribuzione naturale ed effettiva e dello stato delle specie di uccelli marini presenti nella regione o sottoregione marina — Descrizione della dinamica delle popolazioni, dell’area di distribuzione naturale ed effettiva e dello stato delle altre specie presenti nella regione o sottoregione marina e contemplate dalla legislazione comunitaria o da accordi internazionali — Inventario relativo alla presenza, all’abbondanza e alla distribuzione territoriale di specie esotiche, non indigene o, se del caso, di varietà geneticamente distinte di specie indigene, presenti nella regione o sottoregione marina

La determinazione del GES per il Descrittore 1, secondo la MSFD, deve essere affrontata facendo riferimento a 7 criteri delineati dai relativi indicatori.

Quest’ultimi sono stati scelti sulla base delle relazioni tra l’impatto delle attività umane ed il funzionamento dell’ecosistema marino, partendo tuttavia dal presupposto che esistono ancora oggi importanti *gap* conoscitivi sui rapporti tra i valori misurati per le diverse attività/pressioni considerate e gli effetti che esse provocano sugli ecosistemi.

I sette criteri sono (ISPRA 2013):

- 1) *Species distribution*;
- 2) *Population size*;
- 3) *Population condition*;
- 4) *Habitat distribution*;

- 5) *Habitat extent*;
- 6) *Habitat condition*;
- 7) *Ecosystem structure*.

Per ognuno di questi, in seguito alla valutazione iniziale (art. 8, D.Lgs. 190/2010), sono stati scelti gli indicatori appropriati (Tabella 2). (<http://www.camera.it/parlam/leggi/deleghe/10190dl.htm>).

Tabella 2: Schema di sintesi dei criteri e dei relativi indicatori considerati per la determinazione del GES per il Descrittore 1.

Criteria	Indicatore primario
1.1 Species distribution	1.1.1 Distributional range
	1.1.2 Distributional pattern within range, where appropriate
	1.1.3 Area covered by the species (for sessile/benthic species)
1.2 Population size	1.2.1 Population abundance and/or biomass, as appropriate
1.3 Population condition	1.3.1 Population demographic characteristics (e.g. Body size or age class structure, sex ratio, fecundity rates, survival/mortality rates)
	1.3.2 Population genetic structure, where appropriate
1.4 Habitat distribution	1.4.1 Distributional range
	1.4.2 Distributional pattern
1.5 Habitat extent	1.5.1 Habitat area
	1.5.2 Habitat volume, where relevant
1.6 Habitat condition	1.6.1 Condition of the typical species and communities
	1.6.2 Relative abundance and/or biomass, as appropriate
	1.6.3 Physical, hydrological and chemical conditions
1.7 Ecosystem structure	1.7.1 Composition and relative proportions of ecosystem components (habitats & species)

Solo quattro dei sette criteri sono stati scelti per determinare il buono stato ecologico per il Mar Mediterraneo: *Population size*, *Population condition*, *Habitat extent* e *Habitat condition*.

Per quanto riguarda gli habitat pelagici, si segnala che gli indici proposti per la valutazione/quantificazione del GES, sono basati fundamentalmente sulla composizione specifica e sull'abbondanza del Plancton (ISPRA 2013), in particolare, sono stati proposti:

a) per il Fitoplancton

- Composizione specifica e abbondanze (Indici di diversità);
- Successione dei popolamenti algali;
- Frequenza delle fioriture;

b) per lo Zooplancton

- Composizione specifica e abbondanze (Indici di diversità);

- Variazione rapporto tra gruppi funzionali definiti (copepodi grande taglia/copepodi piccola taglia; meroplancton/oloplancton; erbivori/non erbivori);
- Identificazione di gruppi o specie indicatrici (i.e. incremento biomassa gelatinosi, incremento specie piccola taglia).

1.2.2 Descrittore 5: eutrofizzazione

Tra gli undici descrittori qualitativi, per i quali deve essere raggiunto il Buono Stato Ambientale (*Good Environmental Status* o GES), il 5 tratta l'eutrofizzazione.

Il termine "eutrofizzazione", dal greco *eutrophia* (eu = buona, trophòs = nutrimento), in origine indicava, in accordo con la sua etimologia, una condizione di ricchezza in sostanze nutritive (nitrati e fosfati) in ambiente acquatico; oggi viene invece usato per indicare le fasi successive del processo biologico conseguente a tale arricchimento e cioè l'abnorme sviluppo di alghe con conseguenze spesso deleterie per l'ambiente.

In ambiente marino il fenomeno dell'eutrofizzazione è dovuto ad un eccesso di nutrienti portati a mare soprattutto grazie agli apporti fluviali. Le principali fonti di generazione sono costituite dal settore agro-zootecnico e da quello civile (insediamenti urbani).

Elevate concentrazioni di sali di azoto e di fosforo immessi nelle acque favoriscono un abnorme sviluppo della concentrazione di microalghe (fitoplancton) normalmente presenti, che possono raggiungere anche milioni di cellule per litro.

Il fitoplancton è il nutrimento dei consumatori primari (il più importante dei quali in mare è lo zooplancton), perciò questa enorme biomassa fitoplanctonica non è un problema fintanto che viene consumata. Anzi, nella prima fase del processo di eutrofizzazione, l'incremento microalgale, ha effetti positivi sulla comunità acquatica in quanto provoca un aumento proporzionale di biomassa nei livelli trofici successivi. Tuttavia la crescita del popolamento fitoplanctonico, non più limitata dalla disponibilità di nutrienti, assume un carattere incontrollato e non è più controbilanciata dal consumo zooplanctonico. Il fitoplancton può raggiungere uno sviluppo tale da limitare la trasparenza delle acque a pochi metri di profondità riducendo lo strato d'acqua interessato dalla fotosintesi.

L'eccessivo apporto di nutrienti dai fiumi o dalle acque di scolo sotterranee è una condizione necessaria ma non sufficiente per determinare i *bloom* microalgali. Occorre, infatti, che si manifestino condizioni di temperature ideali e di stabilità marina (assenza di moto ondoso e correnti marine deboli) per facilitare il processo.

Le conseguenze di queste abnormi fioriture si fanno sentire soprattutto nei periodi estivi e autunnali, quando in contemporanea ad elevate presenze di fitoplancton, si associano elevate temperature delle acque e mare calmo.

La frazione microalgale che non è stata predata, terminato il ciclo vitale, muore e si deposita sul fondo. Avviene, quindi, una sedimentazione di enormi masse di sostanza organica che viene decomposta da batteri aerobi, che sottraggono ossigeno alle acque di fondo. Si verificano, così, fenomeni di ipossia (scarsità di ossigeno) o, nei casi peggiori di anossia (assenza di ossigeno) a livello dei fondali.

La mancanza di ossigeno nelle acque di fondo determina modificazioni a livello dell'ecosistema bentonico, agendo soprattutto sugli organismi sedentari (Figura 13).

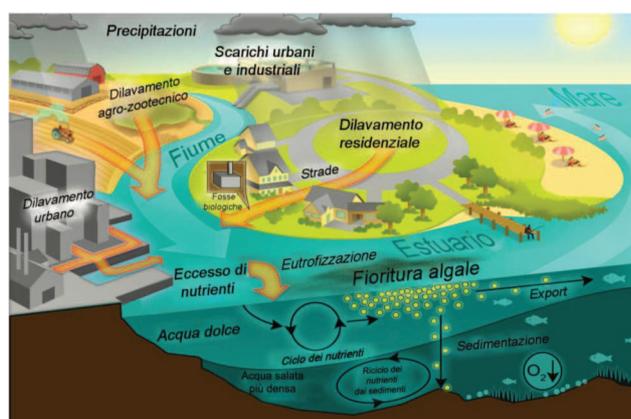


Figura 13: processo di eutrofizzazione.

Date le conseguenze negative sullo stato ambientale provocate dall'eutrofizzazione, la *Marine Strategy* tramite il Descrittore 5 asserisce che “deve essere ridotta al minimo l'eutrofizzazione di origine umana, in particolare i suoi effetti negativi, come perdite di biodiversità, degrado dell'ecosistema, proliferazione dannosa di alghe e carenza di ossigeno nelle acque di fondo” (ISPRA 2013).

La strategia adottata in Italia prevede che per valutare lo stato di eutrofizzazione vengano considerati come criteri i livelli dei nutrienti e gli effetti primari e secondari causati dal loro aumento. Questo perché elevate concentrazioni di nutrienti da sole non sono indicative di un cattivo stato ambientale, se non accompagnate da effetti negativi sull'ambiente marino (ISPRA 2013).

I criteri considerati vengono descritti a loro volta da appropriati indicatori, ad esempio il livello di nutrienti nella colonna d'acqua è definito dalla concentrazione e dal rapporto tra loro (ISPRA 2013) (Tabella 3).

Affinché venga raggiunto il GES per il descrittore 5, almeno due dei tre criteri devono soddisfare i requisiti fissati per ciascun indicatore (ISPRA 2013).

Tabella 3: schema di sintesi dei criteri e dei relativi indicatori considerati per la determinazione del GES per il Descrittore 5.

CRITERI	INDICATORI
Livello dei nutrienti	Concentrazione di nutrienti nella colonna d'acqua.
	Rapporto dei nutrienti (silicio, azoto e fosforo).
Effetti diretti dell'arricchimento in nutrienti	Concentrazione di clorofilla nella colonna d'acqua.
	Trasparenza dell'acqua legata all'aumento delle alghe in sospensione.
	Abbondanza di macroalghe opportuniste.
Effetti indiretti dell'arricchimento in nutrienti	Cambiamento nella composizione in specie della flora, come per esempio il rapporto fra diatomee e flagellati, fra specie bentoniche e pelagiche o comparsa di fioriture algali nocive o tossiche causate da attività antropiche.
	Abbondanza di alghe e angiosperme marine perenni (es. <i>Zostera marina</i> e <i>Posidonia oceanica</i>) che subiscono un impatto a causa di una ridotta trasparenza dell'acqua.
	Ossigeno disciolto, ossia cambiamenti dovuti ad un aumento della decomposizione di sostanza organica e dell'estensione dell'area interessata.

La Direttiva ha suddiviso le acque marine europee in 4 regioni: Mar Baltico, Oceano Atlantico nordorientale, Mar Mediterraneo e Mar Nero, e per alcune di queste ha provveduto ad un'ulteriore suddivisione individuando delle sotto-regioni.

Nel Mediterraneo sono state individuate tre sub-regioni:

- a) il Mediterraneo occidentale
- b) il Mar Adriatico
- c) il Mar Ionio e Mediterraneo centrale

Il Mar Adriatico nella regione settentrionale racchiude le zone prospicienti al delta del Po e la costa emiliano-romagnola, aree riconosciute a livello europeo come maggiormente sensibili al fenomeno dell'eutrofizzazione (ISPRA 2013).

Nonostante il quadro generale degli ultimi 10 anni evidenzia una riduzione del livello trofico dell'Alto Adriatico, permangono episodi di intensi *bloom* microalgali con ipossie/anossie nelle acque di fondo. Tutto questo viene innescato e sostenuto prevalentemente dagli apporti di nutrienti provenienti dal bacino padano (ISPRA 2013).

Oggigiorno non esistono ancora i valori soglia degli indicatori per valutare il buono stato ecologico secondo il livello di eutrofizzazione poiché i dati attualmente disponibili, raccolti per la valutazione iniziale, non sono stati considerati sufficienti ed adeguati a pervenire ad una definizione quantitativa del GES, che sarà effettuata nel 2018.

Il Paese dovrà quindi impegnarsi, entro tale data, a raccogliere dati ed informazioni quantitative relativamente agli indicatori selezionati, attraverso opportuni programmi di monitoraggio, in modo da definire, nel 2018, i valori soglia.

1.2.3 Il monitoraggio nella costa emiliano-romagnola

Dalla necessità di raggiungere un Buono Stato Ambientale e di individuare i valori soglia per gli indicatori che descrivono il livello di eutrofizzazione (Descrittore 5), nel rispetto della *Marine Strategy*, scaturisce l'importanza di adottare un'efficiente rete di monitoraggio.

La costa emiliano-romagnola viene già monitorata dal 1978, sulla base delle direttive indicate nella L.R. 39/78, dalla Struttura Oceanografica Daphne di Arpa Emilia-Romagna (ARPA 2003).

Il patrimonio di dati di monitoraggio ottenuto dalla fine degli anni 70 fino ad oggi permette di conoscere le dinamiche presenti nell'area costiera emiliano-romagnola e rappresenta la base di razionali strategie di intervento e di difesa al fine di mitigare ricorrenti fenomenologie che possono generare processi indesiderati come casi acuti di eutrofizzazione (ARPA 2013).

Il recepimento in Italia della *Marine Strategy* con il D.Lgs. 190/2010 e il conseguente coinvolgimento delle Regioni ha aumentato l'impegno della Struttura Oceanografica Daphne; la quale, nel rispetto del decreto, dovrà entro il 2016 rendere operative le misure per raggiungere il buono stato ecologico.

Il piano di monitoraggio applicato alla costa emiliano-romagnola (L.R. 39/78, L.R. 3/99 e L.R. 44/95) consta di 34 stazioni che si distribuiscono tra Lido di Volano (FE) e Cattolica (RN) e distano dai 0,5-20 Km dalla linea di costa (ARPA 2012) (Figure 14 e 15) .

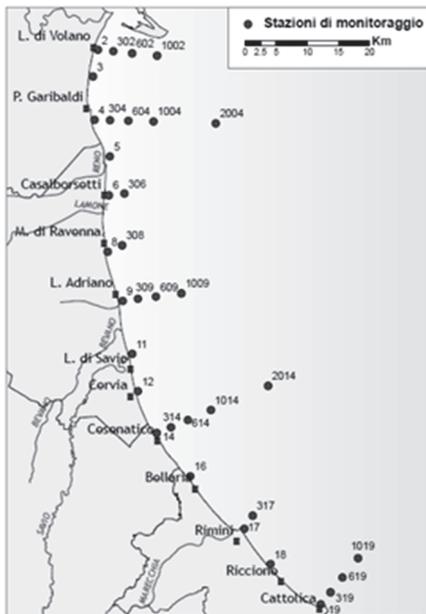


Figura 14: stazioni di monitoraggio lungo la costa emiliano-romagnola.

Codice Stazione	Località	Prof. metri	Dist. km	LAT WGS84	LOK WGS84
2	Lido di Volano	3.9	0.5	44.457656	12.155128
3	Lido Nazioni	5.1	0.5	44.454495	12.150388
4	Porto Garibaldi	3.7	0.5	44.396873	12.154228
5	Foce Reno	5.2	0.5	44.365613	12.174268
6	Casalborgorsetti	5.2	0.5	44.332012	12.174568
8	Marina di Ravenna	3.5	0.5	44.28299	12.175348
9	Lido Adriano	5.4	0.5	44.240749	12.195387
11	Lido di Savio	3.9	0.5	44.195268	12.208826
12	Cervia	3.5	0.5	44.162989	12.217405
14	Cesenatico	3.1	0.5	44.127226	12.241524
16	Bellaria	4.2	0.5	44.090626	12.283585
17	Rimini	4.3	0.5	44.046585	12.350548
18	Riccione	3.8	0.5	44.016584	12.38289
19	Cattolica	4.1	0.5	43.582924	12.444691
302	Lido di Volano	6.7	3	44.456876	12.174088
304	Porto Garibaldi	9.1	3	44.396934	12.172888
306	Casalborgorsetti	10.2	3	44.334052	12.193348
308	Marina di Ravenna	8.1	3	44.28899	12.192627
309	Lido Adriano	9.4	3	44.243089	12.213866
314	Cesenatico	8.3	3	44.132626	12.258444
317	Rimini	9.9	3	44.058165	12.359907
319	Cattolica	11	3	43.593664	12.455912
602	Lido di Volano	7.8	6	44.455737	12.196888
604	Porto Garibaldi	12	6	44.397054	12.194968
609	Lido Adriano	11.4	6	44.24549	12.235585
614	Cesenatico	10.2	6	44.139407	12.278603
619	Cattolica	12.1	6	44.006625	12.469712
1002	Lido di Volano	10.1	10	44.454357	12.227489
1004	Porto Garibaldi	14.8	10	44.397175	12.225689
1009	Lido Adriano	15.1	10	44.249031	12.265945
1014	Cesenatico	12.3	10	44.148588	12.305963
1019	Cattolica	13.6	10	44.023846	12.487892
2004	Porto Garibaldi	26.5	20	44.397297	12.301289
2014	Cesenatico	22.0	20	44.17109	12.373884

Figura 15: profondità, distanza dalla costa e coordinate delle stazioni di monitoraggio.

La profondità del fondale osservato va da un minimo di circa 2 metri nelle stazioni più vicino alla costa, fino a una profondità massima di circa 27 metri in quelle più offshore.

La distribuzione spaziale delle stazioni mediante transetti, ortogonali alla costa, all'interno dell'area di campionamento permette di ottenere una valutazione sufficientemente precisa dell'ampiezza e dell'impatto di eventuali *bloom* algali (ARPA 2012).

Tale rete di monitoraggio applicata alla costa emiliano-romagnola ha come finalità di:

- definire l'intensità e l'estensione di eventuali fioriture di fitoplancton;
- riconoscere e definire le specie fitoplanctoniche che sostengono le fioriture;
- individuare gli effetti dovuti alle diverse fasi del fenomeno eutrofico (es. colorazione anomala dell'acqua) ed individuarne gli eventi scatenanti;
- determinare la concentrazione dei nutrienti, in particolare azoto e fosforo, la loro distribuzione spaziale e temporale ed individuare il fattore limitante alla crescita microalgale;
- seguire gli andamenti temporali e spaziali dei principali parametri fisico-chimici in relazione ai fenomeni eutrofici e alle condizioni meteo-marine, sia nelle acque superficiali che lungo la colonna d'acqua;

- valutare l'efficacia di eventuali interventi di risanamento eseguiti a breve e a lungo termine per la salvaguardia degli ecosistemi e per la tutela delle risorse;
- implementare l'archivio di dati e utilizzare le informazioni raccolte per applicare modelli previsionali a supporto delle attività di controllo e gestione.

Con l'analisi quali-quantitativa del fitoplancton, svolta in associazione alle misurazioni chimico-fisiche della colonna d'acqua, viene valutata l'abbondanza (cell/L) delle diverse specie di Diatomee, Dinoficee e di Altri fitoflagellati.

Vengono inoltre segnalati gli eventi di fioriture di specie potenzialmente tossiche o nocive (ARPA, 2012).

1.3 Harmful Algal Bloom (HABs)

La proliferazione di microalghe in acque costiere fino al raggiungimento di densità molto elevate (superiori a decine di milioni di cellule per litro) è un fenomeno che sembra essersi intensificato negli ultimi decenni, sia per la maggiore frequenza temporale, sia per la maggiore diffusione geografica, in quanto queste fioriture espanse non sono più limitate alle sole zone tropicali (Anderson, 1989; Smayda, 1989; Hallagraeff, 1993).

Queste fioriture sono eventi che in natura si verificano sempre (Hallagraeff, 2003) ma negli ultimi tempi, in relazione all'incremento delle loro segnalazioni ed alle diverse tipologie di danni causati, hanno fortemente attirato l'attenzione del mondo scientifico.

Le modificazioni dello strato trofico, dovute alle pressioni antropiche esercitate direttamente sugli ecosistemi marini costieri e indirettamente, attraverso l'uso dei territori dei bacini idrografici, aiutano a spiegare almeno in parte l'espansione dei *bloom* microalgali.

Recentemente è stato raggiunto un accordo scientifico sul ruolo favorente questi fenomeni svolto dal cambiamento dei rapporti stechiometrici dei nutrienti (Anderson *et al.*, 2002; Heisler *et al.*, 2008), dalle modificazioni dell'idrodinamismo dei sistemi costieri, in particolare con la creazione di aree di confinamento (Vila *et al.*, 2001; Masò e Garcés, 2006).

L'aumento di fioriture microalgali sembra inoltre essere connesso anche con altri fattori, come l'introduzione di nuove specie in un'area geografica (anche con la mediazione dell'uomo) (Hallagraeff e Bolch 1992), il sovrasfruttamento delle risorse marine,

soprattutto con la pesca (Vasas *et al.*, 2001; Walsh *et al.*, 2011), ed i possibili effetti dei cambiamenti climatici indotti dalle attività umane (Hallagraeff, 2010).

Dell'incremento dei *bloom* microalgali sembrerebbero quindi responsabili più cause, capaci di agire contemporaneamente, ed i singoli effetti sono difficilmente scorporabili gli uni dagli altri. Ma l'intensificazione di questo fenomeno potrebbe essere in gran parte anche il risultato del maggior interesse scientifico che parallelamente si è sviluppato a livello mondiale, con l'aumento delle conoscenze, delle attività di monitoraggio, delle capacità di studio e, conseguentemente, anche delle segnalazioni (Zingone, 2010).

Il fitoplancton rappresenta la principale fonte di cibo per molti organismi marini di interesse anche commerciale, come i molluschi bivalvi (ostriche, mitili, cappellette, ecc.), le larve di crostacei e alcune specie di pesci; perciò in molti casi i fenomeni di fioritura (milioni di cellule/L) rappresentano un beneficio per la pesca e per l'acquacoltura. Ma in alcune situazioni le "esplosioni microalgali" possono avere degli effetti negativi causando delle perdite economiche alle attività umane compreso il turismo, creando inoltre un impatto sia sulla salute ambientale, con danni anche gravi all'ecosistema, ma anche su quella dell'uomo.

Fra le 5000 specie di fitoplancton marino (Sournia *et al.*, 1991) circa 300 attualmente vengono ritenute responsabili, se presenti in elevata concentrazione, della colorazione dell'acqua (*red tides*), mentre solo circa 80 specie hanno la capacità di produrre potenti tossine, che accumulandosi e modificandosi lungo la catena alimentare, possono nuocere alla salute dei pesci e dell'uomo.

Le fioriture prodotte da queste microalghe dannose e/o tossiche vengono denominate dalla comunità scientifica con il termine "*Harmful Algal Blooms*" (HABs) (Anderson, 1994) (Hallagraeff, 1995).

Gli HABs coinvolgono circa il 7% delle specie marine conosciute, indicate come *Harmful Algal Species* (HAS) e di queste il 75% è rappresentato dalle Dinofitee (Smayda, 1997) e il 40% è in grado di produrre tossine (Zingone e Enevoldsen, 2000).

Le conseguenze degli HABs si manifestano anche con danni agli ecosistemi, con riduzione della biodiversità ed alterazione delle funzioni, poiché le HAS tossiche possono essere anche responsabili di massicce morie di pesci, sia in condizioni d'allevamento che in natura, e di episodi di mortalità di mammiferi marini, uccelli e altri organismi acquatici (Landsberg, 2002; Landsberg *et al.*, 2009).

HAS non tossiche (*noxious*) sono invece capaci di sviluppare biomasse talmente espanse da provocare drammatiche riduzioni di ossigeno (in seguito alla loro decomposizione),

produzione di mucillagini, occlusione o lesioni alle branchie con spine ed altri processi cellulari, con conseguenti estese morie. Anche lo stesso ombreggiamento del fondo, dovuto alle fioriture in superficie, può seriamente influenzare la vegetazione bentonica e l'insieme delle componenti biologiche a questa legate, causando sia danni all'ambiente che perdite economiche (Gobler *et al.*, 2005).

Le HABs possono inoltre compromettere anche il carattere estetico del paesaggio, producendo mucillagini, schiume e modificando il colore dell'acqua (discolorazione) (Zingone e Enevoldsen, 2000) con conseguenze gravi sul turismo costiero (Garcès *et al.*, 1999; Giacobbe *et al.*, 2007).

Questi fenomeni di fioriture microalgali, a seconda degli effetti prodotti, possono essere classificati in (Andersen, 1996):

1. fioriture di specie che provocano soltanto una alterazione della colorazione dell'acqua (Figura 16) con diminuzione della visibilità e della qualità estetica, ed eventualmente morie di pesci e invertebrati acquatici a causa delle conseguenti condizioni di ipossia. Appartengono a questo gruppo soprattutto specie di Dinoficee (es. *Noctiluca scintillans* (Figura 17)) e Diatomee;



Figura 16: colorazione dell'acqua causata da una fioritura di *Noctiluca scintillans*.



Figura 17: cellula di *Noctiluca scintillans* (Macartney) Kofoid et Swezy

2. fioriture di specie che producono potenti tossine che si accumulano nella catena alimentare che possono causare effetti vari nei consumatori secondari (uomo e animali superiori). Si tratta per lo più di Dinoficee appartenenti ai generi *Alexandrium* (Figura 18), *Gymnodinium*, *Dinophysis* (Figura 19), *Prorocentrum* e di Diatomee del genere *Pseudo-nitzschia*;

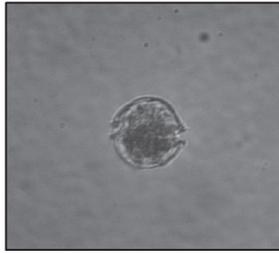


Figura 18: cellula di *Alexandrium minutum* Halim.

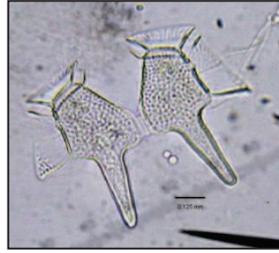


Figura 19: cellule di *Dinophysis caudata* Saville-Kent

3. fioriture di microalghe che, nella maggior parte dei casi, non sono tossiche per l'uomo ma risultano dannose in vario modo per pesci ed invertebrati. Esempi di queste specie sono: *Gyrodinium aureolum*, *Chaetoceros convolutus* (Figura 20), *Nodularia spumigena*, *Chattonella antiqua* (Andersen, 1996);

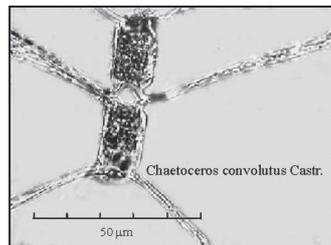


Figura 20: *Chaetoceros convolutus* Castracane.

4. Fioriture di specie produttrici di tossine che vengono trasportate nell'aerosol dall'area di fioritura fino alla costa. Quest'ultima tipologia di HAB può essere causata da una dinoficea bentonica di origine tropicale *Ostreopsis ovata* (Fukuyo) (Figura 21) la cui presenza è ormai documentata in tutto il Mar Mediterraneo (Aligizaki e Nikolaidis, 2006), compresi i mari Italiani (Congestri *et al.*, 2006).



Figura 21: cellula di *Ostreopsis ovata* Fukuyo.

1.3.1 Le HAS tossiche

Le biotossine prodotte dalle microalghe tossiche vengono accumulate negli animali filtratori e in altri *grazer* per poi raggiungere l'uomo o altri consumatori secondari attraverso la rete alimentare, dando luogo a sindromi acute e/o croniche, finanche la morte

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 biotossine, sintetizzate dalle HAS tossiche, possono essere suddivise in base alla loro solubilità in molecole idrosolubili e liposolubili; pur essendo un gruppo di composti strutturalmente diversi fra di loro, hanno alcune caratteristiche comuni: in genere sono resistenti al calore e stabili in ambiente acido (Poletti *et al.*, 2003).

Questo comporta un forte rischio per il consumo umano: la cottura dei prodotti contaminati e l'azione dei succhi gastrici (in fase digestiva), non riescono ad eliminare il rischio di intossicazione e queste molecole vengono così assorbite a livello intestinale.

A seconda della peculiare sintomatologia provocata le tossine fitoplanctoniche vengono classificate in sei sottogruppi (Poletti *et al.*, 2003) (Chen *et al.*, 2005):

- *Paralytic shellfish poisoning (PSP)*: sindrome paralitica;
- *Diarrhoetic shellfish poisoning (DSP)*: sindrome diarroica;
- *Neurotoxic shellfish poisoning (NSP)*: sindrome neurotossica;
- *Azaspiracid poisoning (AZP)*: sindrome da azaspiracido;
- *Amnesic shellfish poisoning (ASP)*: sindrome amnesica;
- *Ciguatera fish poisoning (CFP)*: sindrome della ciguatera;

In base alle caratteristiche chimiche delle molecole queste biotossine vengono invece raggruppate in 5 sottogruppi (Tubaro e Hungerford , 2007):

- Composti amminoacido-simili (acido domoico e analoghi);
- Derivati delle purine (saxitossina e gonyautossine);
- Imine cicliche (spiroolidi, gimnodimine, pinnatossina A);
- Polieteri lineari e macrocicli non contenenti azoto (acido okadaico e analoghi, pectenotossine, azaspiracido, primnesine);
- Polieteri trasfusi (brevetossine, yessotossine, ciguatossine)

Fra tutte le classi di microalghe le dinofitofite sono le principali produttrici di biotossine; per quanto riguarda le diatomee, ci sono riscontri solo per alcune specie appartenenti al genere *Pseudo-nitzschia*, oltre alle specie *Halamphora coffeaeformis* (Agardh) Levkov e *Nitzschia navis-varingica* Lundholm et Moestrup (IOC-UNESCO Taxonomic Reference List of Harmful Micro Algae: <http://www.marinespecies.org/hab/index.php>).

La sindrome paralitica (PSP) è causata principalmente dalla saxitossina (STX) e suoi derivati e tra gli organismi fitoplanctonici che la producono troviamo: nei mari tropicali la dinofitofita *Pyrodinium bahamense* Plate, mentre nel Mediterraneo l'origine di tale composto è da attribuire a diverse specie appartenenti al genere *Alexandrium*: *A. tamarense* (Lebour) Balech, *A. catenella* (Whedon et Kofoid) Balech, *A. fundyense* Balech, *A. minutum* Halim, e *A. balechii* (Steidinger) Taylor.

Un'altra specie implicata nella produzione di tossine di tipo paralitico è il *Gymnodinium catenatum* Graham, che è stato segnalato nel Tirreno, in Adriatico e nel Mar Egeo (Ade *et al.*, 2003).

La Saxitossina (STX) è una molecola di tipo idrosolubile, termostabile, stabile in ambiente acido ma non in quello alcalino. Questa molecola, come i suoi derivati, va a bloccare i canali del sodio delle cellule nervose legandosi a un recettore presente sulla membrana inibendo così la contrazione neuro-muscolare.

Nell'uomo i sintomi di questa sindrome compaiono 30 minuti dopo l'ingestione dei molluschi che ne sono il vettore e si manifestano con: parestesia di bocca, labbra, lingua e estremità degli arti; astenia muscolare; perdita di equilibrio; formicolio; sonnolenza; paralisi che parte dalle gambe e può colpire il sistema respiratorio. La PSP può essere

mortale portando all'arresto del sistema cardiocircolatorio e la dose mortale per l'uomo è di 1-2 mg di tossina.

Le biotossine responsabili della sindrome diarroica (DSP) sono: l'acido okadaico (prende il nome dalla spugna da cui è stato isolato per la prima volta *Halichondria okadae*), le dinophysitossine DTX1 e DTX2. Queste molecole sono liposolubili, termostabili e vanno a colpire il sistema gastrointestinale, inibendo due classi di proteino-fosfatasi seriniche e treoniniche. La sintomatologia comprende: nausea, vomito e diarrea. Il vettore è sempre rappresentato come nella PSP dai molluschi filtratori e l'incubazione può arrivare fino alle 12 ore.

Le molecole responsabili della DSP vengono sintetizzate principalmente dalla dinofitea bentonica epifita *Prorocentrum lima* (Ehrenberg) Stein e da diverse specie del genere *Dinophysis*.

Casi di DSP si sono verificati lungo le coste del Giappone, in Olanda, in Scandinavia e anche in Mediterraneo.

Nel 1989, lungo la costa emiliano-romagnola, ci fu un caso di intossicazione da acido okadaico e fu diagnosticata la presenza di 55 specie diverse di *Dinophysis*, ma di queste soltanto sei risultarono capaci di produrre la tossina: *D. acuminata* Claparède et Lachmann, *D. acuta* Ehrenberg, *D. fortii* Pavillard, *D. mitra* (Schütt) Abé (ora *Phalacroma mitra* Schütt), *D. rotundata* Claparède et Lachmann (ora *Phalacroma rotundatum* (Claparède et Lachmann) Kofoid & Michener), *D. tripos* Gourret. Queste sei specie si scoprì poi che erano diffuse anche nel Tirreno (Ade *et al.*, 2003).

Al gruppo delle biotossine che causano la DPS inizialmente erano state erroneamente inserite le yessotossine, delle quali si sa ancora poco a livello tossicologico ma sembra che agiscano nell'uomo a livello del cuore. Queste sono state rilevate per la prima volta lungo la costa dell'Emilia-Romagna nel 1995 e vengono prodotte principalmente da tre specie di Dinofitee: *Protoceratium reticulatum* (Claparède et Lachmann) Butschli (ora *Gonyaulax grindleyi* Reinecke), *Lingulodinium polyedrum* (Stein) Dodge (ex *Gonyaulax polyedra* Stein), (Satake *et al.* 1997) (Tubaro *et al.* 1998) e *Gonyaulax spinifera* (Claparède et Lachmann) Diesing.

La sindrome neurotossica (NSP) è causata invece dalle brevitossine, che nell'uomo provocano, in caso di ingestione di mitili contaminati, sintomi gastrointestinali e neurologici. Possono inoltre comparire irritazioni agli occhi e alle vie aeree se si entra in contatto con l'aerosol contenente cellule lisate (Whittle *et al.*, 2000).

Le brevitossine hanno una struttura chimica polieterica, sono liposolubili, con effetto emolitico e agiscono sulla permeabilità al sodio delle membrane mantenendo sempre aperti i canali voltaggio-dipendenti.

Queste molecole vengono prodotte principalmente dalle dinofitocofite del genere *Karenia*.

La specie *Karenia brevis* (Davis) G.Hansen e Ø.Moestrup, che durante le fioriture può raggiungere quantità di alcuni milioni di cellule per litro, è stata la causa delle maree rosse che si sono sviluppate nel Golfo del Messico, lungo le coste della Florida e in Carolina del Nord (USA). A queste HAB sono seguite estese morie di pesci e di altri organismi marini causate dalla capacità di questa microalga di colorare l'acqua in concomitanza alla produzione di tossine (Whittle *et al.*, 2000).

Fioriture di *K. brevis* sono state registrate anche in Spagna settentrionale, in Giappone e lungo la costa orientale del Mediterraneo, ma a queste non sono state associate morie di pesci e di altri animali (Whittle *et al.*, 2000).

La sindrome da azaspiracido (AZP) si manifesta nell'uomo con forti disturbi gastrointestinali, i vettori sono i mitili e il meccanismo d'azione non è ancora noto. L'azaspiracido è sintetizzato da piccole dinofitocofite appartenenti al genere *Azadinium*: *Azadinium spinosum* Elbrächter et Tillmann e *Azadinium poporum* Tillmann et Elbrächter, di cui normalmente si cibano gli organismi eterotrofi appartenenti al genere *Protoperdinium*.

La sindrome amnesica (ASP) è associabile alla produzione di acido domoico, molecola idrosolubile che va ad agire non solo sul sistema gastro-intestinale ma anche sull'ippocampo e sull'amigdala, dando così origine anche ad effetti neurotossici come: stato confusionale, disorientamento, perdita della memoria e coma nei casi più gravi.

I vettori di questa biotossina sono i molluschi bivalvi ma anche pesci planctofagi.

L'acido domoico viene sintetizzato dalle diatomee che appartengono al genere *Pseudo-nitzschia* (Whittle *et al.*, 2000). Varie specie di questa microalga, a partire dagli anni '90, sono state ritrovate in alto e medio Adriatico, ma le concentrazioni di acido domoico ritrovate nei mitili fino ad ora sono risultate sempre inferiori ai limiti di legge (Ade *et al.*, 2003; Pistocchi *et al.*, 2012).

La ciguatera è un'intossicazione causata dall'ingestione di molluschi e pesci contaminati. Le molecole responsabili di questa sindrome sono le ciguatossine (CTX) e le maitotossine (MTX). Le prime sono liposolubili e agiscono sui canali del sodio in neuroni e in cellule cardiache; le seconde sono idrosolubili e sono attivatori del canale del calcio.

L'intossicazione da CTX e MTX comporta: gastroenterite, prurito cutaneo, neuropatia periferica e disfunzioni del sistema nervoso centrale.

Queste molecole vengono prodotte dalla dinoficea *Gambierdiscus toxicus* Adachi Fukuyo e da altre dinoficee appartenenti ai generi: *Ostreopsis*, *Prorocentrum* e *Amphidinium* (Whittle *et al.*, 2000).

I *bloom* di *Ostreopsis* con produzione di biotossine, trasmesse all'uomo mediante l'inalazione di aerosol marino, sono comparsi recentemente nel Mediterraneo e rappresentano una nuova problematica da affrontare (Penna *et al.*, 2005; Mangialajo *et al.*, 2011).

La preoccupazione è nata dopo che a Genova (Liguria, Mar Tirreno), nel 2005, 200 persone mostrarono i sintomi dell'intossicazione. Queste avevano soggiornato in riva al mare o in zone adiacenti, senza immergersi in acqua e dovettero sottoporsi a appropriate cure mediche (Pistocchi *et al.*, 2012).

Per quanto riguarda il Mar Adriatico, nella regione meridionale casi di intossicazioni correlati allo sviluppo di fioriture di *O. ovata* sono stati registrati per la prima volta nel 2001 (Pistocchi *et al.*, 2012).

Nella regione Marche la presenza di questa microalga è stata constatata nel 2006 e nel 2008 la Regione dovette chiudere la balneazione in seguito a un *bloom* che causò malessere sia all'uomo che agli animali (Pistocchi *et al.*, 2012).

In Veneto e in Emilia-Romagna la presenza di *Ostreopsis ovata* non è stata mai osservata (Pistocchi *et al.*, 2012).

Per ridurre l'impatto delle fioriture di fitoplancton tossico sulla salute pubblica e sulle attività economiche, è necessario considerare un'adeguata strategia di monitoraggio che possa consentire di conoscere meglio il fenomeno e fornire nuovi e più efficaci strumenti per la mitigazione e controllo di questi eventi (Penna *et al.*, 2006).

Nel monitoraggio delle specie fitoplanctoniche potenzialmente tossiche è necessario porre in relazione la dinamica spazio-temporale di tali specie con le caratteristiche fisiche, chimiche e biologiche della colonna d'acqua; per esempio, la turbolenza delle acque, l'apporto di nutrienti e il trasferimento del fitoplancton attraverso un gradiente luminoso, possono avere un effetto significativo sulla crescita e il declino di una popolazione algale (Smayda, 2002).

Il ruolo dei nutrienti sugli eventi tossici è ancora oggi in discussione, infatti, solo in alcuni casi i *bloom* tossici appaiono correlati all'eutrofizzazione degli ecosistemi costieri (Caroppo *et al.*, 2001).

I *surplus* di nutrienti possono stimolare la crescita delle HAS tossiche in modalità differenti. Queste possono aumentare di numero insieme alle altre specie di fitoplancton non tossico, rappresentando in termini percentuali la stessa frazione di densità fitoplanctonica totale che si aveva all'inizio (aumentano tutte le specie) e una situazione simile si è presentata lungo le coste del mare Adriatico meridionale. In quest'area, durante il periodo invernale, si è osservato un incremento della densità fitoplanctonica e contemporaneamente anche un picco di numerose specie appartenenti al genere *Dinophysis* (Caroppo *et al.*, 2001).

In altri casi, invece, l'incremento dei nutrienti può favorire maggiormente la crescita di densità di una specie potenzialmente tossica rispetto ad altre non produttrici di biotossine. Nel monitoraggio per le HAB il riconoscimento tassonomico al microscopio informa sulla presenza di HAS potenzialmente tossiche, ma la sola presenza non implica che poi si verifichi un *bloom* algale con produzione di biotossine. Infatti è stato osservato che la produzione di queste molecole dipende da più fattori: dalla densità della popolazione microalgale e dalle condizioni ambientali (Lindahl *et al.*, 2007) come la stratificazione della colonna d'acqua e la limitazione da parte del fosforo (Anderson *et al.*, 1990).

L'osservazione al microscopio quindi deve essere usata come una indagine preliminare che deve essere supportata da analisi chimiche e/o biochimiche per determinare la presenza e la tipologia di biotossina, così come per quantificarla.

Il monitoraggio delle HAS tossiche e quello delle biotossine ricercate nei prodotti ittici (es. mitili) hanno ognuno dei vantaggi e degli svantaggi e devono essere preferibilmente svolti parallelamente (Hallegraeff *et al.*, 2003).

L'analisi qualiquantitativa al microscopio per le specie fitoplanctoniche potenzialmente tossiche è molto più economica rispetto alle analisi chimiche sui prodotti ittici ed è molto più rapida, in quanto si possono ottenere dei risultati nell'arco delle 24 ore dal ricevimento del campione. Questo consente, in caso di necessità, di poter chiudere in maniera immediata gli impianti di acquacoltura evitando così il commercio di prodotti dannosi per la salute dell'uomo (Hallegraeff, 2003).

Le analisi del fitoplancton non sono solo ristrette alle specie conosciute come potenziali produttrici di biotossine, ma riguardano anche quelle che in seguito la loro lisi cellulare possono causare dei problemi liberando delle sostanze nell'aerosol o che possono produrre ittiotossine danneggiando la pesca e l'acquacoltura (Hallegraeff, 2003).

Gli svantaggi che insorgono in questo tipo analisi sono rappresentati dal fatto che il monitoraggio del fitoplancton è dato da un insieme di campioni raccolti in un punto ben

preciso nel tempo e dello spazio, perciò diventa cruciale e critica la fase di progettazione del disegno di campionamento che richiede una discreta conoscenza dell'area, della sua storicità ed un'elevata preparazione da parte dei ricercatori nel riconoscimento tassonomico (Hallegraeff, 2003).

La ricerca delle biotossine nei prodotti ittici (tramite analisi in HPLC o con saggio biologico) consente di constatare se ve ne è stato accumulo; ciò rende il prodotto più sicuro per il consumatore favorendone in questo modo l'acquisto. Il problema di questi test è che sono molto costosi, necessitano di più tempo rispetto alle analisi al microscopio, con ritardo nelle decisioni manageriali, inoltre è difficile per alcune biotossine individuare degli standard certificati.

Lo svolgere parallelamente sia le analisi al microscopio per il fitoplancton che i test chimici per le tossine è la soluzione migliore, in quanto grazie alla prima tipologia di analisi si riesce a far scattare velocemente, in caso di necessità, un allarme di potenziale contaminazione da biotossine, confermata o meno poi dalle analisi sui prodotti (Hallegraeff, 2003).

Il monitoraggio del fitoplancton tossico e delle relative tossine in molluschicoltura viene attualmente effettuato tramite analisi al microscopio per il riconoscimento e quantificazione dei taxa microalgali, saggi biologici e analisi chimiche con HPLC ma, viste le lunghe procedure in laboratorio e l'elevata specializzazione che deve avere il personale, il futuro guarda verso la biologia molecolare attraverso l'uso di sonde nucleotidiche (Penna *et al.*, 2006).

1.4 Fitoplancton dell'Adriatico settentrionale

Il Mediterraneo è un mare semichiuso con caratteristiche oligotrofiche (Sournia, 1973), unica eccezione è il nord Adriatico che presenta una elevata produzione influenzata principalmente dall'apporto di acque fluviali dal bacino padano (Gómez e Gorsky, 2003). Quest'area è caratterizzata da un ecosistema altamente eterogeneo e ciò è dovuto all'ingressione nel sistema di acqua salata dall'Adriatico meridionale e di acque dolci dai fiumi (Franco, 1970).

L'afflusso di "Freshwater" dai fiumi comporta un *input* di nutrienti, la cui distribuzione in mare, influenzata dalle correnti e dalla stabilità della colonna d'acqua (Cozzi e Giani, 2011; Degobbi *et al.*, 2000), va ad agire sulla collocazione delle comunità fitoplanctoniche (Viličić *et al.*, 2009).

La ripartizione spaziale del fitoplancton nel nord Adriatico mostra tre gradienti principali di diminuzione: uno longitudinale, uno latitudinale e uno verticale.

Il primo è rappresentato da una maggior produzione in prossimità delle foci dei fiumi Po e Adige, la quale tende a calare spostandosi verso la costa croata (est).

Latitudinalmente invece si ha un declino della densità fitoplanctonica in direzione sud-nord (Acri *et al.*, 1994).

All'interno della colonna d'acqua è visibile inoltre un'ulteriore trend di diminuzione: l'abbondanza di fitoplancton cala all'aumentare della profondità.

Questa variabilità spaziale nella distribuzione fitoplanctonica è guidata principalmente dalla temperatura, dalla quantità di luce, dall'idrodinamismo e dalla concentrazione di nutrienti (Bernardi Aubry *et al.*, 2004).

La distribuzione del fitoplancton nel Nord Adriatico, oltre a mostrare una variazione nello spazio, ne mostra una anche nel tempo dettata dalla stagionalità (Revelante e Gilmartin, 1976), con una biomassa maggiore in primavera-estate e una minore in inverno (Alberighi *et al.*, 1990).

Analisi recenti hanno mostrato che in questo bacino le variabili fisico chimiche dipendono principalmente dalla stagionalità ed è questa la principale forza che agisce sulle abbondanze delle microalghe (Socal *et al.*, 2008). Su scala locale, a livello della costa emiliano-romagnola, il monitoraggio svolto dalla Struttura Oceanografica Daphne permette di individuare le specie di microalghe maggiormente presenti e la loro distribuzione nel tempo e nello spazio (Figura 22).

In generale la biomassa a carico del micro-fitoplancton (20-200 μ m) nel tratto di mare davanti all'Emilia-Romagna è dominata durante tutto l'anno (anno 2012) dalla classe delle Bacillariophyceae (Diatomee), che mostrano un picco di crescita in primavera e uno in tarda estate (settembre) e un trend di aumento verso nord in prossimità della foce del Po (ARPA 2013).

I taxa più rappresentativi per abbondanza e frequenza di questa classe in questa zona sono: *Skeletonema* spp. e *Chaetoceros* spp. Il primo è presente principalmente da novembre fino a inizio primavera, mentre il secondo persiste per tutta l'estate fino a settembre (ARPA 2013).

A fine estate compaiono inoltre fioriture di *Thalassiosira* spp., *Pseudonitzschia* spp., *Rhizosolenia* spp. e *Thalassionema* spp. (Pompei *et al.*, 1995).

Un'altra componente fitoplanctonica importante è rappresentata dalle Dinophyceae le quali rimangono costanti in biomassa più o meno tutto l'anno con un picco estivo.

Il taxa più rappresentato di questa classe risulta essere *Gyrodinium* spp. che mostra la sua presenza costantemente nel tempo; nei tre mesi estivi (giugno luglio e agosto), è possibile avere delle cospicue fioriture a carico di *Scrippsiella* spp. e *Prorocentrum cordatum* (Ostenfeld) Dodge (ex *Prorocentrum minimum* (Pavillard) Schiller) (ARPA 2013).

Nel periodo pre-estivo compaiono anche *Prorocentrum micans* Ehrenberg, *Lingulodinium polyedrum* (F.Stein) Dodge, *Protoperidinium* spp., *Diplopsalis* spp., *Dinophysis* spp., *Gymnodinium* spp. e *Noctiluca scintillans* (Macartney) Kofoid et Swezy ex *Noctiluca miliaris* Suriray) (Pompei *et al.*, 1995).

Oltre alle Diatomee e alle Dinofitee, un'altra frazione importante dell'abbondanza totale del micro-fitoplancton è rappresentata dai cosiddetti "Altri fitoflagellati", comprendenti : Clorofitee, Euglenofitee, Criptofitee, Crisofitee, Rafidofitee, Prasinoofitee, Primmesiofitee e Dictiocofitee.

Questa componente fitoplanctonica come le dinofitee tende ad aumentare nel periodo estivo (anno 2012) (ARPA 2013).

Tabella 4: lista dei taxa riscontrati dal monitoraggio ARPA del 2012 (ARPA 2013).

Classe	Taxa
Bacillariophyceae	<i>Asterionellopsis glacialis</i>
Bacillariophyceae	Bacillariales indet.
Bacillariophyceae	<i>Chaetoceros diversus</i>
Bacillariophyceae	<i>Chaetoceros</i> spp.
Bacillariophyceae	<i>Chaetoceros tortuosissimus</i>
Bacillariophyceae	<i>Cylindrotheca closterium</i>
Bacillariophyceae	<i>Dactylosolen fragilissimus</i>
Bacillariophyceae	<i>Hemiaulus</i> sp.
Bacillariophyceae	<i>Leptocylindrus</i> spp.
Bacillariophyceae	<i>Navicula</i> spp.
Bacillariophyceae	<i>Nitzschia</i> spp.
Bacillariophyceae	<i>Pseudo-nitzschia</i> sp. del <i>Nitzschia delicatissima</i> complex
Bacillariophyceae	<i>Pseudo-nitzschia</i> sp. del <i>Nitzschia seriata</i> complex
Bacillariophyceae	<i>Pseudo-nitzschia</i> spp.
Bacillariophyceae	<i>Skeletonema</i> spp.
Bacillariophyceae	<i>Thalassionema</i> spp.
Bacillariophyceae	<i>Thalassioetra</i> spp.
Dinophyceae	<i>Ceratium furus</i>
Dinophyceae	<i>Ceratium</i> spp.
Dinophyceae	Dinophyceae indet.
Dinophyceae	<i>Dinophysis sacculus</i>
Dinophyceae	<i>Diplopsalis</i> group
Dinophyceae	<i>Gonyaulax</i> spp.
Dinophyceae	<i>Gymnodinium</i> spp.
Dinophyceae	<i>Gyrodinium</i> spp.
Dinophyceae	<i>Heterocapsa</i> spp.
Dinophyceae	<i>Karenia</i> spp.
Dinophyceae	<i>Lingulodinium polyedrum</i>
Dinophyceae	<i>Ocyropsis</i> spp.
Dinophyceae	<i>Polykrikos</i> spp.
Dinophyceae	<i>Prorocentrum aporum</i>
Dinophyceae	<i>Prorocentrum micans</i>
Dinophyceae	<i>Prorocentrum minimum</i>
Dinophyceae	<i>Prorocentrum trisetinum</i>
Dinophyceae	<i>Protoperidinium bipes</i>
Dinophyceae	<i>Protoperidinium cf. pellucidum</i>
Dinophyceae	<i>Protoperidinium</i> spp.
Dinophyceae	<i>Protoperidinium thorianum</i>
Dinophyceae	<i>Pseudonidium vaubanti</i>
Dinophyceae	<i>Scrippsiella</i> spp.
Dinophyceae	<i>Torodinium</i> spp.

1.4.1 Storicità degli HAB avvenuti lungo la costa emiliano-romagnola

Dalla fine degli anni '60 ad oggi le acque costiere della regione Emilia-Romagna sono state interessate in modo ricorrente da *bloom* microalgali (Pompei *et al.*, 1995), i quali hanno determinato a volte la colorazione dell'acqua e/o la produzione di biotossine.

Per quanto riguarda la colorazione dell'acqua da parte di fioriture microalgali, nel 1983 verso la fine di agosto a Marina di Ravenna un'esplosione della Dinoficea *Lepidodinium chlorophorum* (Elbrächter et Schnepf) Hansen, Botes et de Salas (all'epoca identificato come *Gymnodinium* sp.) raggiunse la concentrazione di 200×10^6 cell/L, tingendo l'acqua di verde.

Lo stesso fenomeno si ebbe nuovamente nel 1987 ad ottobre, sempre ad opera della stessa microalga, ma con concentrazioni cell/L inferiori (120×10^6 cell/L) (Pompei *et al.*, 1995).

Nel 1984 invece, le acque emiliano-romagnole divennero bruno-rossastre a causa di un bloom di *Lingulodinium polyedrum* (Stein) Dodge (ex *Gonyaulax polyedra*) (Pompei *et al.*, 1995).

Per quanto riguarda fioriture di HAS potenzialmente tossiche, con conseguente contaminazione dei mitili, lungo la costa dell'Emilia-Romagna il primo evento riportato in letteratura è avvenuto nel 1989. In questo caso nei prodotti ittici erano presenti acido

okadaico (OA) e dinophysitossine (DTXs) e in acqua furono ritrovate diverse specie appartenenti al genere *Dinophysis*.

Dal 1989 al 1997 lungo le coste emiliano-romagnole sono stati registrati altri episodi di sviluppo di biotossine diarroiche (DSP) prodotte da fioriture microalgali. In questi casi ci fu tossicità anche con basse concentrazioni di *Dinophysis* in acqua (10^3 - 10^4 cell/L) (Pistocchi *et al.* 2012).

Queste microalghe, in questa zona, durante l'anno, compaiono nel periodo tra aprile e ottobre, presentando dei picchi di crescita nei mesi di giugno e a fine agosto-settembre. La prima specie che si presenta in primavera e che raggiunge il maggior numero di cellule per litro è *Dinophysis sacculus* Stein. In seguito nel tempo compaiono anche: *D. fortii* Pavillard, *D. caudata* Saville-Kent, *D. tripos* Gourret e *Phalacroma rotundatum* (Claparède et Lachmann) Kofoid et Michener (ex *D. rotundata*) (Pompei *et al.*, 1995).

L'ultimo evento conosciuto di contaminazione da acido okadaico è avvenuto nella tarda estate del 2010 nella quale più di 200 persone hanno mostrato i sintomi da sindrome diarroica. In questo caso nei prodotti ittici consumati oltre all'OA erano presenti anche le yessotossine (YTXs). Quest'ultime furono associate alla presenza di diverse specie di dinoficee, come ad esempio: *Gonyaulax grindleyi* Reinecke (ex *Protoceratium reticulatum*), *Lingulodinium polyedrum* (Stein) Dodge e *Gonyaulax spinifera* (Claparède et Lachmann) Diesing (Pistocchi *et al.* 2012).

All'inizio del 2000 (2002 e 2004) ritrovando un'alta concentrazione di YTX nei mitili furono chiusi gli impianti di allevamento per centinaia di giorni e la responsabilità della tossicità riscontrata fu attribuita a *bloom* di *G. grindleyi*. Nel 2007 invece la presenza della stessa tossina con le medesime conseguenze è stata associata alle alte concentrazioni di *G. spinifera* (7.1×10^5 cells/L) rilevate nella colonna d'acqua.

Per quanto riguarda casi da contaminazione da tossine per la PSP, il primo evento, per quanto riguarda il Nord Adriatico, fu registrato nel 1994. La specie microalgale direttamente responsabile della comparsa della Saxitossina (STX) in questo caso fu: *A. minutum* (Honsell G. *et al.*, 1996).

Dal 2000 ad oggi, lungo la costa emiliano-romagnola si sono verificati più fenomeni di fioriture di diatomee del genere *Pseudo-nitzschia* con produzione di acido domoico, ma i livelli di tossina rivenuti nei mitili sono rimasti fino ad ora sempre inferiori ai limiti di legge (Pistocchi *et al.*, 2012).

2. SCOPO DELLA TESI

Negli ultimi decenni nell'Alto Adriatico, in particolare lungo la costa dell'Emilia-Romagna, si sono verificati fenomeni eutrofici con lo svilupparsi di "red tides", con frequenza e intensità tali da aver assunto un aspetto cronico; in particolare negli anni '70-'80 i risvolti a carattere ecologico, igienico-sanitario ed economico sono stati impressionanti (Rinaldi e Montanari, 1988; Boni 1983). Da questi episodi è nata l'esigenza sia di un efficiente monitoraggio dell'area, che viene svolto dal 1976 dalla Struttura Oceanografica Daphne, sia di ricercare e studiare i meccanismi che guidano il processo.

La costa dell'Emilia-Romagna è pertanto la zona in cui i parametri biotici e abiotici delle acque sono rilevati, da diversi anni, con maggiore frequenza rispetto a tutti gli altri bacini del Mediterraneo. Questa zona è sotto stretta osservazione anche nell'ambito Direttiva europea 2008/56/CE, Marine Strategy Framework Directive (MSFD), in quanto l'alto Adriatico rappresenta la zona maggiormente a rischio per i fenomeni di eutrofizzazione e di *bloom* algali.

Il lavoro di questa tesi nasce dalla necessità di approfondire diversi aspetti sollevati dalla MSFD e che non vengono soddisfatti da una normale attività di monitoraggio che, proprio per la frequenza e l'enorme mole di dati raccolti, spesso non permette di riunire insieme per un unico sito tutti i parametri biotici e abiotici indicativi dello stato dell'ambiente né di fare elaborazioni statistiche approfondite. Gli aspetti sollevati dalla MSFD sono ad esempio: 1) il ruolo primario ed essenziale attribuito alla biodiversità, quindi la necessità di elaborare indici di diversità; 2) la difficoltà di determinare il Good Environment State (GES) per cui il gruppo di lavoro sul plancton (costituito da 24 Università, 6 Istituti del CNR, SZN, OGS, ARPA, Istituti Zooprofilattici, Aree Marine Protette, Centro Ricerche di Cesenatico, Fondazioni e Associazioni ambientaliste) ha stabilito la necessità dell'adeguamento dei sistemi di monitoraggio nazionali ai fini della piena applicazione della MSFD; 3) la necessità di considerare il Descrittore 5 – Eutrofizzazione, non disgiunto dal Descrittore 1 – Biodiversità, e quindi di dover valutare le concentrazioni di nutrienti e il rapporto azoto/fosforo misurati in acqua in relazione alla quantità e diversità delle specie presenti ed in particolare di quelle dannose.

Questo lavoro di tesi è stato svolto analizzando in una finestra temporale di sei mesi (aprile-ottobre 2013), gli andamenti fitoplanctonici e le caratteristiche ambientali delle acque superficiali prelevate in due siti prospicienti la costa emiliano-romagnola (area

eutrofica dell'Adriatico) all'altezza di Marina di Ravenna, uno più prossimo al litorale (DIGA SUD) e uno più lontano (GEOMAR) operando anche un confronto fra questi.

Si è cercato inoltre di individuare quali caratteristiche abiotiche influiscano maggiormente sulla distribuzione e sull'abbondanza delle comunità fitoplanctoniche in queste aree e di segnalare la presenza di eventuali specie potenzialmente tossiche.

Per quanto riguarda le caratteristiche ambientali sono stati studiati i parametri chimico-fisici dell'acqua, come: Temperatura (°C), salinità (psu) , nutrienti inorganici (mg/L) e rapporto N/P; mentre per la componente fitoplanctonica sono state analizzate le abbondanze delle varie specie, tramite analisi quali-quantitativa avvalendosi del metodo Utermöhl (1958).

Tale studio è stato svolto in associazione con la Fondazione Centro Ricerche Marine di Cesenatico, in particolare con il laboratorio fitoplancton, e ha avuto come fine quello di implementare il lavoro di analisi quali-quantitativa focalizzato prevalentemente sulle specie tossiche eseguita da questo laboratorio, con un'analisi di carattere ecologico, prendendo in considerazione la maggior parte delle specie di micro-fitoplancton, associandole inoltre ai parametri fisico-chimici che caratterizzano l'ambiente.

3. MATERIALI E METODI

3.1 Area di studio e preparazione dei campioni.

Il presente studio è stato svolto in collaborazione con la Fondazione Centro Ricerche Marine di Cesenatico e con l'Università di Bologna (campus di Ravenna).

Questo lavoro ha previsto il campionamento di acqua in due siti scelti nell'area di mare prospiciente Marina di Ravenna, località della costa emiliano-romagnola che si affaccia sul Mar Adriatico settentrionale a sud dalla foce del Po ($44^{\circ} 29' 0''$ N, $12^{\circ} 17' 0''$ E) (Figura 20).



Figura 20: Posizionamento geografico di Marina di Ravenna rispetto la foce del Po.

I due siti denominati DIGA SUD e GEOMAR (Figura 21) si differenziano principalmente per la distanza dalla costa, in quanto il primo si trova a livello della diga Foranea Sud del porto di Marinara (Marina di Ravenna) e dista dalla costa 1,5 Km, mentre il secondo ne dista 12 Km e si trova in corrispondenza di una piattaforma metanifera. Entrambe le aree sono caratterizzate dalla presenza di allevamenti di *Mytilus galloprovincialis* soggetti ai controlli dell'ASL di Ravenna.



Figura 21: Posizionamento geografico e coordinate (Datum ETRS89) dei 2 siti oggetto di campionamento (www.algeadria.org).

Il campionamento è iniziato nell'aprile del 2013 ed è terminato ad ottobre dello stesso anno; questo prevedeva la raccolta in entrambi i siti di 1,5 L di acqua “tal quale”, replicata nel tempo in diverse date (Tabella 5).

L'acqua presso il sito DIGA SUD è stata prelevata tramite campionamento subacqueo, mentre in GEOMAR il prelievo è stato effettuato dall'imbarcazione.

Tabella 5: Disegno di campionamento.

SITO DI CAMPIONAMENTO	DATA
DIGA SUD (D)	21/04/13
	02/05/13
	09/05/13
	21/05/13
	11/06/13
	05/07/13
	22/07/13
	08/08/13
	23/08/13
	13/09/13
	17/10/13
GEOMAR (G)	24/04/13
	08/05/13
	22/05/13
	12/06/13
	01/07/13
	18/07/13
	02/08/13
	19/08/13
	03/09/13
	25/09/13
	10/10/13
18/10/13	

I prelievi sono stati effettuati in entrambe le stazioni di campionamento a una profondità di 0,5-1,0 m, con bottiglie di plastica, consegnate poi al laboratorio fitoplancton della Fondazione Centro Ricerche Marine di Cesenatico.

Una volta giunti in laboratorio, tutti i campioni sono stati sottoposti allo stesso trattamento di preparazione per le analisi da effettuare in seguito; ognuno di questi per prima cosa è stato acclimatato, ovvero si è fatto in modo che l'acqua raggiungesse la stessa temperatura dell'ambiente del laboratorio; in seguito, tramite l'uso di un

rifrattometro con compensazione automatica di temperatura, è stata misurata la salinità dell'acqua (PSU) (Figura 22).



Figura 22: Rifrattometro

Ogni bottiglia contenente il campione d'acqua è stata poi agitata lentamente e in maniera tridimensionale per circa 100 volte, per omogeneizzarne il contenuto.

Del campione originale 250 ml sono stati travasati in bottiglie di vetro scuro e fissati con una soluzione acida di Lugol (0,5-1 mL di soluzione di Lugol venivano aggiunti a 250 mL di campione tal quale, in modo da ottenere una colorazione “cognac”) per essere poi sottoposti all'analisi quali-quantitativa del fitoplancton al microscopio ottico.

Del campione rimanente aliquote di 500 ml sono state filtrate avvalendosi del metodo “sotto pressione ridotta”, questa tecnica richiede l'uso di una beuta da vuoto (beuta codata) e di un imbuto Buchner (Figura 23). In questo caso, per la tipologia di analisi da svolgere, la metodica ICRAM impone l'uso di filtri di cellulosa da 0,45 μm (ICRAM 2001). Mediante una pompa ad acqua si è creato un vuoto parziale all'interno della beuta, inducendo così l'aspirazione della componente liquida attraverso la carta da filtro. In questo modo il materiale in sospensione, che potrebbe influire con il metodo colorimetrico utilizzato per la quantificazione dei nutrienti, viene trattenuto ed eliminato.

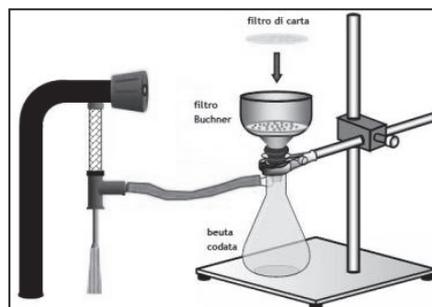


Figura 23: Apparato per la filtrazione “sotto pressione ridotta”

L'acqua filtrata è stata conservata in bottiglie di plastica a -20°C per effettuare in seguito l'analisi dei nutrienti inorganici disciolti.

Ad ogni campione (1,5 L di acqua tal quale) è stato associato il valore di temperatura (°C), della superficie della colonna d'acqua, rilevato dalla Struttura Oceanografica Daphne durante i monitoraggi, che normalmente comprendono anche quest'area della costa emiliano-romagnola (ARPA 2012).

3.2 Analisi dei nutrienti inorganici

L'analisi dei nutrienti è stata svolta presso i laboratori del Campus di Ravenna.

I nutrienti inorganici disciolti, fosfati, nitrati, nitriti, silicati e ammonio sono stati quantificati mediante analisi colorimetriche allo spettrofotometro. Queste ultime si basano sulla legge di Lambert – Beer che correla la quantità di luce assorbita da un mezzo, alla natura chimica, alla concentrazione e allo spessore del mezzo attraversato (<http://www.chimicamo.org/>).

$$A = \epsilon_{\lambda} d M$$

Dove:

A= assorbanza;

ϵ_{λ} = coefficiente di estinzione molare;

d= cammino geometrico (=spessore di liquido attraversato);

M= molarità della soluzione.

Utilizzando uno spettrofotometro che rileva l'assorbanza (A) ad una determinata lunghezza d'onda della sostanza disciolta in acqua che si vuole quantificare, si riesce ad ottenerne la concentrazione (avendo noti gli altri due parametri $d=1\text{cm}$ e ϵ_{λ}). Se il composto da analizzare non mostra particolari picchi di assorbimento è necessario effettuare una colorazione secondo diverse metodologie di tipo chimico che verranno descritte in seguito.

Per i fosfati, i nitrati, i nitriti e i silicati si è usato uno spettrofotometro a doppio raggio JASCO V-650, mentre per l'ammonio uno di tipo portatile a raggio singolo HACH DR/2010.

3.2.1 Fosfati inorganici

3.2.1.1 Principio del metodo

Il metodo si basa sulla formazione di un complesso fosfomolibdico di colore blu (del gruppo dei blu di molibdeno) la cui concentrazione viene stimata per via colorimetrica (spettrofotometro) (Deniges, 1920).

L'acqua di mare è stata fatta reagire con un reattivo complesso contenente acido molibdico, acido ascorbico e antimonio trivalente. L'eteropoliacido risultante dalla reazione si riduce dando una colorazione blu, la cui estinzione viene misurata a 885 nm allo spettrofotometro.

3.2.1.2 Procedimento

1) Sono state preparate quattro soluzioni:

- soluzione 1: molibdato ammonico $[(\text{NH}_4)_4\text{Mo}_7\text{O}_{24}\cdot 4\text{H}_2\text{O}]$,
- soluzione 2: soluzione di acido solforico 5 N $[\text{H}_2\text{SO}_4]$,
- soluzione 3: soluzione di acido ascorbico $[\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6]$
- soluzione 4: soluzione tartrato di potassio e antimonile $[\text{K}(\text{SbO})\text{C}_6\text{H}_4\text{O}_6]$.

2) Poco prima dell'utilizzo, essendo stabile per circa sei ore, è stato preparato il reattivo misto miscelando le quattro soluzioni precedentemente elencate nell'ordine indicato, nel rapporto volumetrico pari a 2:5:2:1 rispettivamente. La scelta del quantitativo di reattivo misto da preparare è stata fatta sapendo che 100 ml di questa soluzione sono utili a colorare 20 campioni.

3) 50 ml di acqua dei campioni da analizzare (precedentemente filtrata), sono stati posti in cilindri di vetro da 50 ml con il tappo. Sono stati aggiunti ad ogni cilindro 5 ml di reattivo misto e si è mescolato immediatamente. A questo punto la presenza nei campioni di fosfati inorganici verrà rilevata dalla colorazione blu che il campione unito al reattivo prenderà, più o meno intensa a seconda della concentrazione (Figura 24).



Figura 24: scala di colorazione dei fosfati.

- 4) Dopo 10 minuti è stata effettuata la lettura allo spettrofotometro ad una lunghezza d'onda di 885 nm utilizzando cuvette di vetro con cammino ottico di 1 cm. Le letture sono state fatte sottraendo il valore di assorbanza del bianco, ottenuto con lo stesso procedimento mettendo acqua distillata al posto dell'acqua in esame. Utilizzando una curva di taratura per i fosfati, è possibile ottenere dal valore di assorbanza letto allo spettrofotometro, un valore di concentrazione in (mg/L) (Figura 25).

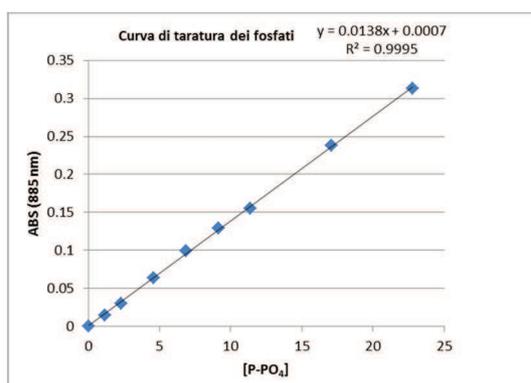
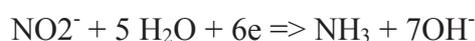
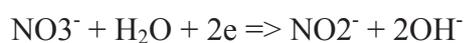


Figura 25: curva di taratura per i fosfati.

3.2.2 Nitrati e Nitriti inorganici

3.2.2.1 Principio del metodo

Il metodo utilizzato per l'analisi dei nitrati si basa sulla loro riduzione, in fase eterogenea, a nitriti e sul successivo dosaggio dei nitriti totali utilizzando una metodica colorimetrica. Il metodo è stato introdotto da Morris e Riley (1963) e le reazioni principali su cui si basa tale procedura analitica, in ambiente basico, sono:



Il riducente utilizzato in questo caso è il cadmio che viene alloggiato in una colonnina di vetro e per ovviare alla sua tendenza alla precipitazione a idrossido di cadmio, questo viene tamponato a pH 8,5 utilizzando ammonio-cloruro.

Siccome il passaggio attraverso il cadmio comporta la riduzione dei nitrati a nitriti, per valutare la quantità dei primi, occorre sottrarre alla quantità di nitriti riscontrati nella soluzione ridotta quelli trovati nella stessa non percolata attraverso la colonna.

3.2.2.2 Procedimento

1) Per prima cosa sono state preparate le soluzioni stock utili al procedimento:

- Soluzione di solfato di rame al 2% (m/V)
- Soluzione concentrata di cloruro di ammonio al 25% (m/V)
- Soluzione diluita di cloruro di ammonio allo 0,625% (m/V)
- Soluzione di solfanilammide (SA) all'1% (m/V)
- Soluzione di Naftiletildiammina (NEDA) allo 0,1% (m/V)
- Acqua di mare sintetica
- Soluzione standard di nitrato N-NO₃- a 140 mg/L
- Soluzione standard di nitrato diluita N-NO₃- a 0,14 mg/L
- Soluzione standard di nitrito N-NO₂- a 70mg/L
- Soluzione standard di nitrito diluita N-NO₂- a 0.70 mg/L
- Soluzione di acido cloridrico concentrato (d = 1,18)

2) In seguito si è reso necessario riattivare la colonnina del cadmio in cui avviene la riduzione dei nitrati a nitriti (Figura 26).

Sotto cappa chimica, il cadmio granulare è stato lavato prima con una soluzione di HCl 2M e poi con acqua distillata; dopo è stato trattato con una soluzione al 2% di CuSO₄ · 5H₂O. Si è mescolato il tutto fino a quando il solfato di rame non ha cambiato la sua colorazione da azzurra a marrone; ciò è dovuto alla precipitazione di rame colloidale. Il precipitato in seguito è stato asportato dai granuli ramati tramite una ventina di risciacqui con acqua distillata, fino a che questa non è risultata limpida. Si è poi verificato che il pH fosse maggiore di 5.

Infine la colonnina è stata riempita immettendo il cadmio ramato poco per volta dopo avere inserito sul fondo un batuffolo di lana di vetro.

Con una soluzione di cloruro d'ammonio diluita allo 0,625% si è lavata la colonna e si è coperto il cadmio.

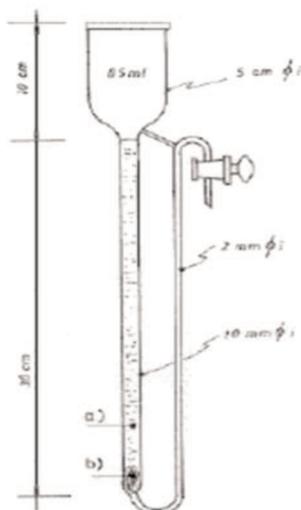


Figura 26: colonna di riduzione dei nitriti.

3) Una volta preparata la colonna, se ne è verificata l'efficienza di riduzione.

Per prima cosa è stato effettuato il lavaggio del cadmio, facendo percolare 200 mL di soluzione di cloruro d'ammonio diluita allo 0,625% e 100 mL di acqua distillata. Poi si è fatto passare un bianco: 100 ml di acqua marina sintetica unita a 2 mL di soluzione concentrata al 25% di cloruro d'ammonio.

I primi 45 mL del bianco che fuoriescono dalla colonna sono stati scartati, mentre i 50 mL successivi sono stati raccolti in un cilindro graduato.

Successivamente al bianco, seguendo lo stesso identico procedimento (scarto dei primi 45 ml), sono state fatte percolare 2 repliche da 100 ml di soluzione standard per i nitrati diluita, addizionate entrambe a 2 mL di cloruro di ammonio (25%).

Dopo i passaggi in colonna è stata effettuata la colorazione: ai tre cilindri da 50ml contenenti il bianco e lo standard in 2 repliche sono stati aggiunti 2 ml di SA e si è mescolato. Dopo un'attesa di 3 minuti si è aggiunto in ogni cilindro 1 ml di NEDA, si è mixato il tutto e si atteso 15 minuti, in questo tempo i nitriti vengono rilevati da una colorazione rosa-fucsia più o meno intensa a seconda della concentrazione (Figura 27).



Figura 27: scala di colorazione dei nitriti.

Dopo un quarto d'ora si è svolta la lettura delle 3 soluzioni colorate allo spettrofotometro utilizzando una cuvetta in vetro con cammino ottico di un centimetro e una lunghezza d'onda di 543 nm.

Una volta svolte le letture con queste si è calcolata :

$$F = \frac{0.14 \text{ mg /L}}{\text{abs (st m)} - \text{abs (bianco)}}$$

Dove:

F= efficienza di riduzione;

abs (st m)= assorbanza media delle 2 repliche di standard;

abs (bianco)= assorbanza del bianco

0,14 mg /L = concentrazione della soluzione standard diluita per i nitrati.

F è l'efficienza di riduzione della colonnina e se assume un valore vicino a 0,31 indica una efficienza del 100%, se si aggira intorno allo 0,37 corrisponde a un 84% (ritenuto comunque adeguato).

Poiché la colonna si disattiva man mano che la si usa oppure se resta inoperosa per molto tempo, l'efficienza di questa deve essere misurata almeno all'inizio di ciascun giorno di lavoro, prima di analizzare i campioni.

- 4) Dopo essersi accertati che la colonnina riduca efficientemente i nitrati a nitriti sono stati fatti passare i campioni, aggiungendo a questi sempre 2 ml di cloruro di ammonio (25%), scartando i primi 45 ml percolati e tenendo i 50 ml successivi passati attraverso il cadmio.

Tal volta, essendo i nitrati presenti in concentrazione elevata superiore alla concentrazione dello standard, i campioni sono stati diluiti (anche fino a 1:10) con

acqua di mare sintetica, in modo da rimanere con valori di assorbanza più bassi degli standard e più alti del bianco precedentemente misurati.

Una volta terminata la percolazione al campione vengono aggiunti, prima 2 ml di SA e dopo 3 minuti 1 ml di NEDA per effettuare la colorazione.

Un quarto d'ora dopo i campioni, i quali tendono a rilevare la presenza di nitriti assumendo una colorazione rosa-fucsia, sono stati letti allo spettrofotometro con una lunghezza d'onda pari a 543 nm. Da queste letture si è ottenuta l'assorbanza data dalla quantità di azoto nitrico sommato a quello nitroso.

- 5) Per ogni campione si è valutato anche la quantità di nitriti presenti senza farli passare nella colonnina di riduzione, seguendo la stessa identica procedura: colorazione con SA, NEDA e lettura allo spettrofotometro (543 nm). In questo modo si ottiene l'assorbanza data dall'azoto nitroso.
- 6) In seguito sono stati svolti i seguenti calcoli:

- Concentrazione dei nitriti

$$N - NO_2 \text{ (mg/L)} = \frac{[abs(c) - abs(b)] * 0.028 * 50}{[abs(st\ m) - abs(b)] * V}$$

Dove:

abs (c)= assorbanza del campione;

abs (b)= assorbanza dell'acqua di mare sintetica;

abs (st m)= assorbanza media dei due standard a 543 nm;

V= volume di acqua analizzata (L).

- Assorbanza relativa ai nitrati

$$abs(N - NO_3) = [abs(cp) - abs(b)] - [abs(cnp) - abs(b)]$$

Dove:

abs (N-NO₃)= assorbanza riferita ai nitrati;

abs (cp)= assorbanza ottenuta dai campioni percolati;

abs (b)= assorbanza dell'acqua di mare sintetica;

abs (cnp)= assorbanza dei campioni non percolati.

- Concentrazione dei nitrati

$$N - NO3 \text{ (mg/L)} = \frac{F * abs (N - NO3) * 100}{V}$$

Dove:

F= efficienza di riduzione;

abs (N-NO3)= assorbanza nitrati precedentemente calcolata;

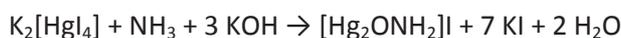
V= volume di acqua analizzata (L).

3.2.3 *Ammonio*

3.2.3.1 Principio del metodo

Per la determinazione dell'ammonio si è utilizzato il metodo colorimetrico di Nessler (Hach Company, 1996) .

Il reattivo di Nessler permette il riconoscimento e la determinazione quantitativa dell'ammoniaca presente in un campione acquoso. Questo è costituito da una soluzione alcalina di tetra-ioduromercurato di potassio che in presenza di NH₃ dà la seguente reazione:



La formazione dello ioduro di ossoamidodimercurio, la cui concentrazione è proporzionale a quella dell'ammonio nel campione, manifesta una colorazione giallo-arancione la cui intensità è proporzionale alla quantità di questo catione.

Quest'ultimo può essere quindi quantificato utilizzando una metodologia colorimetrica, effettuando letture di assorbanza allo spettrofotometro ad una lunghezza d'onda pari a 420 nm.

3.2.3.2 Procedimento

50 ml di ogni campione sono stati posti in cilindri graduati in vetro provvisti di tappo. A questi sono stati aggiunti: prima 1 mL della soluzione stabilizzante (sale di Seignette), correttivo usato per le analisi su acqua di mare, e dopo 5 ml di "reattivo Nessler".

Allo stesso modo è stato colorato un bianco costituito da acqua marina sintetica diluita per i Nitrati.

Il tutto è stato mescolato e poi letto allo spettrofotometro monoraggio portatile HACH DR-2010 a una lunghezza d'onda pari a 420 nm.

Tale strumento restituisce, sottraendo ad ogni campione letto il valore di assorbanza del bianco, la concentrazione in mg/L dell'ammonio.

3.2.4 Silicati

3.2.4.1 Principio del metodo

La determinazione dei silicati disciolti viene effettuata inducendo la formazione di un poliacido silicomolibdico che viene successivamente ridotto a blu di molibdeno.

Questa metodica consente di rilevare solo la quantità di silicati "reattivi" e può pertanto essere considerato una ragionevole misura del silicato disponibile per le popolazioni fitoplanctoniche (Garret e Walker, 1964).

Il composto finale (blu di molibdeno), che rivela la concentrazione della silice viene dosato per via colorimetrica leggendo l'assorbanza a 810 nm con una cuvetta di cammino ottico di 1 cm. Con una cella di questa lunghezza, secondo la Legge di Lambert-Beer, a 1,00 di assorbanza corrispondono circa 1,260 µg/L di Si.

Le reazioni chimiche che portano al Blu di Molibdeno prevedono intermedi altamente instabili e fortemente influenzabili da variazioni ambientali anche minime (es. PH). Per questo tale procedimento si è reso necessario svolgerlo in eppendorf sterili. Inoltre, essendo la silice presente nelle attrezzature di laboratorio in vetro, con il rischio di contaminazione dei campioni, tutte le operazioni sono state svolte in contatto con oggetti esclusivamente di polietilene (dal campionamento alle analisi).

3.2.4.2 Procedimento

1) Per prima cosa sono state preparate le soluzioni utili al procedimento, le quali sono state in seguito conservate in bottiglie di plastica:

- Soluzione di eptamolibdato di ammonio (0,16 M)
- Soluzione di acido solforico (7,3 N)
- Reattivo molibdico
- Soluzione di acido ossalico (0,7 M)
- Soluzione di acido ascorbico (0,1 M)
- Soluzione standard concentrata di silicio (140,5 µg Si /ml)
- Soluzione standard diluita di silicio (14,05 µg Si /ml)
- Acqua di mare sintetica

2) Una volta preparati i reagenti è stata costruita una curva di taratura (Figura 28 e 29). Per fare questo in 4 matracci di polietilene sono stati messi rispettivamente 0,0 (Bianco)- 1,0- 5,0- 10,0 ml di soluzione standard diluita (14,05 µg Si /ml) e portati a volume con acqua di mare sintetica a 100 ml.

In tal modo nei 4 contenitori si sono ottenute concentrazioni di Si pari a: 0 µg/L nel primo, 140,5 µg/L nel secondo, 703 µg/L nel terzo e 1405 µg/L nel quarto.

Aliquote di 35 ml delle soluzioni standard per la curva così preparate sono state trasferite in 4 eppendorf sterili ed ad ognuna di queste sono stati aggiunti: prima 1 ml di reattivo molibdico, dopo 10 minuti 1 ml di acido ossalico e subito dopo 1 ml di soluzione di acido ascorbico.

La presenza di silicati viene così evidenziata da una colorazione azzurra-blu, più o meno scura a seconda della concentrazione. In questo caso è stato possibile vedere ad occhio nudo il trend seguito dalle tonalità del colore: dalla più chiara alla più scura andando dal bianco allo standard maggiormente concentrato.

Dopo 30 minuti si è letto il tutto (bianco e standard) allo spettrofotometro a 810 nm, in cuvette di vetro da 1 cm, contro acqua di mare sintetica.

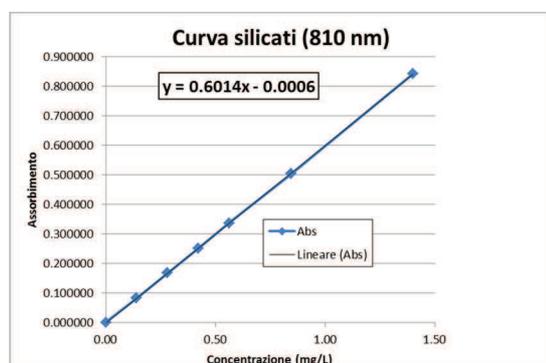


Figura 28: curva di taratura dei silicati.

Si (mg/L)	Abs
0.00	0.001473
0.14	0.083197
0.28	0.168792
0.42	0.251785
0.56	0.337509
0.85	0.505125
1.40	0.843403

Figura 29: concentrazioni (mg/L) e rispettive assorbanze per curva di taratura.

Dalle assorbanze lette per il bianco e per le 3 soluzioni standard si è costruita una retta che mostra l'andamento lineare dell'assorbimento in funzione della concentrazione della silice (mg/L). Questa permette di ricavare dalle successive letture dei campioni la quantità di Si a seconda dell'assorbanza rilevata a 810 nm.

3) Per ogni campione sono stati prelevati 35 ml di acqua e versati in eppendorf sterili. In seguito sono stati aggiunti in ordine: 1 ml di reattivo molibdico, 10 min dopo 1 ml di acido ossalico, seguito immediatamente da 1 ml di soluzione di acido ascorbico.

Lo stesso procedimento si è seguito per 35 ml di acqua di mare sintetica, rappresentante il bianco.

Dopo 30 minuti sono state svolte le letture allo spettrofotometro a 810 nm, in cuvette di vetro da 1 cm., ricavando, grazie alla curva di taratura costruita precedentemente, la concentrazione in ppm di silice presente in ogni campione.

3.3 Analisi quali-quantitativa del fitoplancton.

L'analisi quali-quantitativa del fitoplancton è stata svolta presso la Fondazione Centro Ricerche Marine di Cesenatico sui campioni di acqua precedentemente fissati con una soluzione acida di Lugol.

Per prima cosa 25 mL del campione sono stati versati in un'apposita camera di sedimentazione e fatti riposare per almeno 12 ore (HELCOM, 2001), affinché tutte le cellule si siano depositate sul fondo (Tabella 6).

Tabella 6: Tempi di sedimentazione raccomandati per campioni fissati con soluzione di Lugol (HELCOM 2001).

Volume della camera (ml)	Altezza della camera (cm)	Tempo di sedimentazione (h)
10	1	3
25	2	8
50	5	12
50	10	24
100	20	48

Successivamente il fondo della camera di sedimentazione è stato ispezionato utilizzando un microscopio ottico invertito con contrasto in campo chiaro DIAVERT Leitz.

Si è cercato così di individuare e riconoscere, avvalendosi dell'uso di manuali, chiavi tassonomiche (es. Tomas, 1996) e dell'esperienza del personale, a livello specifico e quando non possibile a livello di genere, il microfitoplancton (dimensioni comprese tra 20-200 μm).

Una volta riconosciute le specie presenti si è passati al conteggio seguendo la metodica di Utermöhl (1958) e inserendo i dati ottenuti da quest'analisi in un database appositamente creato in Excel.

Essendo una componente significativa, inoltre, è stato conteggiato anche il nanoplankton (dimensioni che variano tra 2 e 20µm) non facendo distinzione di specie o genere per via delle sue dimensioni ridotte.

3.3.1 Metodica di Utermöhl (1958) per il conteggio del fitoplancton.

Il conteggio delle cellule può essere effettuato: per campi casuali, transetti, oppure sull'intera camera di sedimentazione.

La scelta della tecnica avviene in base all'abbondanza della microalga da contare. Se questa è molto abbondante il conteggio viene effettuato per campi o transetti, mentre per abbondanze minori si analizza l'intero fondo.

3.3.1.1 Conteggio per campi casuali.

Utilizzando un obiettivo 32X si sono contate le cellule in un campo visivo scelto casualmente su tutto il fondo della camera di sedimentazione.

Questa operazione è stata ripetuta più volte fino a che non sono state contate complessivamente almeno 400 cellule della stessa specie; il numero dei campi casuali deve corrispondere almeno ad un centesimo dell'area totale del fondo.

Per calcolare poi la densità fitoplanctonica (espressa in cellule/L) è stata usata la seguente formula:

$$C = \frac{(N \cdot 1000 \cdot A)}{(n \cdot V \cdot a)}$$

Dove:

C= densità fitoplanctonica del campione, espressa come cellule/L;

N= totale cellule contate su tutti i campi;

A= area totale della superficie di fondo della camera (in mm²);

n= numero di campi sui quali si è effettuato il conteggio;

V= volume in mL del campione sedimentato;

a= area del campo visivo (espressa in mm²).

3.3.1.2 Conteggio per transetti.

Utilizzando sempre l'obiettivo 32X si è effettuata la conta per “strisciata” di diametri ortogonali fra loro (Figura 30) della camera e passanti per il centro.



Figura 30: transetti ortogonali (HELCOM 2001).

In questo caso è stato necessario aumentare il numero delle coppie di transetti finché non sono state contate almeno 400 cellule in totale.

In questo caso la formula applicata è stata la seguente:

$$C = \frac{(N \cdot \pi \cdot r \cdot 1000)}{(2 \cdot h \cdot V \cdot n)}$$

Dove:

C= densità fitoplanctonica del campione, espressa come cellule/L;

N= totale cellule contate su tutti i transetti;

r = raggio (in mm) della camera di sedimentazione;

h= altezza (in mm) del transetto;

V= volume in mL del campione messo a sedimentare;

n= numero dei transetti sui quali si è effettuato il conteggio.

3.3.1.3 Conteggio sul fondo

In questo caso il conteggio è stato effettuato coprendo tutto il fondo, procedendo per strisciate parallele fra di loro (Figura 31).



Figura 31: "Strisciate" parallele (HELCOM 2001).

Per riportare la densità cellulare a litro si è applicata la seguente formula:

$$C = \frac{(N \cdot 1000)}{V}$$

Dove:

C= densità fitoplanctonica del campione espressa come cellule/L;

N= totale cellule conteggiate su tutto il fondo;

v = volume in ml del campione messo a sedimentare.

3.4 Analisi dei dati

I dati abiotici e biotici ottenuti dalle analisi descritte precedentemente sono stati registrati in appositi database Excel (ALLEGATO 1, ALLEGATO 2 e ALLEGATO 3), associandoli alla data di raccolta del campione, al punto di prelievo ed in seguito elaborati mediante analisi statistiche univariate e multivariate.

Per quanto riguarda le variabili di tipo abiotico, sono state considerate le concentrazioni dei nutrienti inorganici ($\mu\text{g/L}$) raggruppando i composti azotati sotto un'unica voce: DIN ($\mu\text{g/L}$), la temperatura ($^{\circ}\text{C}$), la salinità (psu) e il rapporto N/P.

Come variabili biotiche invece sono state considerate le abbondanze microalgali (cell/L) di quattro raggruppamenti principali: Diatomee, Dinoficee, Euglenoficee e Nanoplancton.

3.4.1 *Analisi univariate*

Le tecniche univariate consentono l'analisi di una variabile alla volta. L'ANOVA è stata applicata con un disegno ad una via con un fattore "Sito" fisso (2 livelli, DIGA SUD (D) e GEOMAR (G)) e le date di campionamento come repliche. Sono state confrontate lo stesso numero di date per entrambi i siti. Per fare ciò, non si è considerata per GEOMAR la data 18 ottobre 2013 in quanto si avevano nello stesso periodo 2 date ravvicinate di raccolta dei campioni.

L'ANOVA consente di individuare, se presenti, differenze significative fra i due siti.

Questa è stata svolta, utilizzando il software R (open source), sia per le variabili abiotiche che per quelle biotiche (ALLEGATO 4 e ALLEGATO 5).

Prima di sottoporre i dati a questa analisi statistica è stata testata l'omogeneità della varianza mediante il test C di Cochran, se questa risultava non omogenea i dati sono stati trasformati mediante radice quadrata.

3.4.2 *Analisi multivariate*

Le analisi statistiche multivariate permettono di operare un confronto tra tutti i campioni, considerando più variabili contemporaneamente.

In questo lavoro sono state utilizzate diverse tipologie di analisi al fine di indagare le variabili abiotiche, biotiche e la loro relazione.

Per la statistica multivariate ci si è avvalsi dell'uso del programma PRIMER 6+PERMANOVA (Clarke e Gorley, 2006; Anderson *et al.*, 2008).

3.4.2.1 Variabili biotiche

L'analisi delle variabili biotiche (abbondanze) è stata condotta dopo una trasformazione mediante radice quadrata, riducendo così il peso delle specie più abbondanti.

Dalla matrice di dati così trasformata si è ottenuta una matrice triangolare di similarità, calcolata utilizzando il complementare del coefficiente di dissimilarità di Bray-Curtis (Faith *et al.*, 1987).

$$S_{jk} = 100 \cdot \left(1 - \frac{\sum_{i=1}^{i=n} |X_{ij} - X_{ik}|}{\sum_{i=1}^{i=n} |X_{ij} + X_{ik}|} \right)$$

Dove:

X_{ij} = numero di individui della specie i-esima nel campione j-esimo;

X_{ik} = numero di individui della specie i-esima nel campione k-esimo.

È stato scelto questo indice perché è facilmente calcolabile ed essendo un rapporto è intrinsecamente standardizzato, inoltre non tiene conto della presenza dei doppi zeri.

Per rappresentare graficamente i risultati di similarità è stata applicata la tecnica di ordinamento dell'n-MDS (Multi Dimensional Scaling non metrico).

Questa consente di riportare su un piano bidimensionale i punti-campione in base ai valori di similarità per tutte le coppie di campioni, dopo aver trasformato la matrice triangolare di similarità in una matrice triangolare per ranghi.

Questo tipo di rappresentazione si ottiene attraverso un algoritmo complesso (Shepard-Kruskal) che consente di avere la minore distorsione nella rappresentazione della struttura multidimensionale dei punti-campione su un piano bidimensionale.

La stima della distorsione introdotta a causa della forzatura geometrica che proietta in due dimensioni le n-1 dimensioni richieste teoricamente per n campioni, è indicata dal valore di stress

Quest'ultimo valore è importante per valutare la bontà di rappresentazione dell'nMDS (Tabella 7) (Clarke, 1993).

Tabella 7: Limiti di interpretabilità dei valori di stress dell'nMDS (Clarke,1993).

Stress	Interpretabilità
0.00 - 0.05	Rappresentazione eccellente
0.05 - 0.10	Buon ordinamento, senza false deduzioni
0.10 - 0.20	Possibile compiere errori di interpretazione soprattutto nei dettagli
> 0.20	Non utilizzabile, possibili errori di interpretazione

Se lo stress ha un valore accettabile (inferiore a 0,20) si può considerare valida la rappresentazione e la si può leggere senza andare incontro a grossi errori (Tabella 7).

Per valutare se c'è concordanza fra i 2 siti (GEOMAR e DIGA SUD) nella distribuzione temporale in composizione e abbondanza dei 4 gruppi fitoplanctonici è stata adottata la procedura RELATE. (ALLEGATO 7)

Questa procedura opera un confronto tra differenti matrici ottenute sui medesimi oggetti, valutando il grado di correlazione tra i ranghi delle distanze e/o similarità tra gli stessi oggetti delle diverse matrici, utilizzando in questo caso il coefficiente di correlazione lineare non parametrico di Spearman. Il valore di Rho così ottenuto viene confrontato

con uno ricavato da una serie di permutazioni casuali dei valori delle due matrici ottenendo così l'associato valore di significatività (Clarke e Gorley, 2006).

3.4.2.2 Variabili abiotiche

Le variabili abiotiche: T (°C), salinità (psu), DIN (µg/L), fosfati (µg/L) e silicati (µg/L) sono state prima di tutto normalizzate.

In seguito per individuare come queste variabili descrivono i diversi campioni dei 2 siti nel tempo è stata utilizzata la tecnica multivariata della PCA (Principal Component Analysis).

Questa tipologia di elaborazione statistica utilizza l'indice di distanza euclidea (Clarke e Warwick, 1994).

$$d_{jk} = \sqrt{\sum_{i=1}^p (y_{ij} - y_{ik})^2}$$

La tecnica della PCA consiste nell'ordinare i punti-campione in un piano a due dimensioni restituendo un plot che rappresenti la distanza o meno dei campioni in funzione della distribuzione delle variabili prese in esame (Clarke e Gorley, 2006).

La bontà di rappresentazione di tale metodo è valutata mediante la varianza spiegata dei primi due assi. Un piano di best-fit che spiega almeno il 70% della variazione originale dei dati è considerato una rappresentazione più che soddisfacente della distribuzione dei punti campione sul piano bi-dimensionale.

3.4.2.3 Interazione fra le variabili biotiche e abiotiche

Per identificare quali variabili abiotiche, che descrivono le condizioni ambientali, spiegano il pattern di comunità fitoplanctoniche osservate, è stata effettuata la procedura BIO-ENV (Clarke e Ainsworth, 1993; Clarke e Warwick, 1994) (ALLEGATO 6).

Questa procedura compara 2 matrici di (dis)similarità, una per i dati biotici (ottenuta applicando l'indice di Bray-Curtis) e una per i dati abiotici (ottenuta applicando la distanza euclidea). A differenza della matrice di (di)similarità biotica (costruita una sola volta), quella abiotica viene calcolata per tutte le combinazioni delle variabili ambientali

per diversi gradi di complessità (prendendo cioè prima 1, poi 2, 3...variabili alla volta, in tutte le combinazioni) (Clarke e Ainsworth, 1993; Clarke e Warwick, 1994).

Per confrontare le matrici la procedura applica un coefficiente di correlazione per ranghi, nel caso specifico è stato utilizzato il coefficiente di Spearman (Kendall, 1970):

$$\rho_s = 1 - \frac{6}{N(N^2 - 1)} \cdot \sum_{i=1}^N (r_i - s_i)^2$$

Dove:

$$N = \frac{n \cdot (n - 1)}{2}$$

n = numero di campioni

r_i, s_i = elementi delle matrici per ranghi.

La stessa modalità di correlazione per ranghi (Spearman) è stata usata, avvalendosi del software STATISTICA (www.statsoft.com) per valutare le tipologie di eventuali correlazioni (e la loro intensità), esistenti fra le variabili biotiche a abiotiche (ALLEGATO 8).

3.4.3 *Indici di diversità*

Per descrivere la diversità, per ogni campione sono stati calcolati, utilizzando il software STATISTICA (www.statsoft.com) (ALLEGATO 9):

- numero dei taxa
- numero di individui
- indice di Shannon (H') (1948)
- indice di Evenness o equiripartizione di Pielou (J) (1969)

3.4.3.1 *Indice di Shannon (H)*

L'indice di Shannon è uno tra gli algoritmi maggiormente usati negli studi ecologici e viene calcolato come:

$$H' = - \sum_{i=1}^s p_i \cdot \log_2(p_i)$$

Dove:

p_i = frequenza relativa della specie i-esima nella comunità, misurata come rapporto tra il numero di individui della specie i ed il numero totale di individui.

s = numero di specie

Questo varia da 0 all' ∞ , maggiore è il valore che assume maggiore è la diversità della comunità che va a descrivere e a causa della presenza del logaritmo tende a dare peso anche alle specie rare (Magurran, 1988).

3.4.3.2 Indice di Evenness (J)

L'indice di uniformità o equiripartizione di Pielou (1969) viene calcolato come:

$$J = \frac{H'}{H'_{max}} = \frac{(\sum_{i=1}^s p_i \cdot \log_2(p_i))}{\log_2 S}$$

Dove:

H' = indice di diversità di Shannon

H'_{max} = valore massimo di diversità calcolata utilizzando l'indice di Shannon

p_i = frequenza relativa della specie i-esima nella comunità, misurata come rapporto tra il numero di individui della specie i ed il numero totale di individui.

Questo indice varia da 0 a 1, dove 0 indica la presenza di un'unica specie e 1 indica che tutte le specie presenti hanno uguale abbondanza.

Quindi valori prossimi allo zero identificano comunità caratterizzate da taxa dominanti, mentre i valori vicini a 1 sono tipici di comunità ben equiripartite (Rossi e Giavelli, 1983).

4. RISULTATI E DISCUSSIONE

In questo lavoro di tesi sono state condotte, su campioni di acqua di mare prelevata da due siti prospicienti Marina di Ravenna (costa emiliano-romagnola), analisi:

- a) per la determinazione dell'abbondanza del nanoplancton (2-20 μ m) e dei vari taxa di microfitoplancton (20-200 μ m);
- b) di parametri abiotici quali: nutrienti inorganici, temperatura ($^{\circ}$ C) e salinità (psu).

I due siti considerati si distinguono geograficamente per la distanza dalla costa; uno si trova a circa 1,5 Km (DIGA SUD) da questa e uno a 12 Km (GEOMAR). I prelievi in entrambe le aree di campionamento sono stati effettuati a una profondità di 0.5-1.0 m dalla superficie, in date comprese nel periodo fra aprile 2013 e ottobre 2013.

I dati ottenuti dalle analisi sono stati inseriti in matrici Excel (ALLEGATO 1, ALLEGATO 2 e ALLEGATO 3), ed analizzati avvalendosi di elaborazioni grafiche e di strumenti statistici per estrapolarne diverse informazioni.

4.1 Variabili abiotiche

4.1.1 Temperatura e salinità

I parametri di temperatura ($^{\circ}$ C) e salinità (‰) sono riportati in funzione del tempo, rispettivamente, nelle Figure 32 e 33.

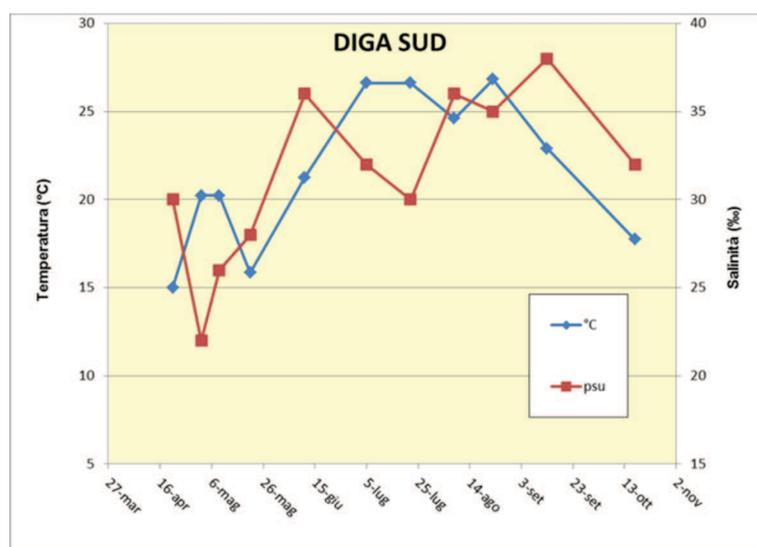


Figura 32: valori di temperatura ($^{\circ}$ C) e salinità (‰) nel tempo per il sito DIGA SUD.

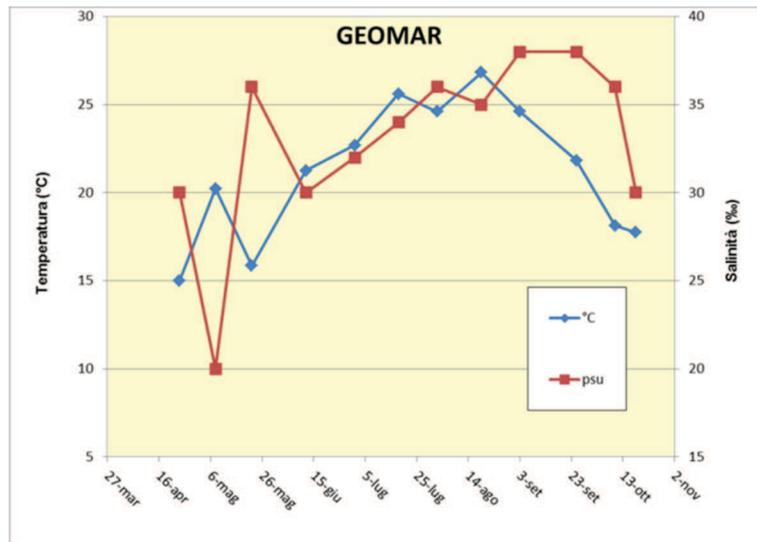


Figura 33: valori di temperatura (°C) e salinità (‰) nel tempo per il sito GEOMAR.

La temperatura, sia nel sito DIGA SUD che in GEOMAR mostra un andamento variabile in accordo con le stagioni, in quanto, partendo da temperature mediamente basse in primavera (15°C), si ha un aumento di queste nel periodo estivo (max. 26.6°C) seguito da un calo in quello autunnale (min. 17,6°C).

Nel periodo primaverile, ad inizio maggio, in entrambe le aree campionate si è avuto un picco isolato di aumento della temperatura (20°C), la quale si è nuovamente abbassata a fine maggio.

Anche la salinità mostra un andamento in entrambi i siti in accordo con le stagioni, in quanto tende ad essere bassa in primavera, periodo in cui si hanno frequenti precipitazioni e maggiori portate fluviali, e ad aumentare nel periodo estivo (con un valore max di 38‰), in seguito a una probabile maggiore siccità, per poi diminuire nuovamente in autunno (valore min di 30‰).

La salinità, in corrispondenza del picco isolato di aumento della temperatura a maggio, mostra una diminuzione, raggiungendo il valore minimo registrato per tutto il periodo dello studio (circa 20‰). Questo avviene sia nel sito DIGA SUD che in GEOMAR.

I grafici mostrano in media valori (Figura 32 e Figura 33) simili per tutti e due i parametri nei due siti, similarità confermata anche dall'analisi statistica ANOVA (ALLEGATO 4) che non evidenzia differenze significative ne per la temperatura ($F = 0,0739$; $p=0,7885$), ne per la salinità ($F = 0,2709$; $p= 0,6085$).

Secondo Russo (Russo e Artegiani 1996) 38‰ è il valore medio di salinità delle acque superficiali dell'Adriatico settentrionale, ma questo valore è fortemente influenzato (specialmente nella costa nord-ovest) dall'apporto di fiumi come il Po e l'Adige.

Il fiume Po ha una portata media di circa 1492 m³/sec, con valori più elevati nelle stagioni intermedie, primavera e autunno (rispettivamente 1685 e 1673 m³/sec) e più bassi nelle stagioni estreme: estate e inverno (medie rispettive: 1323 e 1283 m³/sec) (Franco 1973).

Visto il trend, che caratterizza la salinità nelle due aree di studio, risulta chiaro che la forte affluenza di acque dolci abbassa i valori di questa variabile, soprattutto in primavera e in autunno.

4.1.2 Nutrienti inorganici

Le concentrazioni dei nutrienti (µg/L) sono state riportate in funzione del tempo per entrambi i siti, sommando in tutte le date le diverse forme azotate presenti e indicandole come DIN (azoto inorganico disciolto in µg/L) (Figura 34 e Figura 35).

Per quanto riguarda quest'ultime la componente preponderante è rappresentata dai nitrati (N-NO₃-), seguiti poi da: nitriti (N-NO₂-) e ammonio (N-NH₃).

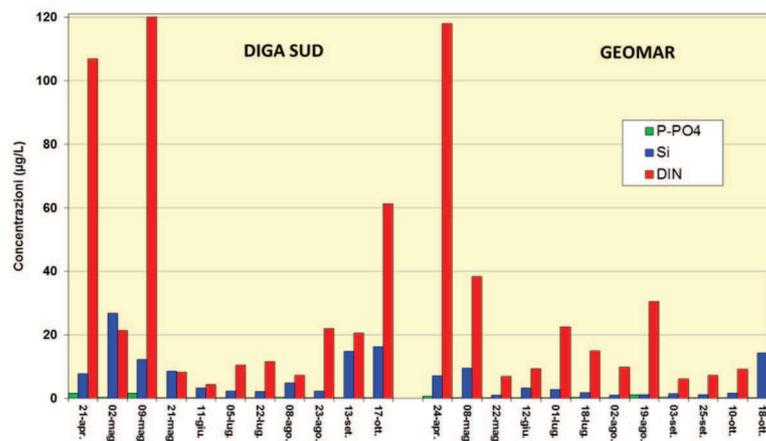


Figura 34: concentrazioni (µg/L) dei 3 macronutrienti nel tempo nei siti GEOMAR e DIGA SUD.

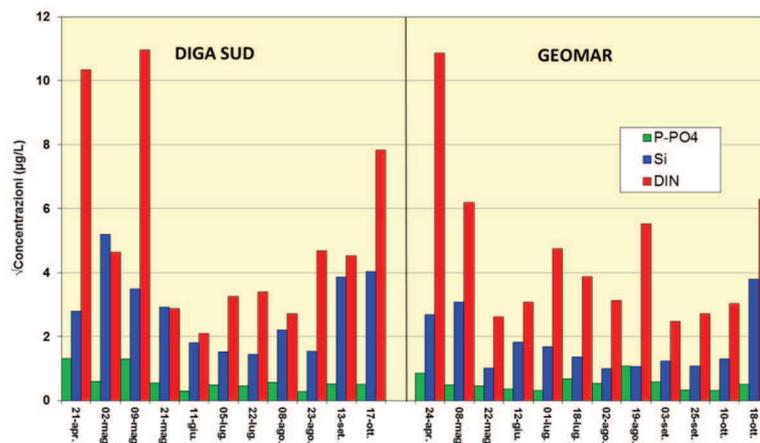


Figura 35: concentrazioni ($\mu\text{g/L}$) dei 3 macronutrienti, trasformate secondo radice quadrata, nel tempo nei 2 siti DIGA SUD e GEOMAR.

Fra le tre tipologie di nutrienti quella che raggiunge concentrazioni maggiori è rappresentata dal DIN ($4\text{-}120 \mu\text{g/L}$), seguita dai silicati ($1\text{-}27 \mu\text{g/L}$), mentre i fosfati rimangono sempre molto bassi ($0.08\text{-}1,72 \mu\text{g/L}$) (Figura 34).

Per quanto riguarda le concentrazioni della silice e delle forme azotate queste tendono nel tempo a seguire lo stesso andamento in entrambi i siti, mostrando entrambe picchi di massima concentrazione (più rilevanti per il DIN) in primavera, mentre in estate i valori diminuiscono e rimangono bassi fino a fine agosto (Figura 34).

In seguito, nel periodo autunnale, si ha nuovamente un aumento di questi due macronutrienti dove però i livelli massimi di silice e di DIN rimangono inferiori a quelli raggiunti in primavera.

I valori delle concentrazioni primaverili ($26 \mu\text{g/L}$) ed estive ($2 \mu\text{g/L}$) dei silicati, differiscono in maniera meno marcata rispetto a quanto accade per quelle del DIN ($120 \mu\text{g/L}$ a maggio e $4 \mu\text{g/L}$ a giugno).

In media le concentrazioni dei nutrienti risultano essere simili nei due siti, similarità comprovata dall'analisi statistica ANOVA (ALLEGATO 4), la quale non mostra differenze significative fra DIGA SUD e GEOMAR per nessuno dei tre macronutrienti: DIN ($F= 0.2605$; $p = 0,6153$), fosfati ($F = 0,4236$; $p= 0,5226$) e silicati ($F= 3,5716$; $p= 0,07336$).

Inoltre la silice risulta essere, anche se non in modo significativo ($F= 3,5716$; $p= 0,07336$), maggiormente abbondante vicino a riva (DIGA SUD) (Figura 36).

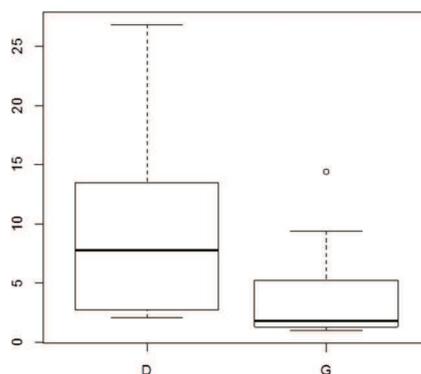


Figura 136: elaborazione grafica "Box Plot" ottenuta dai dati di concentrazione della Silice ($\mu\text{g/L}$) sia per il sito DIGA SUD (D) che per GEOMAR (G). Programma usato PRIMER6+PERMANOVA

I valori dei fosfati mantengono per tutto il periodo concentrazioni molto basse e non sembrano mostrare un chiaro andamento stagionale (Figura 35).

I risultati sono in accordo con la letteratura; secondo Franco (1983), nelle acque dell'Alto Adriatico non sottoposte all'afflusso dei fiumi i nutrienti sono presenti a basse concentrazioni (mediamente 3-4 $\mu\text{g/L}$ di nitrati, 0,1 $\mu\text{g/L}$ di fosfati e 2 $\mu\text{g/L}$ di Silicati), ma il Po riesce ad apportare concentrazioni medie di 85-90 $\mu\text{g/L}$ di DIN, 1,5 $\mu\text{g/L}$ di ortofosfato e 90 $\mu\text{g/L}$ di ortosilicati.

Si vede infatti che in primavera e in autunno, in corrispondenza agli aumenti di portata del fiume Po, aumentano notevolmente i nitrati e i silicati inorganici, mentre i fosfati rimangono sempre molto bassi.

4.1.3 Rapporto N/P

Il fitoplancton è caratterizzato da rapporti atomici tra carbonio, azoto e fosforo dati dal rapporto di Redfield: C:N:P=106:16:1 (Redfield *et al.*, 1963).

Il rapporto tra questi elementi nella biomassa fitoplanctonica viene espresso in moli e tende a rimanere pressoché costante.

Il fitoplancton ricava queste molecole dall'ambiente circostante e la sua crescita si fermerà quando avrà consumato in eccesso uno di questi elementi.

Una concentrazione carente nell'ambiente di un solo elemento del rapporto di Redfield è sufficiente per limitare la crescita del fitoplancton (legge di Liebig).

Il carbonio (C) non può essere un fattore limitante in quanto le fonti di generazione (rifornimento di CO₂ dall'atmosfera, processi respiratori, carbonati) sono sempre sufficienti a sostenere crescite fitoplanctoniche elevate.

Perciò per l'individuazione del fattore nutritivo limitante può essere utile esaminare il rapporto N:P. Se il rapporto N:P in un ambiente acquatico è superiore a 16 si afferma che il fosforo è il fattore limitante la crescita algale e l'azoto in eccesso presente nelle acque non può essere utilizzato dalle alghe. Viceversa un rapporto N:P minore di 16 indica che il fattore limitante è l'azoto.

Dai dati ottenuti da questo studio è stato osservato un rapporto N/P per i due siti sempre superiore a 16, con un valore minimo di 18 e massimo di 274 (ALLEGATO 3).

Il risultato ottenuto è in accordo con la letteratura, infatti secondo uno degli ultimi rapporti ARPA (2012), il mare Adriatico è caratterizzato da concentrazioni molto basse di fosforo inorganico con un rapporto N:P significativamente maggiore al rapporto di Redfield.

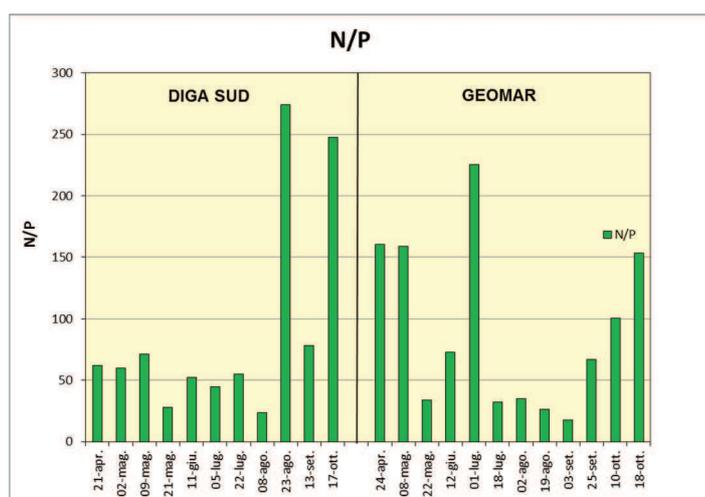


Figura 37: rapporto N/P nel tempo.

Analizzando gli andamenti di N/P nel tempo sia in DIGA SUD che in GEOMAR, si nota che questi mostrano in entrambi i siti un picco estivo, in agosto (Figura 37) per quanto riguarda DIGA SUD (274 il 23 agosto) e in luglio per GEOMAR (226 il primo luglio); questo è sicuramente legato ai periodi di minima portata del Po. Arrivando in mare meno fosforo (Franco, 1983), il rapporto N/P si alza.

In media l'analisi statistica ANOVA (ALLEGATO 4) non mostra differenze fra le due stazioni di campionamento per questa variabile con un F= 0,037 e p=0,8494.

4.1.4 Principal Component Analysis (PCA)

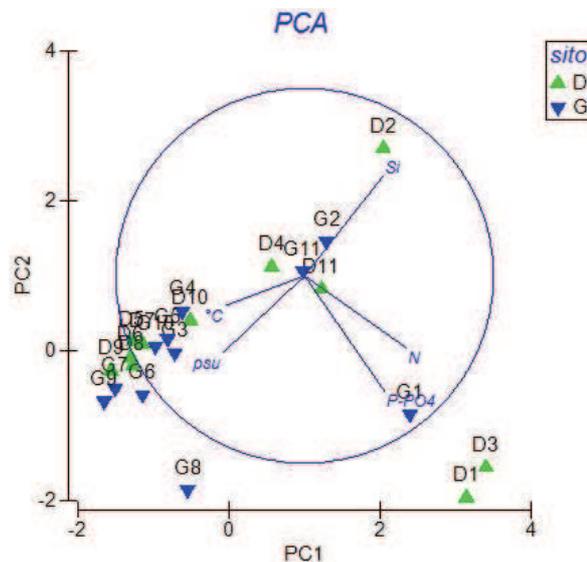


Figura 38: PCA condotta sui dati delle variabili abiotiche: DIN (N), fosfati (P-PO4), silicati (Si), salinità (psu) e temperatura (°C) di entrambi i siti (D e G) nelle diverse date (1,2,3.. ecc.).

La PCA (Figura 38) è un'analisi che consente di ordinare i punti-campione su di un piano a due dimensioni restituendo un plot che rappresenti la similarità o meno di questi in funzione alla distribuzione delle variabili prese in esame (Clarke e Gorley, 2006).

In questo caso sono state considerate le variabili abiotiche di ogni campione: DIN ($\mu\text{g/L}$), fosfati ($\mu\text{g/L}$), silicati ($\mu\text{g/L}$), salinità (psu) e temperatura ($^{\circ}\text{C}$), le quali sono state normalizzate prima di essere sottoposte a tale elaborazione.

I primi due assi (PC1 e PC2) della PCA ottenuta spiegano il 74% della varianza totale.

La varianza lungo il primo asse (PC1) è spiegata principalmente da sinistra verso destra da un aumento della temperatura ($^{\circ}\text{C}$), della salinità (psu) e da una diminuzione del DIN (N).

La variabilità lungo il secondo asse (PC2) è spiegata dall'alto verso il basso da una diminuzione dei silicati (Si) e da un aumento dei fosfati (P-PO4).

Dall'analisi del plot però non si evidenzia una distinzione netta fra i campioni raccolti in siti diversi, ma si può notare un effetto dovuto alla stagionalità.

4.2 Fitoplancton

L'analisi quali-quantitativa (ALLEGATO uno e ALLEGATO 2) ha messo in evidenza la presenza di 5 taxa principali di microfitoplancton (20-200 μm): Bacillariophyceae, Dinophyceae, Euglenophyceae, Coscinodiscophyceae, Fragilariophyceae e un'elevata quantità di nanoplancton (2-20 μm). Di quest'ultima componente fitoplanctonica tramite il microscopio ottico, viste le piccole dimensioni, non si è riusciti a determinare la tassonomia specifica e quindi è stata collocata nel complesso "Nanoplancton indeterminato".

Per quanto riguarda il microfitoplancton, i microrganismi conteggiati, per semplificare l'analisi dei dati, sono stati raggruppati sotto le rispettive classi. Gli individui appartenenti alle: Coscinodiscophyceae, Fragilariophyceae, e Bacillariophyceae sono stati inseriti tutti in un unico gruppo, quello delle Diatomee.

Il risultato sono quattro gruppi principali di appartenenza:

- Diatomee
- Dinophyceae
- Euglenophyceae
- Nanoplancton indeterminato

4.2.1 *Abbondanza percentuale dei principali componenti del fitoplancton.*

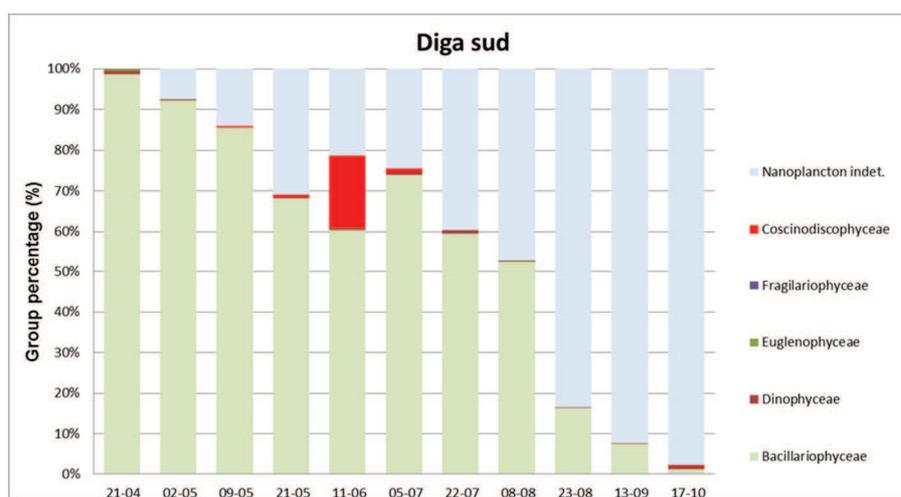


Figura 39: suddivisione percentuale dei gruppi fitoplanctonici nel tempo per DIGA SUD.

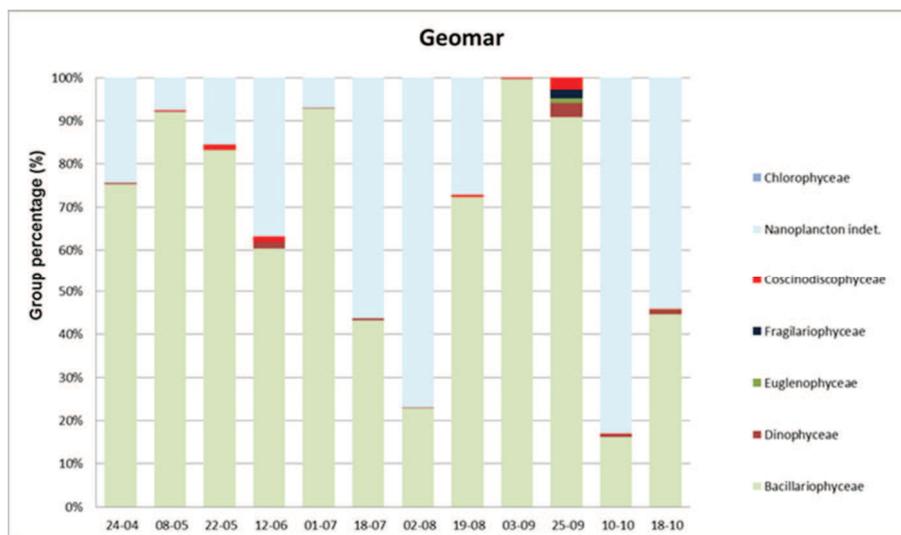


Figura 40: suddivisione percentuale dei gruppi fitoplanctonici nel tempo per GEOMAR.

Analizzando in entrambi i siti, per ogni data, la composizione percentuale dei diversi gruppi microalgali (Figura 39 e Figura 40) è emerso che le componenti numericamente preponderanti sono rappresentate dalle Diatomee, principalmente quelle appartenenti alla classe Bacillariophyceae, e dal Nanoplankton indeterminato.

Questi due raggruppamenti, in entrambi i siti, mostrano lo stesso andamento, ed è particolarmente lineare in DIGA SUD. Infatti si osserva chiaramente che le Bacillariophyceae, nel passaggio dalla primavera all'autunno, tendono a diminuire lasciando spazio al Nanoplankton che di controtendenza va verso l'aumento.

Questi risultati sono in accordo con quanto riportato nel rapporto annuale ARPA relativo al 2012 (ARPA 2013): la biomassa a carico del microfitoplancton (20-200 μm) è dominata durante tutto l'anno dalla classe delle Diatomee, le quali quantitativamente mostrano un decremento da inizio a fine anno, con un picco in primavera, abbondanze basse in estate e un ulteriore aumento in autunno. Il nanoplankton (indicato come altri fitoflagellati) invece tende ad aumentare in estate.

4.2.2 Rilevanza numerica del fitoplancton

Il gruppo tassonomico, fra i quattro esaminati, che raggiunge la maggiore abbondanza è rappresentato dalle Diatomee (Figura 46 e Figura 47).

Il fatto che sia proprio questo gruppo a guidare l'abbondanza totale del fitoplancton, per tutto il periodo e in entrambe le stazioni di campionamento, è dimostrato dai risultati ottenuti dalle correlazioni (Spearman Rank Order Correlations) studiate con il programma STATISTICA 10 (www.statsoft.com) (ALLEGATO 8) che hanno mostrato l'esistenza di

una fortissima correlazione positiva fra Diatomee e abbondanza totale, con $\rho=0,95$ ($p<0,05$)

L'abbondanza di questa componente tassonomica all'interno del periodo analizzato, considerando sia il sito DIGA SUD che GEOMAR, ha un andamento variabile che oscilla tra valori molto diversi con un minimo di 14500 e un massimo di circa 27 milioni cell/L (Figura 46 e Figura 47).

Studiando l'andamento delle abbondanze nel tempo, per questo gruppo tassonomico, si può notare un picco primaverile di crescita presente in entrambi i siti. In GEOMAR l'8 maggio si arriva ad avere circa 27,5 milioni di cell/L, mentre in DIGA SUD all'inizio dello stesso mese si arriva a un massimo di circa 11 milioni di cell/L.

Le Diatomee tendono a raggiungere valori di densità cellulare maggiori in GEOMAR (sito più lontano dalla costa) (Figura 41), soprattutto nei picchi di esplosione, ma la differenza per questa variabile fra i due siti non risulta significativa: $F= 0,2579$; $p= 0,6171$ (ANOVA, ALLEGATO 5).

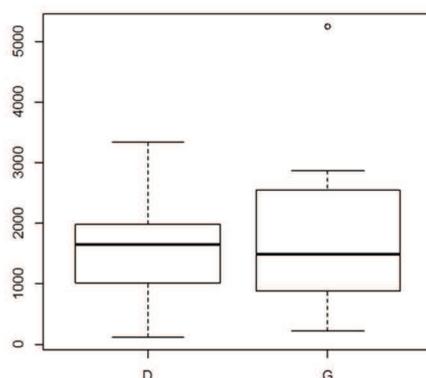


Figura 41: elaborazione grafica "Box Plot" ottenuta dai dati di abbondanza delle Diatomee (cell/L) sia per il sito DIGA SUD (S) che per GEOMAR (G). Programma usato PRIMER6+PERMANOVA.

Per quanto riguarda il Nanoplankton, questo gruppo di organismi di piccola taglia ma eterogeneo dal punto di vista della tassonomia, rappresenta il secondo gruppo di organismi fitoplanctonici maggiormente presente dopo le Diatomee. Nel periodo analizzato si osserva un range di abbondanza che va da un minimo di 0 (non è sempre presente) a un massimo di circa 3,3 milioni di cell/L, considerando entrambi i siti.

Quest'ultimo gruppo, analizzandone le dinamiche nel tempo, mostra un picco di abbondanza pari a 3,3 milioni di cell/L in data 23 agosto nel sito DIGA SUD, mentre in

GEOMAR il massimo valore si presenta l'8 maggio con circa 2,3 milioni cell/L (ALLEGATO 1 e ALLEGATO 2).

Il taxa delle Dinophyceae presenta, considerando la finestra di tempo oggetto di studio ed i risultati per entrambi i siti, variazioni di abbondanza che vanno da 3360 cell/L fino a un massimo di 157849 cell/L. La massima densità cellulare si raggiunge con quest'ultimo dato, in autunno presso il sito DIGA SUD (10-ott-2013), mentre in GEOMAR la si raggiunge ad inizio estate (12-giu-2013) arrivando a 122681 cell/L.

Le Euglenophyceae, rappresentano il gruppo tassonomico meno abbondante e la loro densità cellulare rimane sull'ordine di 10^2 - 10^3 cell/L, variando da 0 (non sono sempre presenti) a circa $19 \cdot 10^3$ cell/L. Studiando la loro abbondanza in funzione del tempo in entrambi i siti si vede un picco che arriva fino a 19123 cell/L in data 8 maggio nel sito GEOMAR, mentre in DIGA SUD, in data 21 aprile si arriva a 8560 cell/L. Probabilmente queste microalghe non crescono in mare, ma la loro presenza è associata all'apporto di acqua dolce.

4.2.3 Diversità specifica

Per quanto riguarda la diversità specifica, dallo studio quali-quantitativo del fitoplancton, è emerso che in DIGA SUD e in GEOMAR sono stati riscontrati, rispettivamente, 24 e 25 taxa di Diatomee e 38 e 37 di Dinophyceae (ALLEGATO 1 e ALLEGATO 2).

Ne risulta quindi che mentre le Diatomee sono più abbondanti, le Dinophyceae presentano invece una maggiore diversità specifica.

Questo è stato riscontrato anche in letteratura: Cabrini *et al.* (2009), per quanto riguarda la costa montenegrina/albanese, asserisce che la comunità fitoplanctonica, in termini di ricchezza specifica, è composta prevalentemente da dinoficee, presenti con il maggior numero di taxa sia in maggio (58) che in giugno (25), rispetto alle diatomee (27 taxa in maggio e 10 in giugno).

Analizzando i risultati ottenuti dal calcolo degli indici di diversità, in particolare riferendosi all'indice di Uniformità (Evenness) di Pielou (1969) (ALLEGATO 9) si può asserire che variando da 0.104 a 0.464 considerando tutti i campioni raccolti nelle diverse date sia per DIGA SUD che per GEOMAR, non c'è equiripartizione degli individui fra le specie. Tendono quindi ad essere maggiormente abbondanti alcune specie di microalghe rispetto ad altre (specie rare).

Fra le Dinophyceae, le specie e i generi riscontrati in entrambi i siti (DIGA SUD e GEOMAR), che mostrano la loro presenza per quasi tutto il periodo delle analisi, sono rappresentati da (Figura 43 e 45) (ALLEGATO 1 e ALLEGATO 2):

- *Gyrodinium* spp.
- *Scrippsiella* spp.
- *Prorocentrum micans*
- *Prorocentrum cordatum*
- *Protoperidinium* spp.
- *Heterocapsa* spp.

Nel periodo primaverile e a inizio estate inoltre si ha la presenza sia in DIGA SUD che in GEOMAR di *Polykrikos* spp.

All'interno dell'intervallo temporale delle analisi non sono stati evidenziati particolari andamenti stagionali delle singole specie di Dinophyceae e risulta difficile per questo individuare particolari interazioni biologiche (ad es. di tipo alleopatico) fra queste.

Stessa osservazione è stata fatta per le Diatomee. D'altro canto, come riportato in letteratura da Pugnetti *et al.*, (2007), negli ambienti marino costieri l'abbondanza e la composizione del fitoplancton sono caratterizzati da un elevato grado di variabilità spazio-temporale: la complessità di queste aree per l'alta variabilità dei fattori ambientali e delle risposte delle comunità può rendere talvolta difficoltoso definire un ciclo annuale regolare del fitoplancton.

Le specie di Diatomee presenti per quasi tutto il periodo (aprile-ottobre) in entrambi i siti sono rappresentate da (Figura 42 e Figura 44) (ALLEGATO 1 e 2):

- *Chaetoceros* spp.
- *Cyclotella* spp.
- *Dactyliosolen* spp.
- *Cylindrotecha closterium*
- *Thalassionema nitzschioides*
- *Pseudo-nitzschia* spp.

In ottobre, in corrispondenza dell'ultima data di campionamento, è da segnalarsi una fioritura di *Lioloma elongatum*. Inoltre, a fine primavera ed inizio estate, in DIGA SUD,

si è osservata la cospicua presenza di *Bacteriastrium* spp. (con un massimo di $1 \cdot 10^6$ cell/L in DIGA SUD e di 98784 cell/L in GEOMAR), il quale invece, oltre che in questo periodo, nel sito GEOMAR è comparso anche in autunno.

Dall'analisi statistica RELATE (Clarke e Gorley, 2006) (ALLEGATO 7) si può dedurre che i 2 siti nel tempo, per quanto riguarda l'evoluzione temporale dell'abbondanza dei taxa presenti, siano significativamente correlati ($\rho = 0,583$ ($p < 0,01$)).

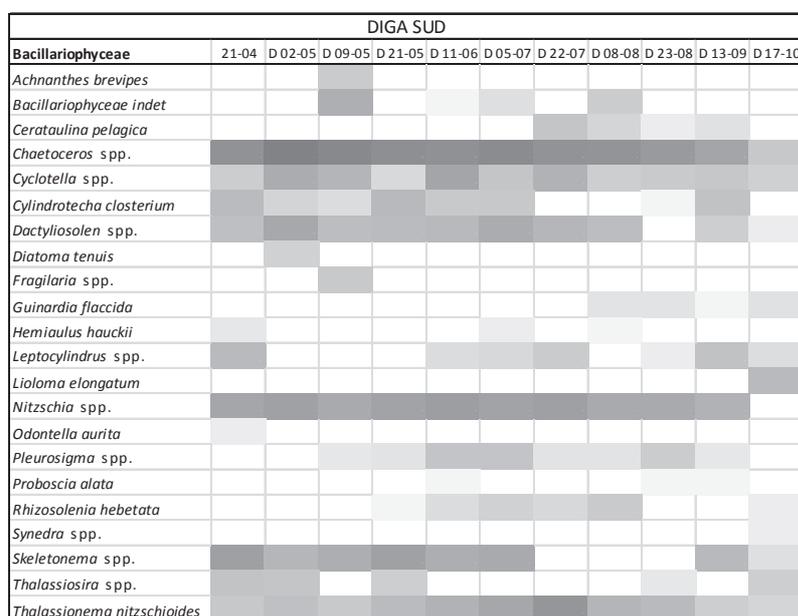


Figura 42: abbondanza specifica delle Bacillariophyceae in DIGA SUD espressa come gradazione di colore. Tonalità di grigio più scuro indicano valori di cell/L più elevati. Le abbondanze considerate nella scala cromatica vanno da un minimo di 40 cell/L a un massimo di $10\,706\,015$ cell/L.

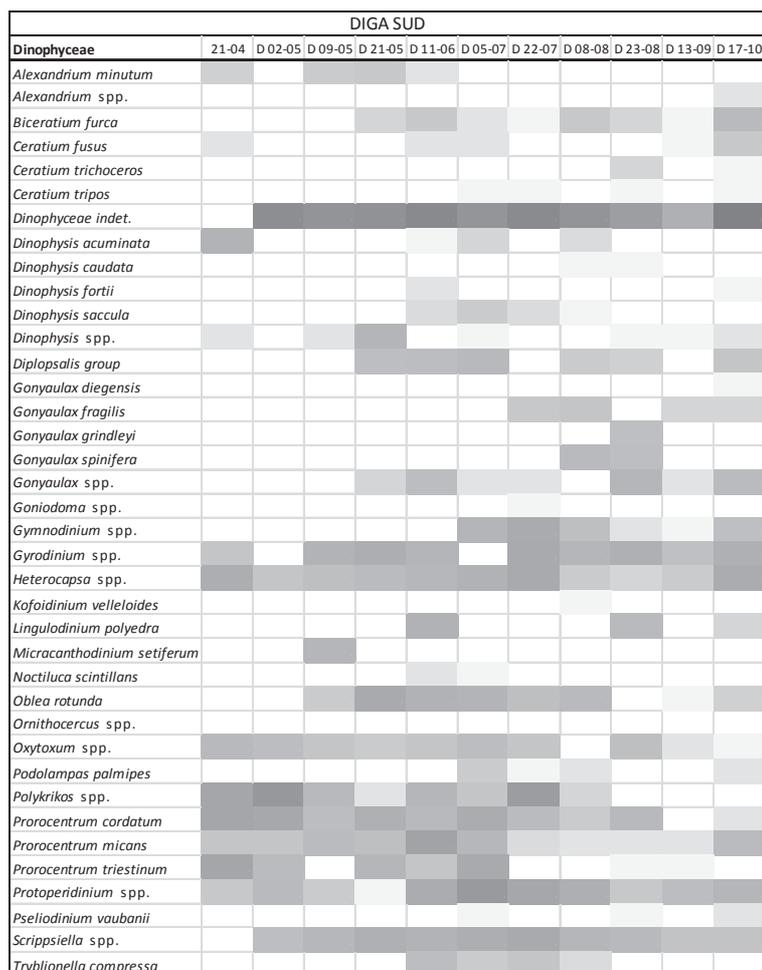


Figura 43: abbondanza specifica delle Dinophyceae in DIGA SUD espressa come gradazione di colore. Tonalità di grigio più scuro indicano valori di cell/L più elevati. Le abbondanze considerate nella scala cromatica vanno da un minimo di 40 cell/L a un massimo di 147 809 cell/L.

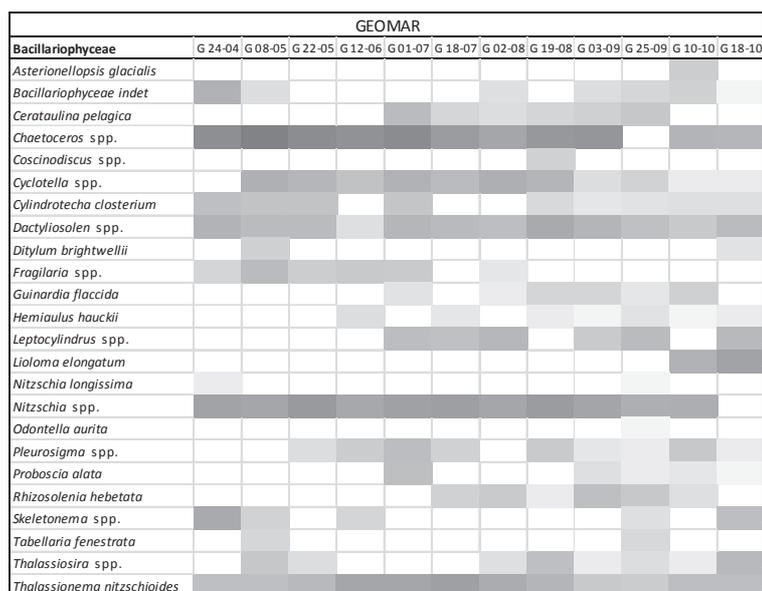


Figura 44: abbondanza specifica delle Bacillariophyceae in GEOMAR espressa come gradazione di colore. Tonalità di grigio più scuro indicano valori di cell/L più elevati. Le abbondanze considerate nella scala cromatica vanno da un minimo di 40 cell/L a un massimo di 27 211 735 cell/L.

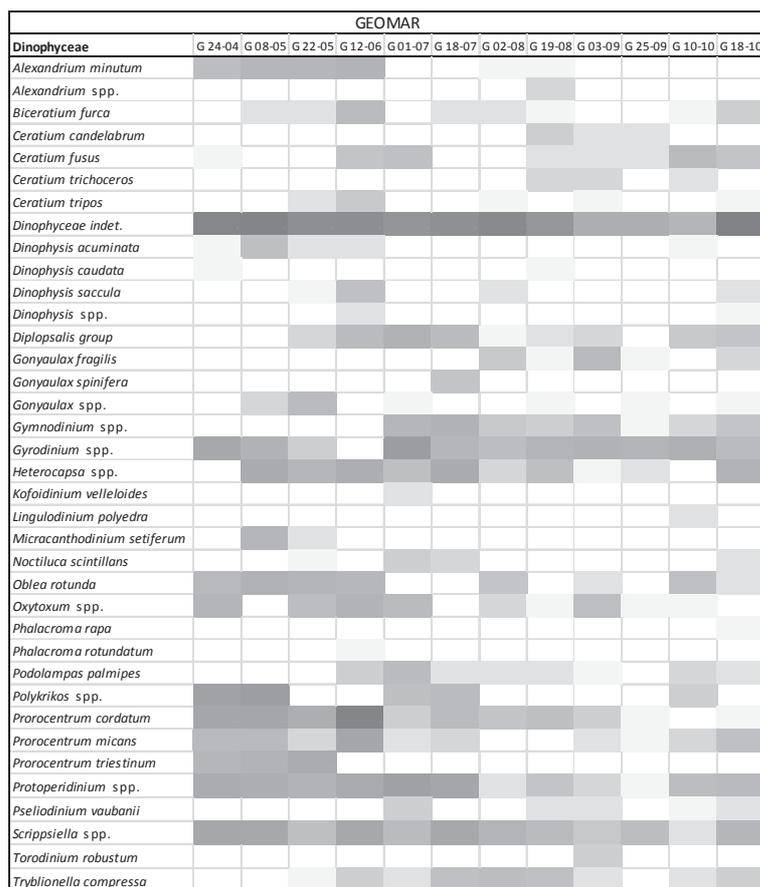


Figura 45: abbondanza specifica delle Dinophyceae in GEOMAR espressa come gradazione di colore. Tonalità di grigio più scuro indicano valori di cell/L più elevati. Le abbondanze considerate nella scala cromatica vanno da un minimo di 40 cell/L a un massimo di 84'292 cell/L.

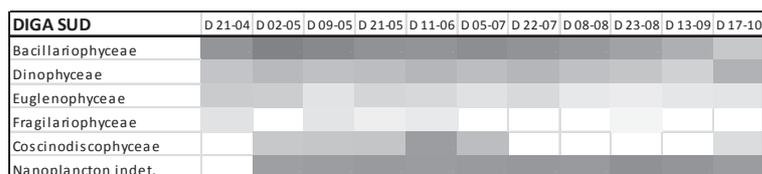


Figura 46: abbondanza specifica dei diversi taxa di microfitoplancton e del Nanoplankton in DIGA SUD espressa come gradazione di colore. Tonalità di grigio più scuro indicano valori di cell/L più elevati. Le abbondanze considerate nella scala cromatica vanno da un minimo di 40 cell/L a un massimo di 11'088'468 cell/L.

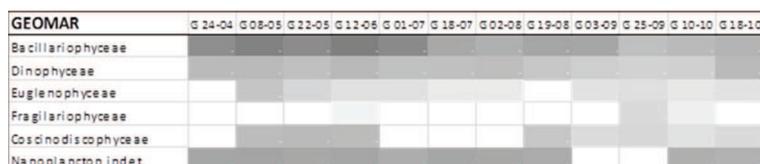


Figura 47: abbondanza specifica dei diversi taxa di microfitoplancton e del Nanoplankton in GEOMAR espressa come gradazione di colore. Tonalità di grigio più scuro indicano valori di cell/L più elevati. Le abbondanze considerate nella scala cromatica vanno da un minimo di 40 cell/L a un massimo di 351'003'710 cell/L.

4.2.4 Specie potenzialmente tossiche rilevate

Sia nel sito più prospiciente alla costa (DIGA SUD) che in quello più distante (GEOMAR) sono state individuate delle microalghe potenzialmente tossiche.

In entrambe le stazioni di campionamento, per quasi tutto il periodo di studio, si è avuta la presenza di Bacillariophyceae del genere *Pseudo-nitzschia* (Figura 50).

Questo gruppo fitoplanctonico comprende numerose specie produttrici di acido domoico (AD), una potente neurotossina che causa la sindrome “*Amnesic Shellfish Poisoning*” (ASP) nell’uomo e mortalità massiva in mammiferi e uccelli marini.

Fino ad ora in Adriatico, tra le specie associate alla sintesi di acido domoico sono state individuate: *P. multistriata* (Figura 49) (Pistocchi *et al.*, 2012), *P. galaxiae* (Figura 48), *P. delicatissima*, *P. pseudodelicatissima*, *P. fraudolenta* e *P. pungens* (Boni *et al.* 2005).

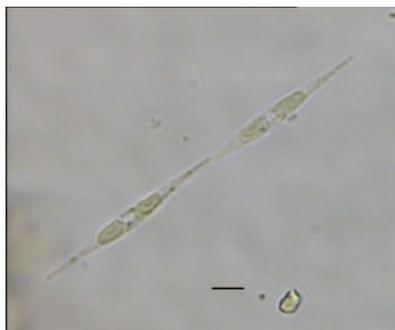


Figura 48: *Pseudo-nitzschia galaxiae*
N.Lundholm & Ø.Moestrup 2002. Foto
Fondazione Centro Ricerche Marine di
Cesenatico.



Figura 49: *Pseudo-nitzschia multistriata*
(Takano) Takano 1995. . Foto Fondazione
Centro Ricerche Marine di Cesenatico.

Probabilmente la continua presenza nel tempo, da aprile a settembre, del genere *Pseudo-nitzschia*. è dovuta alla capacità delle singole specie di adattarsi a specifiche condizioni ambientali e nel complesso, cambiando il *subset* delle specie presenti, il genere riesce a resistere ai cambiamenti dell'habitat.

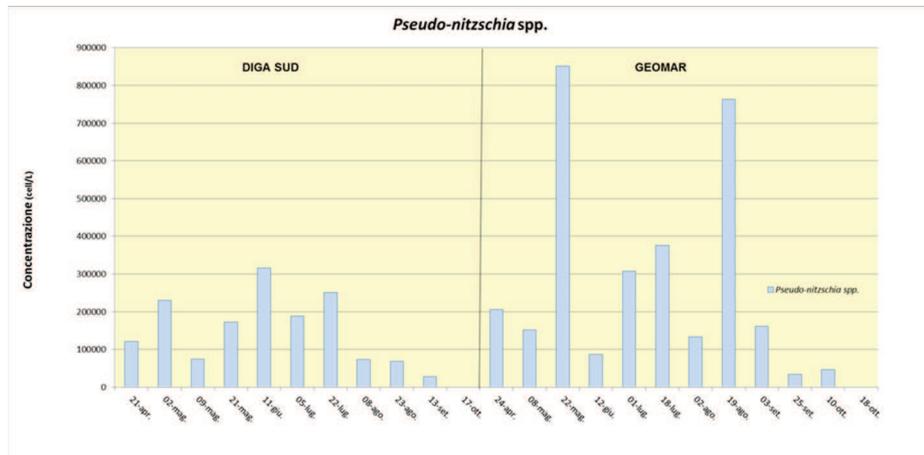


Figura 50: abbondanza (cell/L) di *Pseudo-nitzschia* spp.

Per quanto riguarda le Dinophyceae, all'interno di questo raggruppamento, sono state trovate 8 specie potenzialmente tossiche e una (*Gonyaulax fragilis*) associata alla formazione di *bloom* con sviluppo di mucillagine (Figura 51).

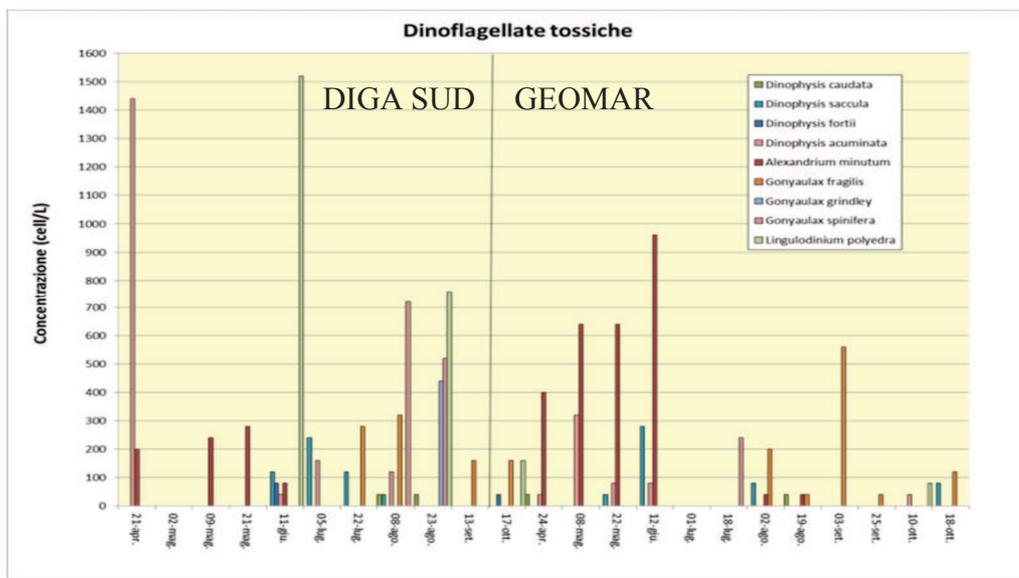


Figura 51: abbondanza (cell/L) per le 8 specie potenzialmente tossiche e per il *Gonyaulax fragilis*, a sinistra per DIGA SUD e a destra per GEOMAR.

Come potenziali produttrici di biotossine sono state individuate:

- *Alexandrium minutum* (Figura 52)

Presente in entrambi i siti nel periodo primaverile e di inizio estate. Questa specie è ritenuta responsabile nella produzione delle tossine per la sindrome paralitica da molluschi bivalvi (PSP) (Pistocchi *et al.*, 2012).



Figura 52: *Alexandrium minutum* Halim. .
Foto Fondazione Centro Ricerche Marine di Cesenatico.

- *Dinophysis spp.*

Di questo genere sono state ritrovate: *D. acuminata*, *D. caudata*, *D. fortii* e *D. sacculus* (Figura 53); tutte e quattro responsabili della produzione di acido okadaico (Reguera *et al.*, 2012). Queste compaiono a “spot” lungo tutto il periodo in date diverse per i due siti.



Figura 53: *Dinophysis sacculus* Stein. Foto Fondazione Centro Ricerche Marine di Cesenatico.

- *Gonyaulax spp.*

Di questo genere sono stati ritrovati: *G. grindleyi* (Figura 54) e *G. spinifera*, entrambi potenziali produttori di Yessotossine (Ciminiello *et al.*, 2003; Riccardi *et al.*, 2009). Il primo compare solo in DIGA SUD a fine estate, mentre *G. spinifera* compare a luglio in GEOMAR e ad agosto nel sito più vicino alla costa.

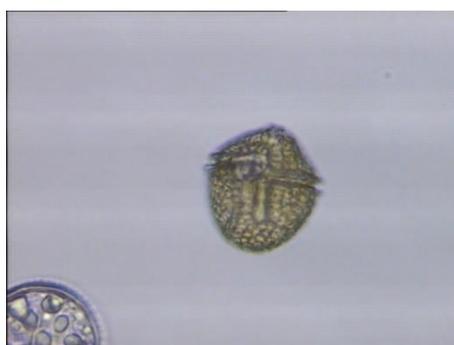


Figura 54: *Gonyaulax grindleyi* Reinecke

- *Lingulodinium polyedrum* (Figura 55)

Questa microalga produce homo-yessotossina (Riccardi *et al.*, 2009; Pistocchi *et al.*, 2012). Compare a spot in DIGA SUD nel periodo estivo e autunnale, mentre in GEOMAR si presenta solo in ottobre.



Figura 55: *Lingulodinium polyedrum* (F.Stein) J.D.Dodge

Studi pregressi effettuati sia in campo che in laboratorio hanno permesso di dimostrare che *Gonyaulax fragilis* possiede un ruolo rilevante nel determinare la comparsa delle mucillaggini lungo le coste del Nord Adriatico (Pompei *et al.*, 2003; Pistocchi *et al.*, 2005). In questo studio questa specie mostra la sua presenza a fine estate e nel periodo autunnale in entrambi i siti.

Le specie potenzialmente tossiche individuate corrispondono a quelle maggiormente riscontrate nell'Alto Adriatico, come riportato in letteratura. Secondo quanto riportato da

Pistocchi *et al.* (2012) si sono riscontrati diversi *taxa* già noti in Adriatico e tipici del periodo primavera-estate come ad esempio alcune Dinoficee come *Dinophysis* spp., *Lingulodinium polyedrum* (tutte potenzialmente produttrici di DST - Diarrhetic Shellfish Toxins), *Alexandrium* cf. *minutum* e *Alexandrium* spp. (potenzialmente produttrici di PST – Paralytic Shellfish Toxins). Tra le diatomee vengono segnalate diverse specie appartenenti al genere *Pseudo-nitzschia*, potenzialmente produttrici di AST (Amnesic Shellfish Toxins).

Nel 1995 è stata riscontrata per la prima volta la presenza di yessotossine in mitili dell'Adriatico settentrionale, la cui origine era associata principalmente a *Protoceratium reticulatum* (*G. grindley*) (Ciminiello *et al.*, 2003; Paz *et al.*, 2004), ma anche a *Lingulodinium polyedrum* (Paz *et al.*, 2004; Tubaro, 1998). Dal 2005 anche *Gonyaulax spinifera*, una specie piuttosto comune nei popolamenti adriatici, è stata associata alla produzione di yessotossine (Rhodes *et al.*, 2006; Riccardi *et al.*, 2009).

Per quanto riguarda *Gonyaulax fragilis* l'ultimo bloom è stato segnalato nel 2003 lungo le coste marchigiane nel mese di settembre (www.arpa.veneto.it/temi-ambientali/.../Convegno_ReMoPo_ICRAM.pdf), stesso periodo di comparsa riscontrato in questo studio.

4.2.5 Multidimensional scaling non metrico (nMDS)

Questa rappresentazione grafica, consente di riportare su un piano bidimensionale i punti-campione in base alla loro similarità in funzione delle variabili considerate.

In questo caso si è voluto indagare la similarità fra i campioni dei due siti nei tempi considerati in relazione alle variazioni di abbondanza e di diversità dei 4 gruppi fitoplacntonici considerati: Diatomee, Dinophyceae, Euglenophyceae e Nanoplancton.

Come detto precedentemente l'nMDS è stato costruito partendo dalla matrice triangolare di similarità per ranghi di abbondanza dei 4 macrogruppi fitoplanctonici trasformati con radice quadrata (Figura 56).

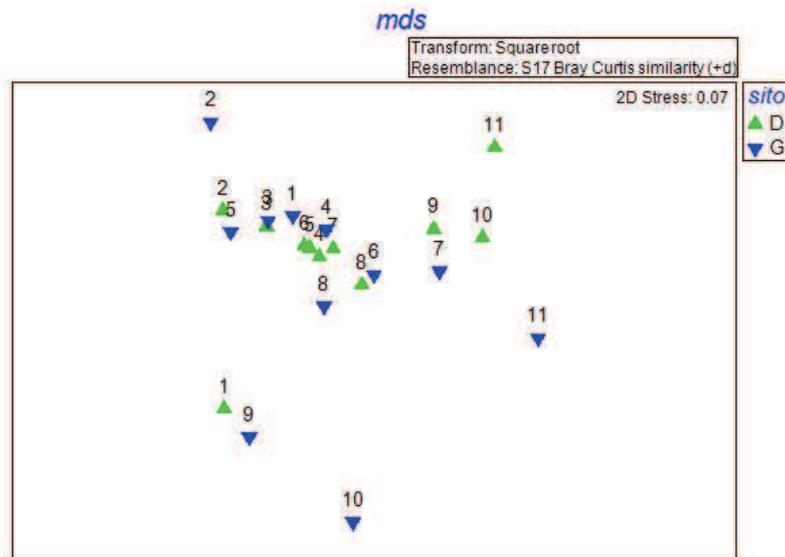


Figura 56: non metric MDS plot costruito tramite indice di Bray-Curtis calcolato sui dati di abbondanza dei 4 macrogruppi fitoplanctonici trasformati con radice quadrata.

Da questo si può notare che la maggior parte dei campioni sono simili, in termini di composizione tassonomica e abbondanza dei taxa, soprattutto nel primo periodo (primavera-estate). Nelle ultime 3 date invece, con l'arrivo dell'autunno i campioni dei 2 siti (9,10,11 di GEOMAR e di DIGA SUD) tendono a differenziarsi maggiormente.

4.3 Interazioni fra Fitoplancton e variabili abiotiche

Si è cercato, tramite analisi statistiche multivariate di individuare se la distribuzione delle comunità fitoplanctoniche fosse guidata in particolare da specifiche variabili abiotiche.

Per fare questo è stata svolta la procedura BIO-ENV (ALLEGATO 6), la quale mette in evidenza il subset di variabili abiotiche che meglio spiega il pattern di comunità osservato nei campioni.

Il risultato è una non significatività ($p=35\%$) nella correlazione fra le diverse variabili ambientali considerate e la distribuzione dei diversi taxa fitoplanctonici con le rispettive abbondanze nei campioni. Tuttavia dall'analisi si è rilevato che le variabili con maggior effetto di correlazione, anche se basso e non significativo ($\rho = 0,249$), risultano essere la Salinità (psu) e i Silicati (Si).

Dalle analisi effettuate con STATISTICA 10 (www.statsoft.com) (ALLEGATO 8) risulta infatti una correlazione negativa, anche se debole ($\rho = -0,57$ e $p=0,005$), fra la salinità e l'abbondanza di Diatomee (Figura 57 e Figura 58).

Anche l'abbondanza totale di microalghe mostra un risultato simile ($\rho = -0,56$ e $p = 0,005$), ciò è dovuto al fatto che la componente fitoplanctonica dei campioni è in maggior parte composta da Diatomee.

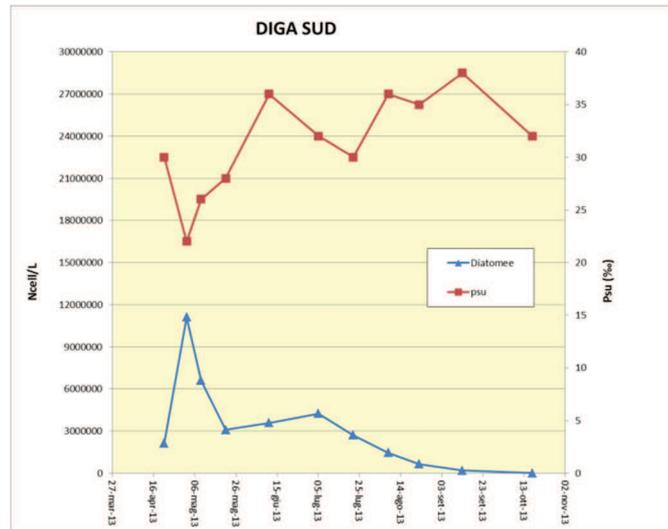


Figura 57: andamento temporale dell'abbondanza delle Diatomee (Cell/L) e della salinità (psu) in DIGA SUD.

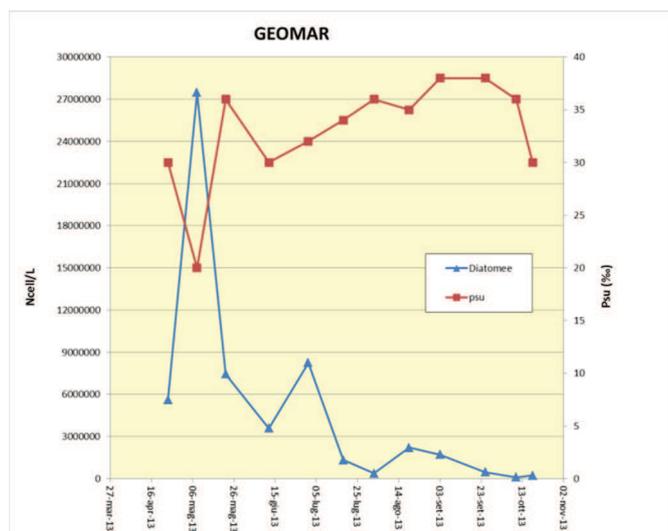


Figura 58: andamento temporale dell'abbondanza delle Diatomee (cell/L) e della salinità (psu) in GEOMAR.

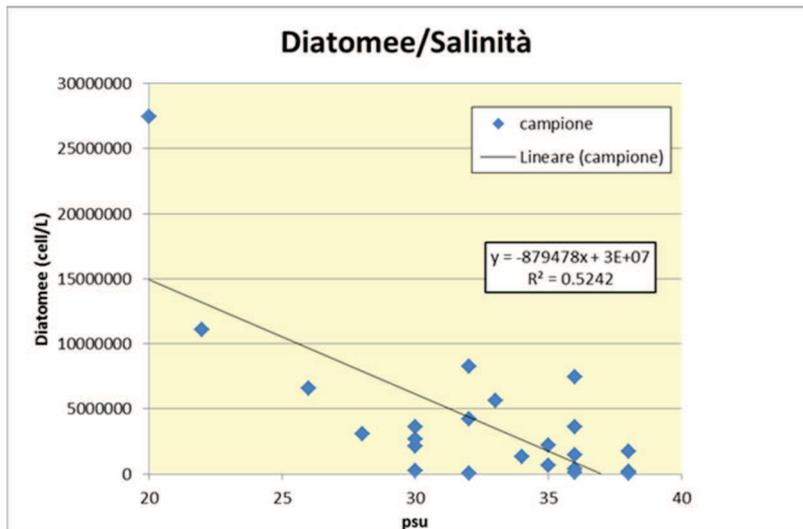


Figura 59: retta di correlazione abbondanza Diatomee (Cell/L) e salinità (psu) considerando entrambi i siti.

Probabilmente, la correlazione negativa (Figura 59) fra salinità e Diatomee può essere spiegata dalla crescita esplosiva di quest'ultimo gruppo in relazione all'aumento di nutrienti, i quali vengono portati dall'afflusso di acqua dolce derivante dal fiume Po. Infatti il picco di Diatomee, corrispondente alla diminuzione di salinità è maggiormente marcato in primavera, dove si ha anche un notevole aumento di Nitrati e di Silicati correlato a un aumento di portata del fiume Po.

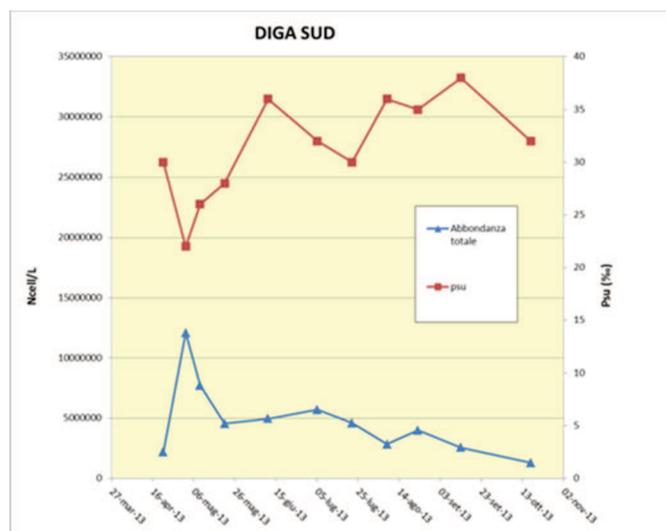


Figura 60 : andamento temporale dell'abbondanza totale fitoplanctonica (cell/L) e della salinità (psu) in DIGA SUD.

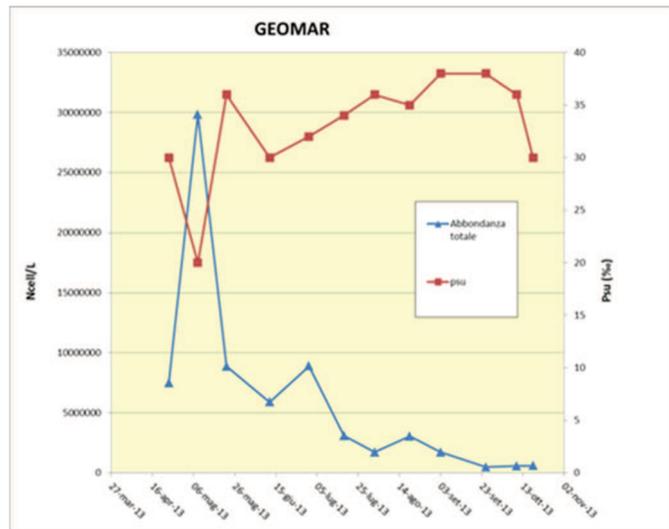


Figura 61: andamento temporale dell'abbondanza totale fitoplanctonica (cell/L) e della salinità (psu) in GEOMAR.

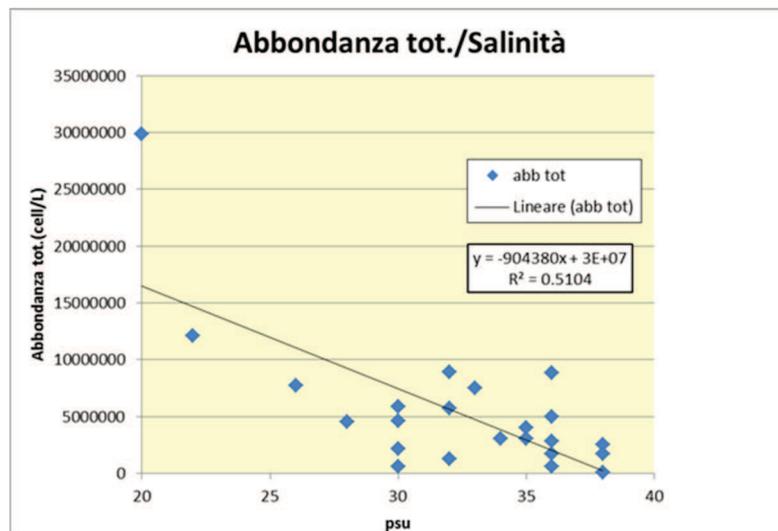


Figura 62: retta di correlazione abbondanza totale fitoplanctonica (Cell/L) e salinità (psu) considerando entrambi i siti.

Siccome l'abbondanza totale fitoplanctonica è guidata principalmente dalle Diatomee, risulta che anche questa sia correlata negativamente alla salinità (ALLEGATO 8) (Figura 62), mostrando un picco di crescita primaverile (Figura 60 e Figura 61) in corrispondenza dell'aumento di portata del fiume Po con un incremento di input di nutrienti (in particolare nitrati e silicati).

In accordo con la letteratura i processi eutrofici della costa emiliano romagnola sono strettamente connessi agli apporti dei bacini idrografici (Vollenweider *et al.* 1992).

5. CONCLUSIONI

In questo lavoro di tesi sono state condotte, per due siti prospicienti la località di Marina di Ravenna (costa emiliano-romagnola): DIGA SUD e GEOMAR, distanti rispettivamente 1.5 Km e 12 Km dalla costa, analisi quali-quantitative dei popolamenti fitoplanctonici presenti e concomitanti analisi dei parametri chimico-fisici (nutrienti, temperatura e salinità) dell'acqua. Il campionamento bimensile è iniziato ad aprile del 2013 e terminato ad ottobre dello stesso anno.

Dalle informazioni ottenute dalle suddette analisi, dopo elaborazione statistica dei dati, si evince che le due aree oggetto di studio: GEOMAR e DIGA SUD sono molto simili sia nei parametri chimico-fisici che caratterizzano l'acqua che nella composizione tassonomica del fitoplancton. Anche gli andamenti stagionali, nonostante le osservazioni siano state fatte solo per sei mesi, sembrano mostrare gli stessi trend nel tempo, sia per quanto riguarda le caratteristiche abiotiche che quelle biotiche considerate. Vista la breve finestra temporale studiata e l'elevata variabilità del sistema è difficile a livello specifico, per quanto riguarda il fitoplancton, definire degli andamenti stagionali, se non a grandi linee limitandosi a 4 raggruppamenti principali: Diatomee, Dinophyceae, Euglenophyceae e Nanoplancton.

In entrambe le aree di campionamento è stata osservata una chiara successione temporale tra Diatomee e Nanoplancton. Le prime tendono a diminuire verso il periodo autunnale lasciando spazio al secondo raggruppamento che, di controtendenza, aumenta.

I due siti analizzati sembrano essere entrambi influenzati dalle variazioni stagionali di portata del fiume Po, in quanto nel periodo primaverile, in corrispondenza all'aumento di deflusso di acqua dolce, si raggiunge sia in DIGA SUD che in GEOMAR, il valore minimo di salinità dell'acqua superficiale e la massima concentrazione di nutrienti (in particolare di nitrati).

Le due aree analizzate, inoltre, mostrano entrambe condizioni fosforo limitanti delle acque, caratteristica tipica dell'Adriatico settentrionale (Pojed e Kveder, 1977), in quanto si ha dalla primavera all'autunno un rapporto N/P sempre superiore a 16.

L'*input* di nutrienti in DIGA SUD e in GEOMAR, che sembra derivare dal Po, è come detto in precedenza maggiore nel periodo primaverile (maggio). Nello stesso mese si ha un'esplosione della crescita microalgale di cui l'abbondanza è guidata principalmente dalle Diatomee (27 milioni di cell/L).

Quest'ultimo gruppo tassonomico risulta essere in entrambi i siti quello che mostra i numeri maggiori, seguito dal Nanoplankton. Minore abbondanza si ha per le Dinoflagellate le quali mostrano, al contrario, maggiore ricchezza specifica. Le Euglenophyceae rimangono il gruppo numericamente inferiore, rispetto agli altri tre, sia in GEOMAR che in DIGA SUD.

In entrambe le aree compaiono, tra aprile ed ottobre 2013, specie fitoplanctoniche potenzialmente tossiche appartenenti al gruppo delle Diatomee e, in maggior numero, a quello delle Dinophyceae. Le prime sono rappresentate dal genere *Pseudo-nitzschia* che comprende specie in grado di produrre acido Domoico, una potente neurotossina che causa la sindrome "Amnesic Shellfish Poisoning" (ASP) nell'uomo e mortalità massiva in mammiferi e uccelli marini. Purtroppo il riconoscimento delle differenti specie di questa microalga è molto difficile tramite la sola analisi al microscopio ottico e oggi ci si sta spingendo sempre di più verso l'uso di tecniche biomolecolari (es. sonde molecolari per l'rRNA 18S (SSU) e 28S (LSU)) (Cugliari *et al.*, 2010). Attualmente in Alto Adriatico, area oggetto di studio, tra le specie del genere *Pseudo-nitzschia* associate alla sintesi di Acido Domoico sono state individuate: *P.multistriata* (Pistocchi *et al.*, 2012), *P. galaxiae*, *P.delicatissima*, *P.pseudodelicatissima*, *P. fraudolenta* e *P.pungens* (Boni *et al.* 2005). Tuttavia, nel periodo considerato, non è stata rilevata presenza di acido domoico nei mitili analizzati.

Per quanto riguarda il taxa delle Dinophyceae, come specie potenzialmente tossiche sono state individuate sia in DIGA SUD che in GEOMAR: *Alexandrium minutum* (PSP), microalghe del genere *Dinophysis* (DSP), *Gonyaulax grindley* (DSP, rilevato solo nel sito vicino alla costa), *G. spinifera* (DSP) e *Lingulodinium polyedrum* (DSP). Inoltre in entrambe le aree sono state ritrovate delle cellule di *Gonyaulax fragilis*, il quale possiede un ruolo rilevante nello determinare la comparsa delle mucillaggini lungo le coste del Nord Adriatico (Pompei *et al.*, 2003). Nel periodo considerato la presenza di queste specie ha avuto un andamento discontinuo e non è stato possibile correlarla a specifici parametri chimico-fisici né a particolari valori di rapporto N/P.

Il lavoro svolto in questa tesi si differenzia dal monitoraggio normalmente effettuato dalla struttura Oceanografica Daphne (ARPA) per la costa emiliano-romagnola, in quanto si è cercato di unire le informazioni di tipo biologico ottenute dall'analisi quali-quantitativa del fitoplancton a quelle di tipo chimico-fisiche sulle aree oggetto di studio; cercando di comprendere come le variazioni delle caratteristiche abiotiche dell'ambiente vadano ad influenzare la distribuzione dei diversi taxa fitoplanctonici.

Inoltre, si è cercato di individuare la presenza di interazioni fra le diverse specie di fitoplancton, partendo dal confronto della loro dinamica nel tempo. Tuttavia, per capire meglio gli andamenti e le correlazioni fra diversi fattori, sarebbe necessario condurre le analisi su tutto l'anno, e non solo per sei mesi, in modo da riuscire ad individuare eventuali ciclicità nella comparsa e scomparsa delle diverse specie.

La similarità delle due aree oggetto di studio, per quanto riguarda i popolamenti fitoplanctonici presenti e le caratteristiche fisico-chimiche dell'acqua, dovuta all'apporto di acqua dolce derivante dai fiumi in entrambe, suggerisce per la progettazione di studi futuri di scegliere distanze maggiori fra i siti di campionamento se si vuole confrontare due realtà maggiormente differenti e valutare quanto incida l'apporto di acqua dolce sulla composizione tassonomica della popolazione fitoplanctonica.

Questo lavoro di tesi vuole sottolineare l'importanza di approfondire le conoscenze del funzionamento dei sistemi ambientali marini per riuscire a progettare in un futuro efficienti piani di monitoraggio o di "risanamento" per mirare a mantenere o raggiungere un buono stato ecologico (GES) in accordo con la *Marine Strategy*. Inoltre si pone come trampolino di lancio per la progettazione di studi futuri maggiormente dettagliati che si concentrino sulla fascia costiera dell'Emilia-Romagna, situata nell'Adriatico settentrionale; un'area sensibile soggetta nel passato a frequenti eventi di eutrofizzazione, ma anche cardine principale dell'economia turistica del Paese.

6. BIBLIOGRAFIA

6.1 Libri e articoli

- Acri F., Alberighi L., Bertaggia R., Bastianini M., Bianchi F., Cavalloni B., Cassiani L., Cioce F., Lombardo I., Socal G., Stoppelli N., Trevisan M. 1994. **Caratteristiche idrologiche, chimiche e biologiche delle acque costiere della regione Veneto (anno 1990)**. *Acqua Aria*. 8: 711-718.
- Ade P., Funari E., Poletti R. 2003. **Il rischio sanitario associato alle tossine di alghe marine**. *Ann Ist Super Sanità*. 39(1): 53-68.
- Alberighi L., Bianchi F., Cioce F., Da Ros L., Socal G., Bertaggia R., Berti R., Pellizzato M. 1990. **Qualità delle acque marine di balneazione della regione Veneto. Idrologia, nutrienti disciolti e biomassa fitoplanctonica**. *Acqua aria*. 5: 469-475.
- Aligizaki K., Nikolaidis G. 2006. **The presence of the potentially toxic genera *Ostreopsis* and *Coolia* (Dinophyceae) in the North Aegean Sea, Greece**. *Harmful Algae*. 5: 717-730.
- Andersen P. 1996. **Design and implementation of some harmful algal monitoring systems**. IOC Technical Series vol.44 .Paris IOC-UNESCO. 102pp.
- Anderson D. M. 1989. **Toxic algal blooms and red tides: A global perspective**. In: T. Okaichi, D. M. Anderson, and T. Nemoto (ed.) *Red Tides: Biology, Environmental Science and Toxicology*. Elsevier, New York. 11-16.
- Anderson D.M., Kulis D.M., Sullivan J.J., Hall S., Lee C. 1990. **Dynamics and physiology of saxitoxin production by the dinoflagellates *Alexandrium* spp.** *Marine Biology*. 104:511-524.
- Anderson D. M. 1994. **Red tides**. *Sci. Am*. 271: 52-58.
- Anderson D.M., Glibert P.M., Burkholder J.M. 2002. **Harmful algal blooms and eutrophication: nutrient sources, composition, and consequences**. *Estuaries* 25 (4b): 562–584.
- Anderson M.J., Gorley R.N., Clarke K.R. 2008. **PERMANOVA+ for PRIMER: Guide to Software and Statistical Methods**.
- ARPA EMR. 2003. **Eutrofizzazione delle acque costiere dell'Emilia Romagna, Rapporto 2002**. P 4.
- ARPA EMR. 2012. **Programma triennale 2013-2015**. 13-15.
- ARPA EMR. 2013. **Qualità ambientale delle acque ,marine in Emilia Romagna, Rapporto annuale 2012**.

- Artegiani A., Bregant D., Paschini E., Pinardi N., Raicich F., Russo A. 1997. **The Adriatic Sea general circulation.** *Journal of Physical Oceanography* 27(8): 1492-1514.
- Bernardi A. F., Berton A., Bastianini M., Socal G., Acri F., 2004. **Phytoplankton succession in a coastal area of the NW Adriatic, over a 10-year sampling period (1990-1999).** *Cont. Shelf Res.* 24: 97-115.
- Boni L. 1983. **Red tides on the coast of Emilia Romagna (nord-western Adriatic sea) from 1975 to 1982.** *Inf. Bot. Ital.* 15:18-24.
- Boni L., Guerrini F., Pistocchi R., Cangini M., Pompei M., Cucchiari E., Romagnoli T., Totti C. 2005. **Microalghe tossiche del Medio ed Alto Adriatico. Guida per Acquacoltori e Operatori sanitari.** *Fernandel.*
- Cabrini M., Fornasaro D., Virgilio D., Campanelli A., Grilli F., Marini M. 2009. **Biodiversità del fitoplancton lungo la fascia costiera montenegrina/albanese.** *Biol. Mar. Mediterr.* 16 (1): 376-377.
- Caroppo C., Congestri R., Bruno M. 2001. **Dynamics of Dinophysis sensu lato species (Dinophyceae) in a coastal Mediterranean environment (Adriatic Sea).** *Continental Shelf Research.* 21(16-17):1839-1854.
- Chen Y.S., Zhou Y., Irvin C.M., Pierce R.H., Naar J., Backer L., Fleming L.E., Kirkpatrick B., and Baden D. 2005. **Characterization of marine aerosol for assessment of human exposure to brevetoxins** *Environ. Health Perspect.* 113: 638-643.
- 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.* 42: 7-14.
- Clarke K.R., Ainsworth M. 1993. **A method of linking multivariate community structure to environmental variables.** *Mar. Ecol. Progr. Ser.* 92: 205-219.
- Clarke K.R., Gorley R.N. 2006. **Primer v6 User Manual/Tutorial.**
- Clarke K.R., Warwick R.M. 1994. **Change in marine communities: an approach to statistical analysis and interpretation.** *Natural Environment Research Council,* Plymouth Marine Laboratory, UK.
- Congestri R., Penna A., Zingone A. 2006. **Bentox-net: a research and management initiative on ostreopsis spp. and other benthic microalgal blooms along the Italian coast.** *Harmful Algal News.* 32: 11-12.

- Cozzi S., Giani M. 2011. **River water and nutrient discharges in the northern Adriatic Sea: current importance and long term changes.** *Continental Shelf Research.* 31: 1881-1893.
- Cugliari D. , Ruffolo L. , Sarno D. , Koistra W. , Cozza R. 2010. **Identificazione di specie del genere Pseudo-nitzschia attraverso whole-cell FISH.** Contributo a Riunione annuale Algologia, Abano Terme - Padova, 22-23 ottobre 2010.
- Degobbis D., Gilmartin M., Revelante N. 1986. **An annotated nitrogen budget calculation for the northern Adriatic Sea.** *Marine Chemistry.* 20(2): 159-177.
- Degobbis D., Gilmartin M. 1990. **Nitrogen, phosphorus, and biogenic silicon budgets for the northern Adriatic Sea.** *Oceanologica Acta.*13(1): 31-45.
- Degobbis D., Precali, R., Ivancic, I. I., Smodlaka, N., Fuks, D., & Kveder, S. 2000. **Long-term changes in the northern Adriatic ecosystem related to anthropogenic eutrophication.** *Int. J. Environment and Pollution.*13(1-6):495-533.
- Deniges M.G.1920. **Reaction de coloration extrêmement sensible des phosphate et des arseniates.** *Ses applications. C.R. Acad. Sci., Paris,* 171: 802-804.
- Faith D.P., Minchin P.R., Belbin L. 1987. **Compositional dissimilarity as a robust measure of ecological distance.** *Vegatation.* 69: 57-68.
- Fonda Umani S., Franco P., Ghirardelli E., Malej A. 1992. **Outline of oceanography and plankton of the Adriatic Sea.** 347-365. In: Colombo G., Ferrari I., Ceccherelli V.U., Rossi R. Marine eutrophication and population dynamics. Proceedings of the 25th European Marine Biology Symposium. Ferrara, Italy, 10-15 September 1990. Olsen&Olsen. 395 pp.
- Franco P. 1970. **Oceanography of Northern Adriatic Sea. I – Hydrologic features: cruises july-august and october-november 1965.** *Arch. Oceanogr. Limnol.* 16 (Suppl.): 1 – 93
- Franco P. 1973. **L'influenza del Po sui caratteri oceanografici e sulla distribuzione della biomassa planctonica dell'Adriatico settentrionale.** *Studi e Ricerche sul Delta del Po.* Università di Ferrara. 95-117.
- Franco P., Socal G., Bianchi F. 1979. **Nutrienti e biomassa fitoplanctonica nell'Adriatico settentrionale. Crociere 1978.** In: *Atti Conv. P.F. Oceanogr. Fondi marini.* 47-59. Roma.
- Franco P. 1983. **L'Adriatico settentrionale: caratteri oceanografici e problemi.** *Atti 5° congresso AIOL.* Stresa. 1-27.

- Franco P. 1986. **Strutture di densità e processi di segregazione in Adriatico settentrionale.** *Nuova Thalassia*. 8(3):247-258.
- Franco P., Michelato A. 1992. **Northern Adriatic Sea: oceanography of the basin proper and of the western coastal zone.** *Science of The Total Environment* Suppl. 1992. 35-62.
- Garcés E., Masó M., Camp J. 1999. **A recurrent and localized dinoflagellate bloom in a Mediterranean beach.** *J. Plankton Res.* 24: 2373-2391.
- Garrett H.E., Walker A.J. 1964. **The spectrophotometric determination of silicic acid in dilute solution.** *Analyst*. 89: 642-650.
- Giacobbe M.G., Penna A., Gangemi E., Masó M., Garcés E., Fraga S., Bravo I., Azzaro F., Penna N. 2007. **Recurrent high-biomass blooms of *Alexandrium taylorii* (Dinophyceae), a HAB species expanding in the Mediterranean.** *Hydrobiologia*, 580: 125-133.
- Giani M., Rinaldi A., Degobbi D. 2005. **Mucilages in the Adriatic and Tyrrhenian Sea: An introduction: Mucilages in the Adriatic and Tyrrhenian Seas.** *Science of The Total Environment* 353 (1-3): 3-9.
- Gobler C.J., Lonsdale D.J., Boyer G.L. 2005. **A synthesis and review of causes and impact of harmful brown tide blooms caused by the alga, *Aureococcus anophagefferens*.** *Estuaries*, 28 (5): 726-749.
- Gomez F., Gorsky G. 2003. **Annual microplankton cycles in Ville- 'franche Bay, Ligurian Sea, NW Mediterranean.** *J. Plank. Res.* 25:323-339.
- Hach Company. 1996. **DR/2010 Spectromether handbook.** Loveland, Colorado (U.S.A.).
- Hallegraeff, G. M. 1993. **A review of harmful algal blooms and their apparent global increase.** *Phycologia*, 32, 79-99.
- Hallegraeff G. M. 1995. **Manual on Harmful Marine Microalgae, IOC Manuals and Guide.** No 33. Ed. Hallegraeff G. M., Anderson D.M., Cembella A.D, Enevoldsen H.O. Paris, UNESCO.1-22.
- Hallegraeff G.M. 2003. **Harmful algal blooms: a global overview.** In: *Hallegraeff GM, Anderson DM, Cembella AD (eds) Manual on harmful marine microalgae*, vol 11, 2nd edn. IOC-UNESCO. Paris. 25-49.
- Hallegraeff G.M. 2010. **Ocean climate change, phytoplankton community responses, and Harmful Algal Blooms: a formidable predictive challenge.** *J. Phycol.*, 46: 220-235.

- Heisler J., Glibert P., Burkholder J., Anderson D., Cochlan W., Dennison W., Gobler C., Dortch Q., Heil C., Humphries E., Lewitus A., Magnien R., Marshall H., Sellner K., Stockwell D., Stoecker D., Suddleson M. 2008. **Eutrophication and harmful algal blooms: a scientific consensus.** *Harmful Algae*. 8:3–13.
- HELCOM .2001. **Manual for Marine Monitoring in the COMBINE Programma of HELCOME.**
- Honsell G., Poletti R., Pompei M., Sidari L., Milandri A., Casadei C., Viviani R. 1996. ***Alexandrium minutum* Halim and PSP contamination in the northern Adriatic Sea** (Mediterranean Sea). In: Harmful and Toxic Algal Blooms. Yasumoto T., Oshima Y., Fukuyo Y. (Eds). *Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO 1996*. 77-80.
- ICRAM. 2001. **Metodologie analitiche di riferimento.** Programma di monitoraggio per il controllo dell'ambiente marino-costiero (triennio 2001-2003).
- ISPRA. 2013. **Proposte per la definizione del buono stato ambientale e dei traguardi ambientali.** 33-35.
- Kendall M.G. 1970. **Rank Correlation Methods (IV ed).** *Griffin and Co. Ltd.*
- Landsberg J.H. 2002. **The effect of Harmful Algal Blooms on aquatic organism.** *Fisheries Sciences*. 10 (2): 113-390.
- Landsberg J.H., Flewelling L.J., Naar J. 2009. ***Karenia brevis* red tides, brevetoxins in the food web, and impacts on natural resources: Decadal advancements.** *Harmful Algae*, 8: 598-607.
- Lindahl O., Lundve B., Johansen M. 2007. **Toxicity of *Dinophysis* spp. in relation to population density and environmental conditions on the Swedish west coast.** *Harmful Algae*. 6:218-231.
- Magurran A.E. 1988. **Ecological diversity and its measurement.** *Chapman and Hall*. 179 pp.
- Mangialajo L., Ganzin N., Accoroni S., Asnaghi V., Blanfuné A., Cabrini M., Cattaneo-Vietti R., Chavanon F., Chiantore M., Cohu S., et al. 2011. **Trends in *Ostreopsis* proliferation along the Northern Mediterranean coasts.** *Toxicon*. 57:408–420.
- Masò M., Garcés E. 2006. **Harmful microalgae blooms (HAB); problematic and conditions that induce them.** *Marine Pollution Bulletin*. 53: 620-630.

- Mauri E., Poulain P.-M. 2001. **Northern Adriatic Sea surface circulation and temperature/pigment fields in September and October 1997.** *Journal of Marine Systems*. 29: 51-67.
- Morris A.W., Riley J.P. 1963. **The determination of nitrate in sea water.** *Analytica Chim. Acta*, 29: 272-279.
- Mosetti F. 1984. **Caratteristiche fondamentali dell'idrologia dell'Adriatico.** *Bollettino di Oceanologia Teorica ed applicata* 2. 169-194.
- Paz B., Riobó P., Fernandez 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, 251–258.
- Penna A., Vila M., Fraga S., Giacobbe M.G., Andreoni F., Riobó P., Vernesi C. 2005. **Characterization of *Ostreopsis* and *Coolia* (Dinophyceae) isolates in the Western Mediterranean Sea based on morphology, toxicity and internal transcribed spacer 5.8S rDNA sequences.** *J. Phycol.* 41: 212–225
- Penna A., Bertozzini E., Battocchi C., Giacobbe M.G., Galluzzi L., Luglié A., Masò M., Prioli S., Milandri A., Pompei M., Magnani M., 2006. **Monitoraggio di aree costiere interessate da fioriture di fitoplancton tossico: approcci molecolari e nuove proposte di controllo.** *Biol. Mar. Medit* 13 (1): 1036-1038.
- Pistocchi R., Cangini M., Totti C., Urbani R., Guerrini F., Romagnoli T., Sist P., Palamidesi S., Boni L., Pompei M. 2005. **Relevance of the dinoflagellate *Gonyauax fragilis* in mucilage formations of the Adriatic Sea.** *Science of the Total Environment*. 353: 307-316.
- 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., Riccardi E. 2012. **Toxin levels and profiles in microalgae from the North-Western Adriatic sea-15 years of studies on cultured species.** *Marine Drugs* 10: 140-162.
- Pojed I., Kveder S. 1977. **Investigation of nutrient limitation of phytoplankton production in northern Adriatic.** *Rapp. P.-V. Reun. Comm. Int. Mer Mediterr.*, vol. 24, pp. 47-48, 1977.
- Poletti R., Milandri A., Pompei M. 2003. **Algal Biotoxins of Marine Origin: New Indications from European Union.** *Veterinary Research Communications*, Vol. 27 (1): 173- 182.

- Pompei M., Ghetti A., Milandri A., Mazziotti C. 1995. **Fioriture microalgali ed evoluzione dei principali popolamenti fitoplanctonici nelle acque costiere emiliano-romagnole dal 1982 al 1994**. In: *Regione Emilia Romagna & Autorità di bacino del Fiume Po* (eds.), *Evoluzione dello stato trofico in Adriatico: analisi degli interventi attuati e future linee di intervento*. 51-60.
- Pompei M., Mazziotti C., Guerrini F., Cangini M., Pigozzi S., Benzi M., Palamidesi S., Boni L., Pistocchi R., 2003. **Correlation between the presence of *Gonyaulax fragilis* (Dinophyceae) and the mucilage phenomena of the Emilia-Romagna coast (northern Adriatic Sea)**. *Harmful algae*, 2 (4): 301-316.
- Pugnetti A., Bastianini M., Acri F., Bernardi Aubry F., Bianchi F., Boldrin A., Socal G. 2007. **Comunità fitoplanctonica e climatologia nell'Adriatico Settentrionale**. In: Carli, B., Gavaretta, G., Colacino, N., Fuzzi, S. (eds), *Clima e cambiamenti climatici: le attività di ricerca del CNR*. CNR-Roma: pp. 551-556.
- Redfield A. C., Ketchum B. H., Richards F. A. 1963. **The influence of organisms on the composition of sea water**, in N. M. Hill (ed.), *The sea*, vol. 2, New York and London: Wiley. 27-77.
- Reguera B., Lourdes V-S., Raine R., Park M.-G. 2012. **Harmful Dinophysis species: A review**. *Harmful Algae*. 14: 87-106
- Revelante N., Gilmartin M. 1976. **Temporal succession of phytoplankton in the Northern Adriatic**. *Netherland Journal of Sea Research*. 10:377-396.
- Rhodes L., McNabb P., de Salas M., Briggs L., Beuzenberg V., Gladstone M. 2006. **Yessotoxin production by *Gonyaulax spinifera***. *Harmful Algae*. 5:148–155.
- Riccardi M., Guerrini F., Roncarati F., Milandri A., Cangini M., Pigozzi S., Riccardi E., Ceredi A., Ciminiello P., Dall'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. 1988. **Eutrophie et dystrophie dans la Lagune de Goro (Italie)**. *Rapp. Comm. Int. Mer Médit.*; 31,2:58.
- Rossi O., Giavelli G. 1983. **Some comments and perspectives on the utilization of species diversity indices in ecology**. *Acta Naturalia de l'Ateneo Parmense*. 19: 25-34.
- Russo A., Artegiani A. 1996. **Adriatic Sea hydrography**. *Scientia Marina* 60 (Suppl.2): 33-43.
- Satake M., MacKenzie L., Yasumoto T. 1997. **Identification of *Protoceratium reticulatum* as the biogenetic origin of yessotoxin**. *Nat. Toxins*. 5:164–167.

- Smayda T.J. 1989. **Primary production and the global epidemic of phytoplankton blooms in the sea: A linkage?** In: Cosper, E. M., Bricelj, V. M. and Carpenter, E. J. (eds), *Novel Phytoplankton blooms*. Springer-Verlag, Berlin. 449–483.
- Smayda T.J. 1997. **Harmful phytoplankton blooms: Their ecophysiology and general relevance to phytoplankton blooms in the sea.** *Limnol. Oceanogr.* 42: I 137-1 153.
- Smayda T.J. 2002. **Turbulence, watermass stratification and harmful algal blooms: an alternative view and frontal zones as ‘pelagic seed banks’.** *Harmful Algae*.1:95-112.
- Socal G., Acri F., Bastianini M., Bernardi Aubry F., Bianchi F., Cassin D., Coppola J., De Lazzari A., Bandelj V., Cossarini G., Solidoro C. 2008. **Hydrological and biogeochemical features of the northern Adriatic Sea in the period 2003-2006.** *Marine Ecology*. 29:449-68
- Sournia A. 1973. **Catalogue des espèces et taxons infraspécifiques de dinoflagellés marins actuels publiés depuis la révision de J. Schiller. I. Dinoflagellés libres.** *Beih.Nova Hedwigia* .48, 1–92.
- Sournia A. , Chretiennot-Dinet M.J., Ricard M. 1991. **Marine phytoplankton: how many species in the world ocean?** *J.Plankton Res* .13: 1093-9
- Tagliapietra D., Bianchi F., Franceschini G., Ponti M. 2008. **Caratteristiche dell’Adriatico settentrionale.** 13-63.
- Tomas R.C.1996. **Identifying Marine Diatoms and Dinoflagellates.** Academic Press, Inc.
- Tubaro, A., Sidari, L., Della Loggia, R., Yasumoto, T. 1998. **Occurrence of Homoyessotoxin in Phytoplankton and Mussels from Northern Adriatic Sea.** In *Harmful Algae*; Reguera, B., Blanco, J., Fernandez, M.L., Wyatt, T., Eds.; Xunta de Galicia and Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO: Santiago de Compostela, Spain, 1998; pp. 470–472.
- Tubaro A., Hungerford J. 2007 . **Toxicology of marine toxins.** In “Veterinary Toxicology. Basic and Clinical Principles.” R.C. Gupta Ed., Academic Press Elsevier, New York, pagg. 725-752.
- UTERMÖHL H.1958. **Zur Vervollkommung der quantitativen Phytoplankton-Methodik.** *Int.Ver.Theor.Angew.Limnol.Verh.*17:47-71.
- Vasas V., Lancelot C., Rousseau V., Jordan F.2001.**Eutrophication and overfishing in temperate nearshore pelagic food webs: a network perspective.** *Marine Ecology - Progress Series*, 336: 1-14.

- Vila M., Camp J., Gracés E., Masò M., Delgado M. 2001. **High resolution spatio-temporal detection of potentially harmful dinoflagellates in confined waters of the NW Mediterranean.** *Journal of Plankton Research.* 23(5): 497-514.
- Viličić D., Djakovac T., Burić Z., Bosak S. 2009. **Composition and annual cycle of phytoplankton assemblages in the northeastern Adriatic Sea.** *Bot. Mar.* 52, 291-305.
- Vollenweider R. A., Rinaldi A., Montanari G. 1992. **Eutrophication, structure and dynamics of a marine coastal system: results of ten years monitoring along the Emilia-Romagna coast (Northwest Adriatic Sea), in Marine Coastal Eutrophication** (ed. R. A. Vollenweider, R. Marchetti and R. Viviani). *J. Science of the Total Environment*, Elsevier, Amsterdam, Suppl.
- Walsh J.J., Tomas C.R., Steidinger K.A., Lenes J.M., Chen F.R., Weisberg R.H., Zheng L., Landsberg J.H., Vargo G.A., Heil C.A. 2011. **Imprudent fishing harvests and consequent trophic cascades on the West Florida shelf over the last half century: A harbinger of increased human deaths from paralytic shellfish poisoning along the south eastern United States, in response to oligotrophication?** *Continental Shelf Research.* 31: 891-911.
- Whittle K, Gallacher S. Marine toxins. 2000. **British Medical Bulletin.** 56: 236–53.
- Zavatarelli M., Raicich F., Bregant D., Russo A., Artegiani A. 1998. **Climatological biogeochemical characteristics of the Adriatic Sea.** *Journal of Marine Systems.* 18:227-263.
- Zingone A., Enevoldsen O.H. 2000. **The diversity of harmful algal bloom: a challenge for science and management.** *Ocean Coastal Manageme.* 43: 725-748.
- Zingone A. 2010. **Harmful Algal Blooms in the Mediterranean: an historical overview.** In: Briand F. (ed), *Phytoplankton responses to Mediterranean environmental changes.* CIESM Workshop Monographs n. 40, Monaco: 19-24.

6.2 Siti internet

- www.algeadria.org
- www.arpa.veneto.it/temi-ambientali/.../Convegno_ReMoPo_ICRAM.pdf
- https://www.assembla.com/spaces/RetePesca/wiki/Gruppo_di_Lavoro_Marine_Strategy_MIPAAF
- <http://www.camera.it/parlam/leggi/deleghe/10190dl.htm>
- <http://www.chimicamo.org/>
- <http://www.marinespecies.org/hab/index.php>
- <http://bch.minambiente.it/IT/Presentazione/convenzione.asp#articolo2>
- www.statsoft.com

ALLEGATO 1

DIGA SUD											
	21-apr	02-mag	09-mag	21-mag	11-giu	05-lug	22-lug	08-ago	23-ago	13-set	17-ott
Diatomee	2139441	11101096	6587902	3090939	3586655	4244966	2696827	1465024	647500	191377	14600
<i>Achnanthes brevipes</i>			1360								
<i>Bacillariophyceae indet</i>			34960		40	240		1280			
<i>Bacteriastrum</i>		12628	16369	18520	1061540	55471					920
<i>Cerataulina pelagica</i>							2240	560	80	200	
<i>Chaetoceros</i> spp.	1728267	10706015	6390255	2646834	1993623	3782680	1504067	1364284	566858	142794	1720
<i>Cyclotella</i> spp.	1120	51144	15110	440	134173	2240	26772	1040	1480	2000	840
<i>Cylindrotecha closterium</i>	7760	640	320	9920	1680	1760			40	3200	
<i>Dactyliosolen</i> spp.	3920	80188	5600	6880	10000	49021	12480	5520		1040	80
<i>Diatoma tenuis</i>		800									
<i>Fragilaria</i> spp.			1600								
<i>Guinardia flaccida</i>								160	160	40	200
<i>Hemiaulus hauckii</i>	120					80		40			
<i>Leptocylindrus</i> spp	8400				320	480	1360		80	3200	280
<i>Licmophora</i>	440		280	80	160				40		
<i>Lioloma elongatum</i>											8560
<i>Nitzschia longissima</i>											
<i>Pseudo-nitzschia</i> spp.	121704	229830	74289	172273	315701	188342	250506	73660	69042	27678	
<i>Odontella aurita</i>	80										
<i>Pleurosigma</i> spp.			120	160	2560	2600	160	160	1240	120	
<i>Proboscia alata</i>					40				40	40	
<i>Rhizosolenia hebetata</i>				40	320	800	480	1440			80
<i>Synedra</i> spp.											80
<i>Skeletonema</i> spp.	262830	13891	45959	228072	39778	61921				10065	240
<i>Thalassiosira</i> spp.	3000	2240		1080					120		1000
<i>Thalassionema nitzschioides</i>	1800	3720	1680	6640	26720	99331	898762	16880	8320	1000	600

Allegato 1(a): analisi quali-quantitativa per il gruppo delle Diatomee. Sito DIGA SUD.

DIGA SUD											
	21-apr	02-mag	09-mag	21-mag	11-giu	05-lug	22-lug	08-ago	23-ago	13-set	17-ott
Dinophyceae	21280	81869	37729	54169	97667	57835	103156	40978	19650	4040	157849
<i>Amphidinium</i> spp.											
<i>Alexandrium minutum</i>	200		240	280	80						
<i>Alexandrium</i> spp.											80
<i>Biceratium furca</i>				160	280	80	40	280	160	40	720
<i>Ceratium fusus</i>	80				80	80				40	280
<i>Ceratium trichoceros</i>									160		40
<i>Ceratium tripos</i>						40	40		40		40
<i>Dinophyceae indet.</i>		53669	30849	39489	77347	25155	70116	32738	11450	1840	147809
<i>Dinophysis acuminata</i>	1440				40	160		120			
<i>Dinophysis caudata</i>								40	40		
<i>Dinophysis fortii</i>					80						40
<i>Dinophysis saccula</i>					120	240	120	40			
<i>Dinophysis</i> spp.	80		80	1240		40			40	40	80
<i>Diplopsalis</i> group				520	560	800		240	200		320
<i>Gonyaulax diegensis</i>											40
<i>Gonyaulax fragilis</i>							280	320		160	160
<i>Gonyaulax grindleyi</i>									440		
<i>Gonyaulax spinifera</i>								720	520		
<i>Gonyaulax</i> spp.				160	560	80	80		1080	80	640
<i>Goniodoma</i> spp.							40				
<i>Gymnodinium</i> spp.						1200	2960	480	80	40	440
<i>Gyrodinium</i> spp.	320		1440	2280	1200		3760	1120	1920	400	1840
<i>Heterocapsa</i> spp.	2240	320	480	640	880	1760	3200	240	160	240	2720
<i>Kofoidinium velleloides</i>								40			
<i>Lingulodinium polyedra</i>					1520				760		160
<i>Micracanthodinium setiferum</i>			960								
<i>Noctiluca scintillans</i>					80	40					
<i>Oblea rotunda</i>			240	3600	1520	1280	480	720		40	200
<i>Ornithocercus</i> spp.											
<i>Oxytoxum</i> spp.	800	560	320	240	320	560	320		480	80	40
<i>Podolampas palmipes</i>						240	40	80			80
<i>Polykrikos</i> spp.	5040	21200	800	80	960	320	12520	160			
<i>Prorocentrum cordatum</i>	5360	3920	560	2000	800	2880	640	240	840		80
<i>Prorocentrum micans</i>	320	320	640	480	6200	920	120	80	80	80	600
<i>Prorocentrum triestinum</i>	5120	640		1120	320	3280			40	40	
<i>Protoperdinium</i> spp.	280	720	240	40	2720	15920	4560	2080	280	560	1000
<i>Pselodinium vaubanii</i>						40			40		80
<i>Scrippsiella</i> spp.		520	880	1840	1440	2480	3520	1120	840	360	360
<i>Tryblionella compressa</i>					560	240	320	120			
Euglenophyceae	8560	6400	320	2160	1760	480	1440	200	120	240	280
<i>Euglena</i> spp.	8560	6400	320	2160	1760	480	1440	200	120	240	280
Nanoplankton indet.		886774	1087566	1401665	1262196	1404995	1794325	1325672	3322050	2355879	1127201

Allegato 1(b): analisi quali-quantitativa per il gruppo delle Dinophyceae, delle Euglenophyceae e per il Nanoplankton. Sito DIGA SUD.

ALLEGATO 2

GEOMAR												
	24-apr	08-mag	22-mag	12-giu	01-lug	18-lug	02-ago	19-ago	03-set	25-set	10-ott	18-ott
Diatomee	5605328	27473707	7433938	3585232	8238217	1322718	381055	2208352	1721110	49658	90946	223078
<i>Asterionellopsis glacialis</i>											800	
<i>Bacillariophyceae indet</i>	25232	240					200		240	400	720	40
<i>Bacteriastrum</i>	26144	63105	98784	74821				14480	960	1520	400	1000
<i>Cerataulina pelagica</i>					4560	400	240	480	640	1280		
<i>Chaetoceros spp.</i>	5245488	27211735	6458328	3296335	7756789	584436	150836	1334503	1537749		16080	9360
<i>Coscinodiscus spp.</i>								600				
<i>Cyclotella spp.</i>		29321	10480	2160	20716	5360	34310	12720	240	560	80	80
<i>Cylindrotecha closterium</i>	2640	1920	2000		1520			320	120	160	200	200
<i>Dactylosolen spp.</i>	18240	5600	4960	213	11520	6480	3280	64240	13760	2240	1160	5040
<i>Ditylum brightwellii</i>		640										160
<i>Fragilaria spp.</i>	480	4560	800	1080	1000		120					
<i>Guinardia flaccida</i>					160		80	440	480	120	680	
<i>Hemiaulus hauckii</i>				240		120		80	40	160	40	80
<i>Leptocylindrus spp.</i>					4320	2320	8880		1040	5120		7360
<i>Licmophora</i>				40						1080	80	
<i>Lioloma elongatum</i>											19520	186198
<i>Nitzschia longissima</i>	80									40		
<i>Pseudo-nitzschia spp.</i>	205504	151706	851066	87076	308040	376211	134004	763049	161841	33898	46226	
<i>Odontella aurita</i>										40		
<i>Pleurosigma spp.</i>			240	880	4200	600		1040	120	80	1200	80
<i>Proboscia alata</i>					3040				200	80	120	40
<i>Rhizosolenia hebetata</i>						600	1000	80	2480	1200	200	
<i>Skeletonema spp.</i>	79040	560		480						200		3360
<i>Tabellaria fenestrata</i>		400								360		
<i>Thalassiosira spp.</i>		1280	240				200	2480	80	240	80	6800
<i>Thalassionema nitzschioides</i>	2480	2640	7040	121907	122352	346191	47905	13840	1120	880	3360	3280

Allegato 2(a): analisi quali-quantitativa per il gruppo delle Diatomee. Sito GEOMAR.

GEOMAR												
	24-apr	08-mag	22-mag	12-giu	01-lug	18-lug	02-ago	19-ago	03-set	25-set	10-ott	18-ott
Dinophyceae	82200	99925	38835	122681	34999	39585	50498	17537	5520	3360	4520	88972
<i>Alexandrium minutum</i>	400	640	640	960			40	40				
<i>Alexandrium</i> spp.								120				
<i>Bicratium furca</i>		80	80	440		80	80	40			40	160
<i>Ceratium candelabrum</i>								160	80	80		
<i>Ceratium fusus</i>	40			240	280			80	80	80	440	240
<i>Ceratium trichoceros</i>								120	120		80	
<i>Ceratium tripos</i>			80	200			40		40			40
<i>Dinophyceae</i> indet.	63840	77765	30395	32895	17479	27465	47258	13897	1640	1600	800	84292
<i>Dinophysis acuminata</i>	40	320	80	80							40	
<i>Dinophysis caudata</i>	40							40				
<i>Dinophysis fortii</i>												
<i>Dinophysis saccula</i>			40	280			80					80
<i>Dinophysis</i> spp.				80								40
<i>Diplosalis</i> group			120	480	1040	480	40	80	120		200	240
<i>Gonyaulax fragilis</i>							200	40	560	40		120
<i>Gonyaulax spinifera</i>						240						
<i>Gonyaulax</i> spp.		120	440		40			40		40		40
<i>Gymnodinium</i> spp.					680	1200	200	160	280	40	120	240
<i>Gyrodinium</i> spp.	2560	1200	160		7440	720	400	880	1200	840	1400	480
<i>Heterocapsa</i> spp.		1920	640	1600	320	1920	120	320	40	80		920
<i>Kofoidinium velleloides</i>					80							
<i>Lingulodinium polyedra</i>											80	
<i>Micracanthodinium setiferum</i>		720	80									
<i>Noctiluca scintillans</i>			40		160	120						80
<i>Oblea rotunda</i>	560	1120	880	600			240		80		280	80
<i>Oxytoxum</i> spp.	800		400	960	440		120	40	360	40	40	
<i>Phalacroma rapa</i>												40
<i>Phalacroma roundatum</i>				40								
<i>Podolampas palmipes</i>				160	480	80	80	80	40		120	80
<i>Polykrikos</i> spp.	4800	6960			320	480					160	
<i>Prorocentrum cordatum</i>	3200	3680	1520	75466	160	480	240	320	160	40		40
<i>Prorocentrum micans</i>	560	560	120	3080	80	120			80	40	120	280
<i>Prorocentrum triestinum</i>	720	920	1840									
<i>Protoperidinium</i> spp.	1840	1440	920	2320	5280	3360	80	240	120	40	400	520
<i>Pseliodinium vaubanii</i>					160			80	80		40	80
<i>Scrippsiella</i> spp.	2800	2480	320	2640	480	2560	880	480	200	400	80	720
<i>Torodinium robustum</i>									160			
<i>Tryblionella compressa</i>			40	160	80	280	400	280	80		80	160
Euglenophyceae		19123	1760	480	480	160	160		360	640	200	360
<i>Euglena</i> spp.		19123	1760	480	480	160	160		360	640	200	360
Nanoplankton indet.	1814364	2242907	1393228	2188551	612378	1722212	1279190	829206			468750	269834

Allegato 2(b): analisi quali-quantitativa per il gruppo delle Dinophyceae, delle Euglenophyceae e per il Nanoplankton. Sito GEOMAR.

ALLEGATO 3

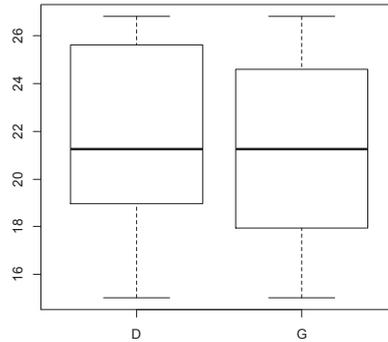
Sito	DATA	°C	psu	DIN (µg/L)	P-PO4 (µg/L)	Si (µg/L)	N/P
DIGA SUD	21-apr	15.02	30	107.025	1.716	7.771	62.364
DIGA SUD	02-mag	20.23	22	21.404	0.358	26.857	59.777
DIGA SUD	09-mag	20.23	26	120.162	1.679	12.186	71.566
DIGA SUD	21-mag	15.85	28	8.253	0.294	8.489	28.115
DIGA SUD	11-giu	21.25	36	4.352	0.083	3.234	49.309
DIGA SUD	05-lug	26.61	32	10.533	0.235	2.304	44.729
DIGA SUD	22-lug	26.62	30	11.520	0.210	2.071	54.943
DIGA SUD	08-ago	24.61	36	7.343	0.310	4.876	23.676
DIGA SUD	23-ago	26.83	35	21.946	0.080	2.372	272.000
DIGA SUD	13-set	22.91	38	20.513	0.263	14.849	78.122
DIGA SUD	17-ott	17.74	32	61.215	0.247	16.230	247.737
GEOMAR	24-apr	15.02	30	117.949	0.735	7.186	160.369
GEOMAR	08-mag	20.23	20	38.342	0.242	9.442	158.693
GEOMAR	22-mag	15.85	36	6.880	0.204	1.013	33.802
GEOMAR	12-giu	21.25	30	9.429	0.129	3.320	73.071
GEOMAR	01-lug	22.69	32	22.551	0.100	2.793	225.505
GEOMAR	18-lug	25.61	34	14.922	0.458	1.866	32.576
GEOMAR	02-ago	24.61	36	9.789	0.281	0.996	34.881
GEOMAR	19-ago	26.83	35	30.496	1.165	1.113	26.188
GEOMAR	03-set	24.61	38	6.099	0.344	1.526	17.753
GEOMAR	25-set	18.13	36	7.341	0.110	1.167	66.934
GEOMAR	10-ott	17.74	30	9.203	0.092	1.698	100.282
GEOMAR	18-ott	17.74	30	39.437	0.256	14.383	153.779

Allegato 3: variabili abiotiche. Sito DIGA SUD e GEOMAR.

ALLEGATO 4

ANOVA VARIABILI ABIOTICHE E BOXPLOT (OUTPUT R)

TEMPERATURA (°C)



Cochran test of homogeneity of variances

$C = 0.5255$, $n = 11$, $k = 2$, $p\text{-value} = 0.8749$

alternative hypothesis: Group D has outlying variance sample estimates:

D G

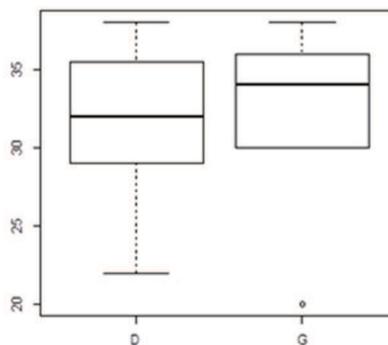
18.3556 16.5740

Analysis of variance table

Response: variabile

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
sito	1	1.29	1.2913	0.0739	0.7885
Residual	20	349.30	17.4648		

SALINITA' (psu)



Cochran test of homogeneity of variances

C = 0.5188, n = 11, k = 2, p-value = 0.9076

alternative hypothesis: Group G has outlying variance sample estimates:

D G

23.2545 25.0727

Analysis of variance table

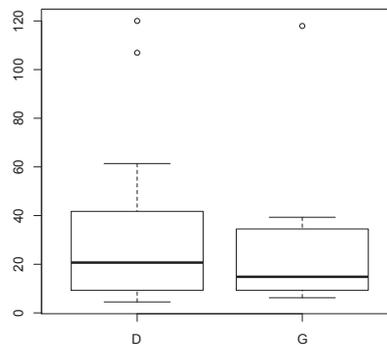
Response: variabile

Df Sum Sq Mean Sq F value Pr(>F)

sito 1 6.55 6.5455 0.2709 0.6085

Residual 20 483.27 24.1636

DIN



Cochran test of homogeneity of variances

C = 0.6219, n = 11, k = 2, p-value = 0.4451

alternative hypothesis: Group D has outlying variance sample estimates:

D G

1725.428 1049.030

Analysis of variance table

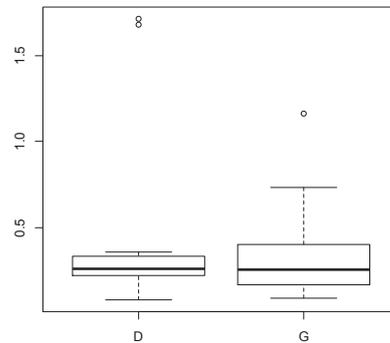
Response: variabile

Df Sum Sq Mean Sq F value Pr(>F)

sito 1 361.4 361.41 0.2605 0.6153

Residual 20 27744.6 1387.23

FOSFATI



Cochran test of homogeneity of variances

$C = 0.7744$, $n = 11$, $k = 2$, $p\text{-value} = 0.06457$

alternative hypothesis: Group D has outlying variance sample estimates:

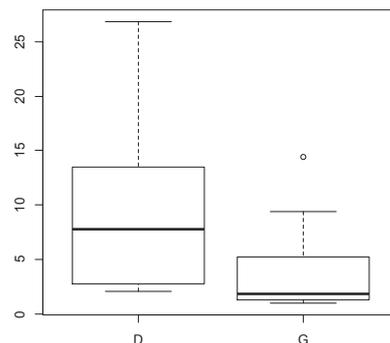
D	G
0.3593	0.1046

Analysis of Variance Table

Response: variabile

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
sito	1	0.0982	0.098244	0.4236	0.5226
Residual	20	4.6390	0.231950		

SILICATI



Cochran test of homogeneity of variances

$C = 0.7591$, $n = 11$, $k = 2$, $p\text{-value} = 0.0843$

alternative hypothesis: Group D has outlying variance sample estimates:

D G

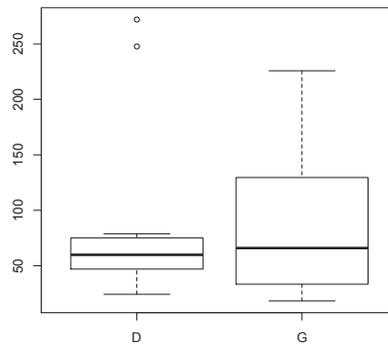
60.3860 19.1588

Analysis of variance table

Response: variabile

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
sito	1	142.05	142.050	3.5716	0.07336
Residual	20	795.45	39.772		

N/P



Cochran test of homogeneity of variances

C = 0.606, n = 11, k = 2, p-value = 0.5084

alternative hypothesis: Group D has outlying variance sample estimates:

D G

7332.530 4767.656

Analysis of variance table

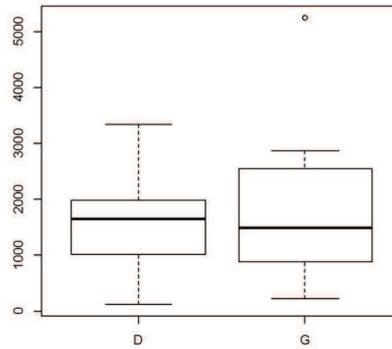
Response: variabile

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
sito	1	224	223.8	0.037	0.8494
Residual	20	121002	6050.1		

ALLEGATO 5

ANOVA VARIABILI BIOTICHE E BOXPLOT (OUTPUT R)

DIATOMEE



Cochran test of homogeneity of variances

data: linear.model

$C = 0.7102$, $n = 11$, $k = 2$, $p\text{-value} = 0.1736$

alternative hypothesis: Group G has outlying variance

sample estimates:

D G

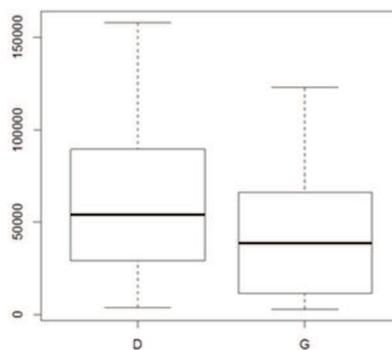
859259.7 2105578.4

Analysis of variance table

Response: variabile

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
Sito	1	382284	382284	0.2579	0.6171
Residual	20	29648381	1482419		

DINOPHYCEAE



Cochran test of homogeneity of variances

data: linear.model

C = 0.5564, n = 11, k = 2, p-value = 0.727

alternative hypothesis: Group D has outlying variance

sample estimates:

D G

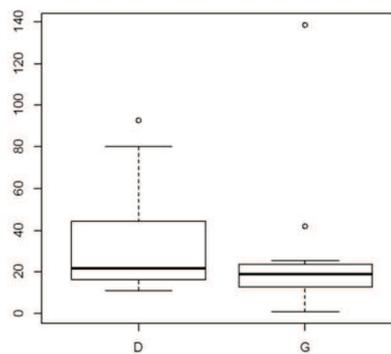
2046540437 1631594346

Analysis of variance table

Response: variabile

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
Sito	1	1.4170e+09	1417006357	0.7705	0.3905
Residual	20	3.6781e+10	1839067392		

EUGLENOPHYCEAE



Cochran test of homogeneity of variances

data: linear.model

C = 0.6553, n = 11, k = 2, p-value = 0.3259

alternative hypothesis: Group G has outlying variance

sample estimates:

D G

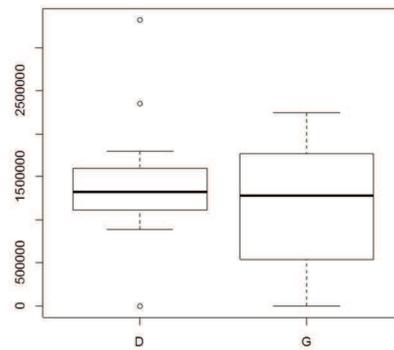
770.2926 1464.1689

> gad(linear.model)

Analysis of Variance Table

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
Sito	1	338.1	338.11	0.3026	0.5883
Residual	20	22344.6	1117.23		

NANOPLANCTON



Cochran test of homogeneity of variances

data: linear.model

C = 0.5195, n = 11, k = 2, p-value = 0.9044

alternative hypothesis: Group D has outlying variance

sample estimates:

D G

715408488840 661783825151

Analysis of variance table

Response: variable

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
Sito	1	5.3089e+11	5.3089e+11	0.771	0.3903
Residual	20	1.3772e+13	6.8860e+11		

ALLEGATO 6

BIOENV (OUTPUT PRIMER 6+PERMANOVA)

BEST

Biota and/or Environment matching

Data worksheet

Name: Data2

Data type: Other

Sample selection: All

Variable selection: All

Resemblance worksheet

Name: Resem1

Data type: Similarity

Selection: All

Parameters

Rank correlation method: Spearman

Method: BIOENV

Maximum number of variables: 5

Resemblance:

Analyse between: Samples

Resemblance measure: D1 Euclidean distance

Variables

1 °C

2 psu

3 N

4 P-PO4

5 Si

6 N/P

Global Test

Sample statistic (Rho): 0.249

Significance level of sample statistic: 35%

Number of permutations: 99 (Random sample)

Number of permuted statistics greater than or equal to Rho: 34

Best results

No. Vars	Corr.	Selections
2	0.249	2,5
3	0.247	2,5,6
4	0.219	2,4-6
3	0.203	2,4,5
2	0.201	5,6
2	0.200	2,6
1	0.197	6
1	0.191	5
4	0.181	1,2,5,6
3	0.175	2,4,6

ALLEGATO 7

RELATE (OUTPUT PRIMER 6+PERMANOVA)

RELATE

Testing matched resemblance matrices

Resemblance worksheet

Name: diga sud

Data type: Similarity

Selection: All

Secondary data: Resemblance/model matrix

Resemblance worksheet

Name: Geomar

Data type: Rank

Selection: All

Parameters

Rank correlation method: Spearman

Sample statistic (Rho): 0.583

Significance level of sample statistic: 0.8 %

Number of permutations: 999

Number of permuted statistics greater than or equal to Rho: 7

Spearman Rank Order Correlations (Tabella)MD pairwise deletedMarked correlations are significant at p <,05000														
°C	°C	psu	N-NO3 (µM)	N-NO2 (µM)	N-NH3 (µM)	DIN (µM)	P-PO4 (µM)	Si (µM)	N/P	Diatomee log	Dinophyceae log	Euglenophyceae log	Nanoplancton log	Abbondanza tot. log
psu	0.3763	1.0000	-0.5627	-0.6147	-0.1471	-0.6082	-0.3011	-0.5877	-0.2871	-0.5657	-0.5287	-0.3832	-0.1772	-0.5622
N-NO3 (µM)	-0.6042	-0.5627	1.0000	0.7041	-0.0456	0.7134	0.2964	0.7263	0.5346	0.2174	0.0296	0.1273	0.0406	0.2490
N-NO2 (µM)	-0.5803	-0.6147	0.7041	1.0000	0.1689	0.6842	0.4081	0.7130	0.4111	0.1718	0.0914	0.2443	-0.1829	0.1341
N-NH3 (µM)	0.2945	-0.1471	-0.0456	0.1689	1.0000	0.5414	0.0228	0.0798	0.4011	-0.1651	0.1091	-0.3841	0.1603	-0.0635
DIN (µM)	-0.2340	-0.6082	0.7134	0.6842	0.5414	1.0000	0.4338	0.5237	0.5909	0.1146	0.0593	-0.1783	0.0406	0.1621
P-PO4 (µM)	-0.1606	-0.3011	0.2964	0.4081	0.0228	0.4338	1.0000	0.2470	-0.3794	0.1077	-0.0306	-0.1550	-0.1830	0.0020
Si (µM)	-0.4600	-0.5877	0.7263	0.7130	0.0798	0.5237	0.2470	1.0000	0.4496	0.1423	0.2688	0.2619	0.1395	0.2174
N/P	-0.2924	-0.2871	0.5346	0.4111	0.4011	0.5909	-0.3794	0.4496	1.0000	-0.0623	0.0464	-0.0624	0.1820	0.0840
Diatomee log	-0.1641	-0.5657	0.2174	0.1718	-0.1651	0.1146	0.1077	0.1423	-0.0623	1.0000	0.4466	0.4679	0.2047	0.9457
Dinophyceae log	-0.1224	-0.5287	0.0296	0.0914	0.1091	0.0593	-0.0306	0.2688	0.0464	0.4466	1.0000	0.2689	0.4639	0.5188
Euglenophyceae log	-0.3912	-0.3832	0.1273	0.2443	-0.3841	-0.1783	-0.1550	0.2619	-0.0624	0.4679	0.2689	1.0000	-0.1467	0.3620
Nanoplancton log	0.2248	-0.1772	0.0406	-0.1829	0.1603	0.0406	-0.1830	0.1395	0.1820	0.2047	0.4639	-0.1467	1.0000	0.4451
Abbondanza tot log	-0.0768	-0.5622	0.2490	0.1341	-0.0635	0.1621	0.0020	0.2174	0.0840	0.9457	0.5188	0.3620	0.4451	1.0000

Allegato 8: Spearman Rank Order Correlations (Tabella generale mod)
MD pairwise deleted. Marked correlations are significant at p <,05000. (www.statsoft.com).

ALLEGATO 9

Sito	Data	N° Taxa	N° Individui	Shannon Index (H)	Equitability Index (J)
DIGA SUD	21/04/2013	25	2169281	0.7583	0.2356
DIGA SUD	02/05/2013	21	12076139	0.4949	0.1626
DIGA SUD	09/05/2013	28	7713517	0.5992	0.1798
DIGA SUD	21/05/2013	30	4548933	1.081	0.3178
DIGA SUD	11/06/2013	38	4948278	1.507	0.4142
DIGA SUD	05/06/2013	38	5708276	1.013	0.2784
DIGA SUD	22/07/2013	30	4595748	1.38	0.4056
DIGA SUD	08/08/2013	33	2831874	0.9342	0.2672
DIGA SUD	23/08/2013	35	3989320	0.5546	0.156
DIGA SUD	13/09/2013	29	2551536	0.3502	0.104
DIGA SUD	17/10/2013	38	1299930	0.4961	0.1364
GEOMAR	24/04/2013	25	7501892	0.86	0.2672
GEOMAR	08/05/2013	30	29835662	0.3579	0.1052
GEOMAR	22/05/2013	33	8867921	0.8481	0.2425
GEOMAR	12/06/2013	32	5896944	1.004	0.2897
GEOMAR	01/07/2013	32	8886074	0.5464	0.1577
GEOMAR	18/07/2013	27	3084675	1.249	0.3791
GEOMAR	02/08/2013	31	1710903	0.974	0.2836
GEOMAR	19/08/2013	36	3055095	1.266	0.3533
GEOMAR	03/09/2013	37	1726990	0.4248	0.1176
GEOMAR	25/09/2013	34	53658	1.635	0.4637
GEOMAR	10/10/2013	37	564416	0.7359	0.2038
GEOMAR	18/10/2013	39	582244	1.359	0.3711

Allegato 9: numero taxa, numero di individui, indice di Shannon (H) e di Pielou (J) per ogni campione, sia di DIGA SUD che di GEOMAR. Output STATISTICA.

Ringraziamenti

*“Desidero ringraziare tutti coloro che mi hanno aiutato a realizzare questo lavoro di tesi.
Ringrazio in particolar modo la Prof.ssa Rossella Pistocchi, le Dott.sse Franca Guerrini, Monica
Cangini e Marinella Pompei per l’aiuto offerto, la disponibilità e la grande competenza.
Un sentito ringraziamento alla mia famiglia, agli amici e ad Andrea che mi hanno sempre
sostenuta, incoraggiata e appoggiata fino a questo traguardo”.*