



UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE

DIPARTIMENTO DI SCIENZE DELLA VITA E DELL'AMBIENTE

Corso di Laurea Magistrale in Biologia Marina

**Ruolo del fitoplancton nella contaminazione da tetrodotossina dei mitili
nella Riviera del Conero**

Role of phytoplankton in tetrodotoxin contamination of mussels in the Conero
Riviera

Tesi di laurea

Federica Luciani

Relatore:

Prof. Stefano Accoroni

Correlatori:

Prof.ssa Cecilia Maria Totti

Dott.ssa Tiziana Romagnoli

Sessione straordinaria - febbraio 2023

Anno Accademico 2021/2022

SOMMARIO

Sommario	0
RIASSUNTO	1
INTRODUZIONE	2
Harmful Algal Blooms	2
Tossine emergenti	6
Immine cicliche (CIs).....	8
Brevetossine (BTX).....	11
Azaspiracidi (AZAs)	13
Palitossine (PLTXs)	15
Ciguatossine (CTXs).....	16
Tetrodotossine (TTXs).....	18
Il fitoplancton nel mare Adriatico	21
SCOPO DELLA TESI	24
MATERIALI E METODI.....	25
Area di studio	25
Campionamento	26
Analisi della comunità fitoplanctonica.....	29
Messa in coltura e selezione dei ceppi algali	30
Analisi statistiche	31
Risultati	31
Parametri ambientali	31
Nutrienti	33
Andamento contaminazione TTX nei mitili.....	34
Caratterizzazione comunità fitoplanctonica	35
Discussione	44
Bibliografia	52
Ringraziamenti	65

RIASSUNTO

La comparsa di tossine emergenti nelle acque europee è un fenomeno di grande rilevanza. Questo studio ha investigato il ruolo del fitoplancton nella contaminazione da TTX nei mitili di Portonovo, fenomeno che avviene durante la stagione estiva. La tetrodotossina (TTX), il veleno del pesce palla tradizionalmente associato all'area indo-pacifica, è stata segnalata negli ultimi decenni in numerosi organismi marini e in un numero sempre maggiore di aree geografiche, compresa l'Europa. Dal 2017 la contaminazione da TTX è stata rilevata anche nei mitili (*Mytilus galloprovincialis*) selvatici e di allevamento nelle coste marchigiane durante i mesi estivi. Lo scopo di questo studio è di approfondire la conoscenza sull'origine della tossina e sulle modalità di accumulo e trasferimento nei mitili. Nel corso del 2021 è stato effettuato un campionamento settimanale, da giugno ad agosto (periodo di massima contaminazione da TTX), nell'area di Portonovo, prelevando campioni di mitili, sedimento e colonna d'acqua per l'analisi della comunità batterica e fitoplanctonica (potenzialmente produttori e/o vettori di TTX). I mitili hanno mostrato livelli di contaminazione rilevanti ($9\text{--}296\ \mu\text{g kg}^{-1}$) in questo periodo. Le analisi dei campioni di fitoplancton prelevati con il retino hanno mostrato la presenza di basse concentrazioni di TTX. Le specie fitoplanctoniche potenzialmente produttrici di TTX sono state isolate e messe in coltura e il risultato ha mostrato l'assenza di tossine. La presenza della tossina nel fitoplancton e la sua distribuzione nei diversi tessuti dei mitili ne supporta la possibile origine esogena. Il batterio *Vibrio alginolyticus* (sospettato di essere il principale produttore di TTX) è stato rinvenuto in ambiente. Analizzando l'andamento annuale del fitoplancton, è possibile osservare che le dinoflagellate hanno mostrato le maggiori abbondanze proprio nel periodo in cui è stata registrata la contaminazione da TTX nei mitili. Considerando che molte dinoflagellate sono eterotrofe e per la maggior parte sono mixotrofe (caratteristiche che consentono loro di nutrirsi di batteri potenzialmente produttori di TTX), si potrebbe ipotizzare un loro possibile ruolo anche come semplici vettori nella contaminazione da TTX dei mitili, anche se non direttamente produttori di TTX come invece fortemente ipotizzato in *Prorocentrum cordatum*.

INTRODUZIONE

Harmful Algal Blooms

Gli Harmful Algal Blooms (HABs) sono fenomeni naturali che avvengono in tutte le tipologie di acque (dolce, salmastra o marina), e sono definiti come eventi associati alla proliferazione di specie algali in grado di causare danni all'uomo e/o agli ecosistemi marini inclusi i beni e servizi che ne derivano.

Gli eventi comunemente definiti HAB includono:

- colorazione anomala delle acque (brown tides, red tides e green tides) dovuta alla fioritura di una o più specie, ognuna dotata di un proprio corredo di pigmenti;
 - riduzione dell'intensità luminosa che penetra nella colonna d'acqua con conseguente compromissione dell'efficienza fotosintetica del fitoplancton e del fitobenthos; inoltre il processo di degradazione di biomassa algale, operato dai batteri comporta il consumo di ossigeno causando fenomeni di anossia nei fondali, fenomeno favorito in condizioni di stratificazione, con conseguente alterazione della funzionalità degli ecosistemi;
 - comparsa di schiume superficiali e mucillagini che possono occludere le branchie di pesci e invertebrati o causare lesioni ai tessuti di quest'ultimi.
- I cattivi odori associati possono dissuadere i turisti dalla visita delle aree

ricreative costiere, penalizzando il settore turistico- economico (Zingone and Enevoldsen, 2000);

- proliferazione di specie produttrici di tossine. Alcune specie algali sono in grado di produrre delle tossine, ovvero metaboliti secondari come alcaloidi, peptidi e fenoli, la cui tossicità è conferita da specifici gruppi funzionali (Otero and Silva, 2022) con effetti negativi sulla salute dell'uomo e/o sugli organismi marini.

Le modalità di trasmissione sono collegate a:

- ingestione di organismi marini (molluschi, pesci) contaminati, in quanto le biotossine non vengono distrutte dalla cottura o dai processi di lavorazione dei prodotti ittici e poiché non hanno odori distintivi, possono essere rilevati solo attraverso esami effettuati da laboratori specializzati;
- inalazione di tossine aerosolizzate;
- contatto della pelle.

A seconda dei sintomi principali le tossine si classificano in PSP (Paralithic Shellfish Poisoning), CFP (Ciguatera Fish Poisoning), ASP (Amnesic Shellfish Poisoning), DSP (Diarrethic Shellfish Poisoning), AZP (Azaspiracid Shellfish Poisoning), CTP (Cyanobacteria Toxin Poisoning), NSP (Neurotoxic Shellfish Poisoning).

Queste tossine possono raggiungere l'uomo attraverso gli organismi vettori, che sono molluschi e/o vertebrati che si cibano della microalga tossica e, non subendo l'effetto negativo della tossina, bioaccumulano la tossina nei loro tessuti. L'uomo può quindi venire intossicato direttamente mangiando l'organismo vettore erbivoro che ha filtrato la microalga tossica, o indirettamente tramite l'ingresso dell'erbivoro nella catena alimentare (Figura 1)

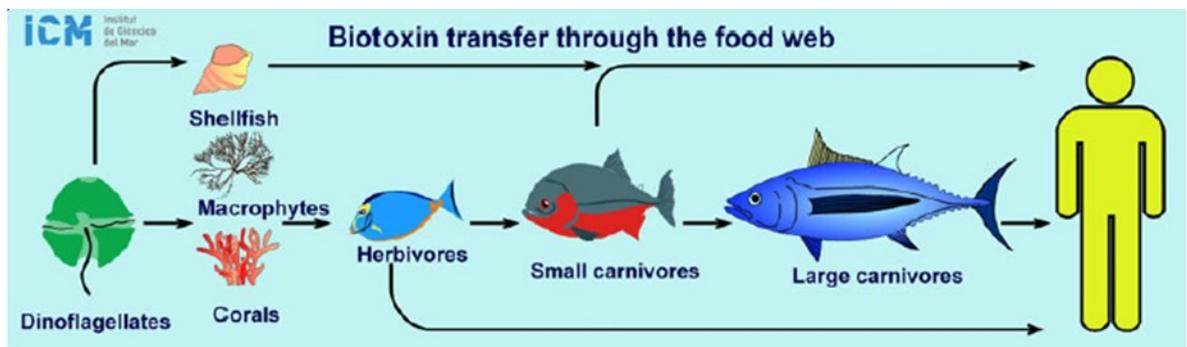


Figura 1 Trasferimento della tossina lungo la catena trofica (Berdalet et al., 2016).

È molto probabile che, essendo eterotrofe e mixotrofe, le microalghe possano nutrirsi di batteri tossici diventando esse stesse vettori di tossine prodotte da batteri.

Le specie algali tossiche appartengono alle classi Dinophyceae, Raphidophyceae, Prymnesiophyceae, Dictyochophyceae, Bacillariophyceae e ai cianobatteri (Sellner et al., 2003).

Tra i fattori che influenzano gli HAB ci sono:

- processi naturali come, fenomeni di upwelling la circolazione delle acque e input fluviali (Sellner et al., 2003);
- cambiamenti climatici: l'abbondanza e la distribuzione geografica di alcune fioriture possono essere influenzate dalle variazioni di temperatura in grado di prolungare i periodi di stratificazione e variare la struttura fisica della colonna d'acqua andando a favorire le dinoflagellate e i loro rappresentanti potenzialmente dannosi (Tester et al. 1993; Yin et al., 1999). Inoltre le variazioni di temperatura sono capaci di ampliare la durata dei bloom (Moore et al., 2008) e anticiparne o ritardarne la comparsa (Totti et al., 2019);
- Eutrofizzazione: fenomeno che si verifica maggiormente nelle aree costiere dove acque reflue ricche di nutrienti, derivanti dalle attività antropiche (agricole, industriali e ricreative) modificano le quantità e la composizione del pool dei nutrienti, favorendo le condizioni ambientali necessarie affinché sviluppino gli HABs (Anderson et al., 2002; Vitousek et al., 1997).

L'aumento delle fioriture algali verificatosi negli ultimi decenni è in realtà un aumento apparente in quanto la maggiore consapevolezza scientifica, migliori metodi di identificazione, quantificazione e monitoraggio hanno portato a un

rilevamento di fioriture che nel passato erano inosservate e la cui pericolosità veniva sottovalutata (Hallegraeff et al., 2021).

Le conseguenze degli HAB includono problemi di sicurezza pubblica associati alla salute umana, effetti negativi sulla funzionalità degli ecosistemi, perdite economiche nei settori turistico e alimentare. Uno studio (Hoagland et al., 2002) ha stimato una perdita annuale di circa 49 milioni di dollari a causa degli impatti correlati all'HAB negli Stati Uniti per un periodo di studio di 5 anni (1987–1992), in aree ideali per l'insediamento e l'allevamento di molluschi selvatici (ad esempio, Alaska e Georges Bank); queste aree rimangono chiuse spesso tutto l'anno a causa del persistere della tossicità dei molluschi allevati a causa delle ripetute esposizione alla tossina e/o incapacità di depurazione dei molluschi contaminati dalla tossina (Sellner et al., 2003).

La previsione di questi fenomeni e un efficace piano di monitoraggio possono aiutare a mitigare sia gli effetti economici sia gli effetti sanitari.

Tossine emergenti

Le tossine marine emergenti sono tossine solo recentemente descritte nelle acque europee, fenomeno molto probabilmente incentivato dagli effetti della globalizzazione e del cambiamento climatico (Karlson et al., 2021), che facilitano la migrazione e l'insediamento di produttori non indigeni di tossine (Estevez et al., 2019). Le principali tossine emergenti in Europa sono: Immine

cicliche (Cis), Brevetossine (BTXs), Tetrodotossine (TTXs), Azaspiracidi (AZAs), Palitossine (PITXs) e Ciguatossine (CTXs). I loro effetti dannosi e le conseguenze socioeconomiche hanno indotto a istituire protocolli di monitoraggio per rilevarle, caratterizzarle e fissare i loro livelli massimi nei frutti di mare, da poter in futuro far adottare da parte della legislazione europea (European Commission, 2013; European Union, 2004). Si stanno compiendo sforzi volti allo sviluppo di nuove metodologie di rilevamento, e per l'aggiornamento delle tecniche di monitoraggio (Estevez et al., 2019; O'Neill et al., 2021). La metodologia di identificazione maggiormente applicata si basa su approcci *in vitro* o chimici poiché i test biologici che utilizzano i topi sono caduti in disuso a causa della mancanza di accuratezza e di problemi etici (Botana et al., 2013; Vieira et al., 2013).

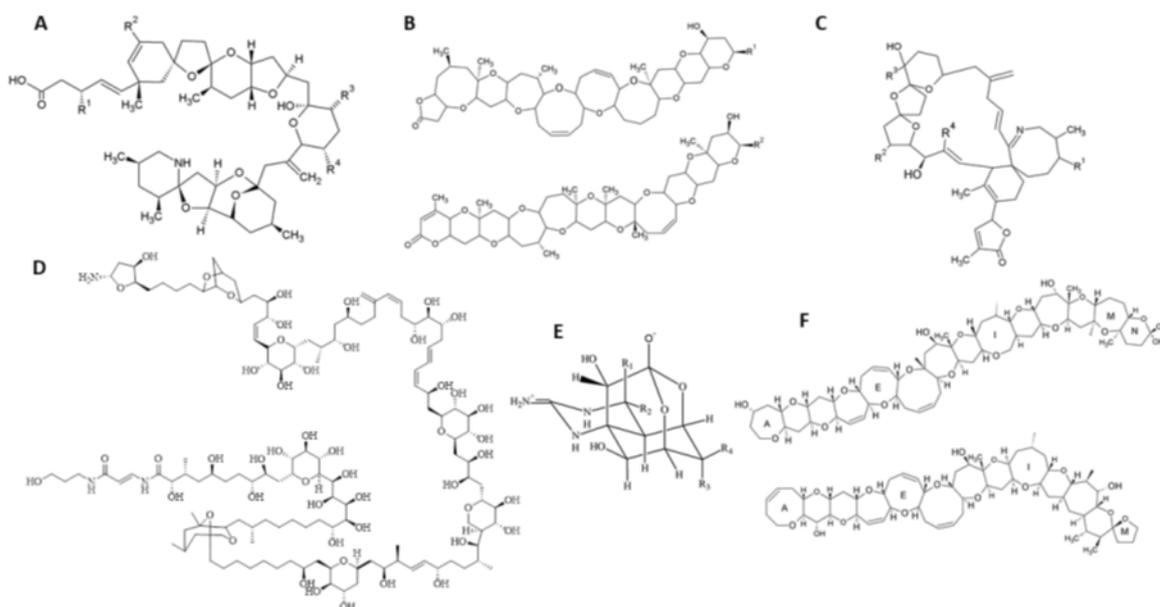


Figura 2 A) Azaspiracidi, (B) Brevetossine, (C) Spirolidi, (D) Palitossina, (E) Tetradotossina, (F) Ciguatossina (Otero and Silva, 2022)

Immine cicliche (CIs)

Le immine cicliche sono composti macrociclici con gruppo imminico nella loro struttura chimica (Molgó et al., 2007) e includono i seguenti composti: spiroolidi, pinnatossime e gimnodimine.

Spirolidi (SPXs)

Gli spiroolidi sono composti macrociclici con gruppi etere immine e spiro-legati (Otero et al., 2012a). Sono stati identificati 16 analoghi in Europa e nelle acque del sud e nord America (Guinder et al., 2018; Salgado et al., 2015), il 13-desmethyl spirolide C (SPX-13) è l'analogo più diffuso (Fonfría et al., 2010).

Gli spiroolidi sono prodotti dalle dinoflagellate *Alexandrium ostenfeldii* e *Alexandrium peruvianaunum* (Otero et al., 2010).

In Europa queste tossine sono state ritrovate in bivalvi (*Mytillus galloprovincialis*) (Moreiras et al., 2019), gasteropodi (*Gibbula umbilicalis*, *Nucella lapillus*, *Patella intermedia*, *Monodonta* sp. e nella stella marina *Marthasterias glacialis*) (Otero et al., 2019; Silva et al., 2013). Pur essendo molto frequente la loro presenza nei crostacei, nessuna intossicazione umana è stata riportata in relazione al consumo di organismi contaminati da SPX (Estevez et al., 2019; Fonfría et al., 2010; Otero et al., 2012a). La loro tossicità ad azione rapida, successiva all'iniezione intraperitoneale nei topi, è fonte di preoccupazione per le possibili conseguenze sulla salute umana (Townhill et al., 2018) poiché la modalità di azione si basa sull'interazione con i recettori nicotinici dell'acetilcolina di tipo muscolare e neuronale (ACh) (nAChR)(Fonfría et al., 2010). Il gruppo di lavoro di tossicologia dell'European Union Reference Laboratory (EURL) ha proposto un livello soglia di 400 µg SPXs/kg di molluschi (EFSA, 2010), una DL₅₀ orale per SPX-13 di 130 µg/kg, e una i.p. LD₅₀ per 7-28 µg/kg (Otero et al., 2012b).

Pinnatossine (PnTXs)

Il gruppo delle pinnatossine (PnTXs) ha la struttura chimica molto simile a quella degli SPX e consiste di 8 analoghi (Efsa, 2010). L'organismo produttore di queste tossine è *Vulcanodinium rugosum* (Aráoz et al., 2020).

Ampiamente distribuite, le pinnatossine vengono rilevate in ostriche, cozze, canalicchi e vongole provenienti dalle coste di numerosi paesi come Canada (Aráoz et al., 2020), Norvegia (Rundberget et al., 2011), Francia (Guillotín and Delcourt, 2022), Spagna (Estevez et al., 2019; Lamas et al., 2019; Otero et al., 2019) e Cile (Otero et al., 2020).

Sembra che le dinoflagellate della costa pacifica della Nuova Zelanda, Australia e la costa atlantica di Cuba producano maggiormente PnTX-E e PnTX-F (McNabb et al., 2012; Moreira-González et al., 2021; Selwood et al., 2010); a differenza delle microalghe registrate nelle acque europee, le quali producono soprattutto PnTX-G e PnTX-A (Lamas et al., 2019; Moreiras et al., 2019; Otero et al., 2019; Rambla-Alegre et al., 2018). L'Agenzia francese per l'alimentazione, l'ambiente e la salute e sicurezza sul lavoro ha fissato un livello di contaminazione accettabile di 23 µg PnTX-G/kg (Arnich et al., 2020), e i test di tossicità *in vivo* hanno fissato un DL₅₀ orale per PnTx-G di 208 µg/kg e un livello provvisorio di NOAEL (No-Observed Adverse Effect Level) di 120 µg/kg (Sosa et al., 2020).

Gimnodimine (GYMs)

Delle gimnodimine (GYMs) si conoscono otto analoghi (Bacchiocchi et al., 2020). Le gimnodimine vengono prodotte dalle specie *Karenia selliformis* e *Alexandrium ostenfeldii* (Farabegoli et al., 2018; Rambla-Alegre et al., 2018; Van de Waal et al., 2015). *A. ostenfeldii* è anche una delle specie produttrici delle spiroidi; ciò suggerisce l'esistenza di percorsi di biosintesi comuni tra le due specie, per la produzione di queste biotossine. Le gimnodimine (GYMs) sono state rilevate per la prima volta nelle ostriche della specie *Tiostrea chilensis* in Nuova Zelanda nei primi anni '90 (Farabegoli et al., 2018).

In Europa, recentemente la GYM-A è stata trovata per la prima volta nei molluschi della costa Adriatica e anche in diversi molluschi della costa nord atlantica di Spagna, comprese cozze (*Mytilus galloprovincialis*), vongole (*Cerastoderma edule*) e ostriche (*Magallana gigas* e *Ostrea edulis*) (Lamas et al., 2021).

Brevetossine (BTX)

Le brevetossine (BTX) sono polieteri ciclici, raggruppati in due forme chimiche principali A e B, in base al loro scheletro. Ad oggi, sono stati identificati circa 70 analoghi (EFSA, 2010; Thieriet, 2014). Queste

neurotossine lipofile sono prodotte principalmente dalla dinoflagellata *Karenia brevis* (Abraham et al., 2012). Altre specie di *Karenia* sono state rilevate nella laguna di Diana (costa tirrenica della Corsica) da Amzil et al. (2021): *Karenia* sp. (una specie non meglio identificata), *K. mikimotoi*, *K. papilionacea* e *K. longicanalis*. Inoltre, si sospetta che anche *Heterosigma akashiwo* e *Fibrocapsa japonica* siano coinvolte nella produzione delle BTX (Amzil et al., 2021; Band-Schmidt et al., 2012). Le BTX sono responsabili della Neurotoxic Shellfish Poisoning (NSP), la cui intossicazione avviene per ingestione, ma anche per inalazione di aerosol o contatto dermico (Abraham et al., 2021; Bordin et al., 2021; Morris et al., 1991). I sintomi causati dall'esposizione a queste tossine neurotossiche sono legati a disfunzioni del tratto digerente e irritazione del tratto respiratorio, (EFSA, 2010; Morris et al., 1991; Pierce et al., 2005). Il meccanismo d'azione delle BTX consiste nella depolarizzazione delle membrane cellulari neuronali e muscolari (Konoki et al., 2019) e alcuni studi indicano anche la potenziale capacità nell'indurre danni al DNA e aberrazioni cromosomiche. Le BTX sono considerate endemiche delle aree del Golfo del Messico, della Florida, delle Indie Occidentali, e Nuova Zelanda, dove si ha maggior diffusione delle fioriture di *K. brevis* (Amzil et al., 2021). L'UE non ha ancora regolamentato le BTX poiché la scarsità di dati quantitativi sulla tossicità non permette di stabilire il livello della *Tolerable Daily Intake*

(TDe la *Acute Reference Dose* (ARfD)(EFSA, 2010). Nel 2018, BTXs sono state rilevate in Europa per la prima volta, nelle cozze della Corsica durante la stagione invernale. Non sono stati registrati incidenti mortali o avvelenamenti (Amzil et al., 2021). Un gruppo di lavoro dall'Agenzia francese per l'alimentazione, l'ambiente, e salute e sicurezza sul lavoro (Anses) ha proposto un livello orientativo di 180 µg BTX-3 eq./kg di polpa di mollusco (Arnich et al., 2021). Per il rilevamento e la quantificazione, saggi *in vitro* e immunologici sono efficaci nel rilevare questo gruppo di biotossine nelle matrici marine. Tuttavia, anche tecniche come LC-MS/MS (cromatografia liquida ad alta prestazione-spettrometria di massa) si presentano come strumenti efficaci per la determinazione e la quantificazione delle BTX grazie all'elevato grado di specificità fornito (Otero and Silva, 2022).

Azaspiracidi (AZAs)

Gli azaspiracidi (AZA) sono molecole lipofile con una struttura costituita da un'ammina ciclica, tre legami ad anello di tipo spiro e un gruppo acido carbossilico (Giuliani et al., 2019). Alcuni AZA sono metaboliti e prodotti dei processi di ossidazione, idrossilazione, decarbossilazione e disidratazione che si verificano nei molluschi (Mudge et al., 2020; Rossi et al., 2017). Il gruppo AZA consiste di più di 60 analoghi (Mudge et al., 2020). In Europa, le tossine regolamentate sono AZA-1 e AZA-2 e rappresentano gli analoghi più diffusi

abbondanti del gruppo AZA (Otero and Silva, 2022). Nel 2012 l'analogo AZA-2 è stato trovato nelle acque dell'Adriatico (Bacchiocchi et al., 2015).

Gli AZAs sono prodotti principalmente dalle dinoflagellate dei generi *Azadinium* e *Amphidoma* (Leyva and Maruenda, 2021). La modalità di azione degli AZA nell'uomo è sconosciuta.

Il principale vettore di avvelenamento da molluschi contaminati da Azaspiracidi (AZP) è il mitilo (*Mytilus edulis*) oltre a spugne marine, bivalvi e crostacei (Aasen et al., 2011; Farabegoli et al., 2018a; Leyva-Valencia et al., 2021; Otero et al., 2020). Recentemente, 19 nuovi vettori per gli AZA sono stati riportati nei tre diversi phyla: molluschi, artropodi ed echinodermi (Silva et al., 2020).

Per quanto riguarda i metodi di rilevamento, la ricerca si è concentrata sulla produzione di anticorpi monoclonali e policlonali contro AZA (Bellocci et al., 2010; Forsyth et al., 2006; Samdal et al., 2019) ma la metodologia basata su LC-MS/MS sembra l'approccio migliore.

La tossicità orale di AZA1 verso i topi indica che le singole dosi orali che causano letalità variano da 250 a 600 µg/kg.

Palitossine (PLTXs)

La palitossina (PLTX) è una molecola grande e complessa con uno scheletro alifatico poliidrossilato e parzialmente insaturo, con più di 100 atomi di carbonio con 64 centri chirali (Otero and Silva, 2022); è la più grande e potente tossina non peptidica identificata fino a oggi (Patocka et al., 2015). Viene prodotta da esacoralli del genere *Palythoa* e da alcune specie di dinoflagellate del genere *Ostreopsis* (Tichadou et al., 2010). Diversi analoghi tra cui omopalitossina, bisomopalitossina, neopalitossina, deossipalitossina e la 42-idrossi-palitossina sono stati identificati nelle specie del genere *Palythoa* (Patocka et al., 2018).

Tutte le tossine menzionate bloccano la pompa Na^+/K^+ -ATPasi andando ad alterare la normale omeostasi ionica nei tessuti eccitabili e non (Patocka et al., 2015). PLTX si accumula in numerosi organismi come coralli, spugne, mitili e crostacei (Tibiriçá et al., 2019).

Negli ultimi due decenni alcune specie del genere *Ostreopsis* hanno causato difficoltà respiratorie e irritazione cutanea nei nuotatori nel Mar Mediterraneo (Spagna, Italia e Francia)(Ciminiello et al., 2008). La presenza di PLTX nei prodotti alimentari non è regolamentata nell'UE e non esiste un metodo ufficiale riconosciuto per la determinazione delle tossine del gruppo PLTX. L'EFSA (Autorità Europea per la Sicurezza Alimentare) ha espresso

preoccupazione e ha chiesto una valutazione della tossicità cronica di questa potente tossina marina (Otero and Silva, 2022). Attualmente non esiste un metodo di riferimento per il rilevamento e la quantificazione di queste tossine. I saggi biologici su topi o ratti sono stati utilizzati per il monitoraggio delle tossine nei frutti di mare. tuttavia, queste metodologie sono state attualmente sostituite da metodi basati su saggi funzionali e metodi chimici. Sono stati sviluppati diversi metodi di rilevamento basati sulle interazioni tra Na, K-ATPasi e PLTX (Reverté et al., 2014). Recentemente, la tossicità cronica della PLTX è stata valutata dopo somministrazione orale ai topi, mediante sonda gastrica per 28 giorni. Per la somministrazione orale quotidiana ripetuta di PLTX sono stati fissati i valori NOAEL di 0,03 µg/kg e LD₅₀ di 0,44 µg/kg di PLTX (Boente-Juncal et al., 2020).

Ciguatossine (CTXs)

Le ciguatossine (CTX) sono polieterei complessi composti da 13 anelli fusi da legami etere. La loro modalità di azione consiste nell'attivazione dei canali sodio voltaggio-dipendenti (Na_v) sulle membrane cellulari, con conseguente aumento della permeabilità agli ioni sodio e interruzione della funzionalità cellulare (Bidard et al., 1984; Lombet et al., 1987). Le CTX sono composti liposolubili, stabili al calore (Pottier et al., 2002). Sono tossine considerate

endemiche nei Caraibi (C-CTX), Regioni dell'India (I-CTX) e del Pacifico meridionale (P-CTX), e negli ultimi due decenni sono state segnalate anche nelle regioni più temperate (Fraga et al., 2011; Otero et al., 2010b). Per quanto concerne l'origine, le CTX sono prodotte da dinoflagellate dei generi *Gambierdiscus* e *Fukuyoa*, che crescono adese ai sedimenti, attaccati ad alghe e barriere coralline in acque poco profonde tropicali e subtropicali. Nei pesci erbivori (Muraenidae, Serranidae, Sphyraenidae, Lutjanidae) (Silva et al., 2015) le CTX vengono biotrasformate in forme ancora più tossiche (Mak et al., 2013).

L'avvelenamento da ciguatera è una sindrome caratterizzata da uno stadio acuto e uno cronico, il cui quadro sintomatologico comprende disturbi neurologici, cardiovascolari e gastrointestinali (Friedman et al., 2017).

In Europa il primo caso di intossicazione da ciguatera è avvenuto nelle Isole Canarie (Spagna), a causa dell'ingestione di un pesce contaminato dall'analogo C-CTX-1, presente in 1.0 ppb (ng/g) (Pérez-Arellano et al., 2005). I consumatori europei sono tutelati dal regolamento (CE) n. 854/2004 della Commissione, che impone che i prodotti della pesca contenenti CTX siano vietati in commercio (Casteleyn et al., 2007). Ai fini della ricerca e della determinazione delle CTX, si consiglia di utilizzare un saggio biologico semi-quantitativo abbinato a un

metodo analitico chimico per la conferma (LC-MS/MS) (Costa et al., 2021; Díaz-Asencio et al., 2018; Friedman et al., 2017).

Tetrodotossine (TTXs)

Le TTXs sono alcaloidi la cui porzione di guanidina è legata a uno scheletro di carbonio ossigenato (Campbell et al., 2013; Chau et al., 2011). Sono presenti 30 analoghi strutturali con diversi gradi di tossicità a seconda della loro struttura chimica (Bane et al., 2014; Yotsu-Yamashita et al., 1999).

La TTX, legandosi ai canali del sodio voltaggio-dipendenti nelle membrane, blocca il flusso di ioni sodio all'interno delle cellule nervose (Isbister and Kiernan, 2005). La tossina influenza la generazione del potenziale d'azione e la conduzione dell'impulso, alterando la funzionalità del neurone.

Yotsu-Yamashita et al., 1999 hanno condotto uno studio per valutare l'effetto della posizione dei gruppi idrossilici nella molecola TTX. I risultati dello studio hanno rivelato che la posizione dei gruppi idrossilici, in corrispondenza degli atomi di carbonio C-6 e C-11, ha un impatto significativo sul legame a idrogeno degli analoghi della TTX ai canali del sodio delle membrane delle cellule neuronali (Yotsu-Yamashita et al., 1999).

I sintomi causati dall'ingestione di cibi contaminati consistono in parestesia della lingua e delle labbra, paralisi motoria, ipotensione, bradicardia, disritmia

cardiaca e perdita di coscienza (How et al., 2003). Nei casi più gravi, l'avvelenamento da TTX causa paralisi respiratoria (Rodriguez et al., 2008).

La capacità di sintesi della TTX negli organismi marini, sebbene non ancora chiaramente definita, è attribuita ad alcune specie di batteri endosimbionti in alcuni organismi marini. Alcuni ricercatori hanno isolato specie di batteri marini appartenenti ai generi *Vibrio*, *Bacillus*, *Aeromonas*, *Shewanella* e *Alteromonas*, capaci di sintetizzare TTX (Pratheepa et al., 2016).

Tra le specie del genere *Vibrio* in grado di produrre TTX, *V. alginolyticus* e *V. parahaemolyticus* sono le più frequentemente riportate (Leão et al., 2018; Pratheepa et al., 2016; Turner et al., 2015) e la loro crescita è favorita da temperature elevate, aumento delle precipitazioni e conseguenti riduzioni di salinità nello strato d'acqua superficiale (Tirado et al., 2010).

Secondo le ipotesi non sperimentate di Kotaki et al. e Chau et al. è probabile che i geni NRPS e PKS contenuti in *V. alginolyticus*, codificanti per la sintesi peptidica non ribosomiale e per la polichetasi sintasi rispettivamente, svolgano un ruolo importante nella biosintesi della TTX (Chau et al., 2011; Kotaki and Shimizu, 1993). Alcuni autori hanno suggerito il possibile coinvolgimento delle dinoflagellate nella produzione di TTX e questo è il caso di *Prorocentrum cordatum* poiché è stata notata una correlazione tra la presenza di TTX nei molluschi e di *P. cordatum* nelle acque marine della Grecia tra il 2006 e il 2012

(Bane et al., 2014; Pratheepa et al. 2016; Vlamis et al., 2015). Composti simili alla TTX sono stati trovati anche nelle colture di *P. cordatum* composti capaci di avere effetto inibitorio su canali del sodio a seconda del ceppo e delle condizioni ambientali di crescita (Rodríguez et al., 2017).

Tra il 2014 e il 2016, Turner et al. (2017) hanno mostrato la relazione tra l'incidenza di molluschi bivalvi contaminati da TTX in Gran Bretagna e le caratteristiche ambientali dei siti di campionamento, evidenziando che la maggior parte dei campioni contaminati provenivano da siti caratterizzati da fondali bassi (<5 m), salinità relativamente bassa e alta temperatura (>15 °C).

Le TTX sono sempre state confinate nell'area indo-pacifica del Giappone, dove il pesce palla (fam. Tetraodontidae) viene pescato e mangiato come fugu, piatto della cucina tradizionale (Noguchi et al., 2011) causando però numerose morti ogni anno. Nel 2003 il pesce palla è entrato nel Mar Mediterraneo orientale probabilmente attraverso il canale di Suez (Bentur et al., 2008; Katikou et al., 2009). Il primo caso di intossicazione da TTX in Europa è avvenuto nel 2006, a causa del consumo del gasteropode *Charonia lampas lampas*, comprato al mercato di Malaga (Spagna) ma pescato nelle acque del Portogallo meridionale.

In Europa l'unica normativa in riferimento alle TTXs si riferisce al divieto di vendita dei pesci della famiglia *Tetraodontidae* e dei relativi prodotti derivati (European Union, 2004).

Nel 2017 L'EFSA ha proposto il limite di 44 $\mu\text{g TTX equivalenti/kg}$ per la commercializzazione dei molluschi, basandosi sul NOAEL di 75 $\mu\text{g/kg}$ di molluschi (Knutsen et al., 2017). Tuttavia, lo studio condotto da Boente-Juncal et al. (2019) ha dimostrato che anche basse dosi per via orale (75 $\mu\text{g/kg}$) di TTX hanno effetti dannosi sui reni e tessuti cardiaci (Boente-Juncal et al., 2019).

In Europa sono tre le metodologie prevalentemente utilizzate per la determinazione del TTX: saggi cellulari, metodi basati su anticorpi, e metodi chimico-analitici (Otero and Silva, 2022).

Il fitoplancton nel mare Adriatico

L'Adriatico settentrionale è caratterizzato da un elevato input fluviale e da una bassa profondità che influenzano sia il regime di circolazione (Artegiani et al., 1997) che lo stato trofico (Degobbis et al., 2000). In questo bacino infatti la produttività è molto più elevata rispetto alla caratteristica oligotrofia generale del Mar Mediterraneo (D'Ortenzio and D'Alcalà, 2009; Fonda Umani, 1996). Questo ha una grossa influenza nella struttura delle comunità fitoplanctoniche

di quest'area, non solo in termini di biomassa, ma anche di composizione di specie.

L'analisi delle serie storiche del fitoplancton è considerata uno strumento utile a evidenziare i cambiamenti ambientali nel breve e lungo termine, grazie al rapido turnover e ai rapidi tempi di risposta delle specie (Totti et al., 2019).

Nell'ultimo decennio i fattori climatici (intensità e andamento delle precipitazioni) e la pressione antropica (carico dei nutrienti) hanno modellato la struttura della comunità e l'andamento stagionale del fitoplancton del Mar Adriatico (Totti et al., 2019). Ad esempio, i cambiamenti climatici hanno favorito la diffusione e l'insediamento di specie aliene come la diatomea *Pseudo-nitzschia multistriata* (Corriero et al., 2016) la quale è diventata specie indicatrice per la stagione autunnale nel Mare Adriatico nordoccidentale.

In uno studio condotto da Totti et al. (2019) sono stati registrati parametri chimico-fisici e abbondanza /biomassa del fitoplancton dal 1988 al 2016, in corrispondenza del Transetto Senigallia Susak, uno dei siti LTER (*Long Term Ecological Research*). Nel periodo di studio, è stato osservato che le variazioni ambientali quali disponibilità dei nutrienti e pressione atmosferica hanno influenzato i valori della biomassa algale e la variazione temporale dei bloom fitoplanctonici; ad esempio, fioriture di diatomee si sono verificate in modo irregolare tutto l'anno riflettendo l'irregolarità degli eventi meteorologici. Lo

studio ha evidenziato che alcune specie sono indicatrici per ciascuna stagione: ad esempio *Skeletonema marinoi*, *Thalassiosira* spp., *Dytilum brightwellii*, *Thalassiosira rotula* e *Lauderia annulata* nella stagione invernale, *Prorocentrum cordatum*, *Prorocentrum micans*, *Dactyliosolen fragilissimus*, *Noctiluca scintillans*, *Euglena* spp., *Nitzschia longissima*, *Prorocentrum triestinum*, *Alexandrium* spp., *Protoperidinium steinii* e *Dinophysis sacculus* in primavera, *Proboscia alata*, *Rhizosolenia* spp., *Pseudo-nitzschia pseudodelicatissima* complex, *Pleurosigma* spp., *Nitzschia gobbii*, *Prorocentrum compressum*, *Rhabdolithes claviger* e *Guinardia flaccida* in estate e *Lioloma pacificum*, *Cylindrotheca closterium*, *Asterionellopsis glacialis*, *Dictyocha fibula*, *Eucampia cornuta*, *Chaetoceros rostratus*, *C. costatus*, *C. tortissimus*, *C. brevis*, *C. lauderi*, *Calciosolenia murrayi* in autunno.

Le specie potenzialmente tossiche presenti nel mare Adriatico sono: *Dinophysis* spp. e *Prorocentrum* spp. coinvolte nella DSP, che rappresenta la principale biointossicazione che ha spesso causato la chiusura degli impianti di mitilicoltura (Morton et al., 2009); *Alexandrium* spp. e *Gymnodinium* spp. potenzialmente responsabili della PSP (Pavela-Vrančić and Marasović, 2004); *Ostreopsis ovata*, produttrice di palitossine, la cui fioritura che si protrae da giugno a ottobre (Totti et al., 2010), *Fibrocapsa japonica*, specie di origine

giapponese che causa quasi ogni anno maree rosse estive e la cui tossicità si manifesta con la produzione di composti emolitici e R.O.S. (Cucchiari et al., 2008); *Coolia* spp. produttrici di neurotossine; *Azadinium* spp, responsabili della produzione di azaspiracidi.

Recentemente, nei mitili dell'area di Portonovo sono state trovate concentrazioni di TTX, oltre il valore soglia. Considerando che tale tossina può essere prodotta o veicolata da specie microalgali, questo ritrovamento ha ispirato il lavoro di questa tesi.

SCOPO DELLA TESI

L'area di studio è Portonovo di Ancona, un'area particolarmente soggetta alla contaminazione di TTX dei mitili, soprattutto nella stagione estiva. Considerata la presenza nella comunità fitoplanctonica di specie potenzialmente produttrici di TTX, lo scopo di questa tesi è stato quello di investigare se tali specie algali producessero TTX in condizioni sperimentali.

MATERIALI E METODI

Area di studio

Lo studio è stato effettuato nella baia di Portonovo, località situata lungo la Riviera del Conero. L'area si contraddistingue per la presenza di boschi, laghi salmastri e falesie costiere calcaree. I fondali marini sono prevalentemente ciottolosi e alternati a fondali sabbiosi. La peculiarità della zona è data da banchi naturali di mitili, situati in acque poco profonde (10-30 cm) ed è quindi caratterizzato in primavera-estate da condizioni ambientali decisamente favorevoli alla contaminazione da TTXs (elevata temperatura dell'acqua, forte irraggiamento solare)(Bacchiocchi et al., 2021).

Le aree agricole circostanti e il moderato flusso turistico nella stagione estiva rappresentano un forte impatto antropico a causa del rilascio di sostanze organiche e inorganiche. Dal 2007 il Dipartimento di Scienze della Vita e dell'Ambiente campiona con frequenza mensile la comunità fitoplanctonica e i parametri ambientali nella stazione PN (43°36.201'N, 13°36.705'E, 3 nM dalla costa).

Campionamento

Il campionamento è stato effettuato al Molo di Portonovo (MP) nel periodo compreso tra giugno e agosto (dal 3/6/2021 al 5/8/2021), i.e. nel periodo interessato dalla contaminazione da TTX nei mitili, con frequenza settimanale.

A ogni campionamento sono stati raccolti parametri ambientali (condizioni meteomarine, temperatura e salinità), concentrazione dei nutrienti inorganici, fitoplancton, mitili, e sedimento.

Prima del prelievo dei campioni veniva effettuata la registrazione dell'altezza del moto ondoso secondo la scala Douglas e delle condizioni meteorologiche.

Temperatura e salinità sono state misurate tramite la multisonda YSI 30

Salinity, Conductivity, Temperature

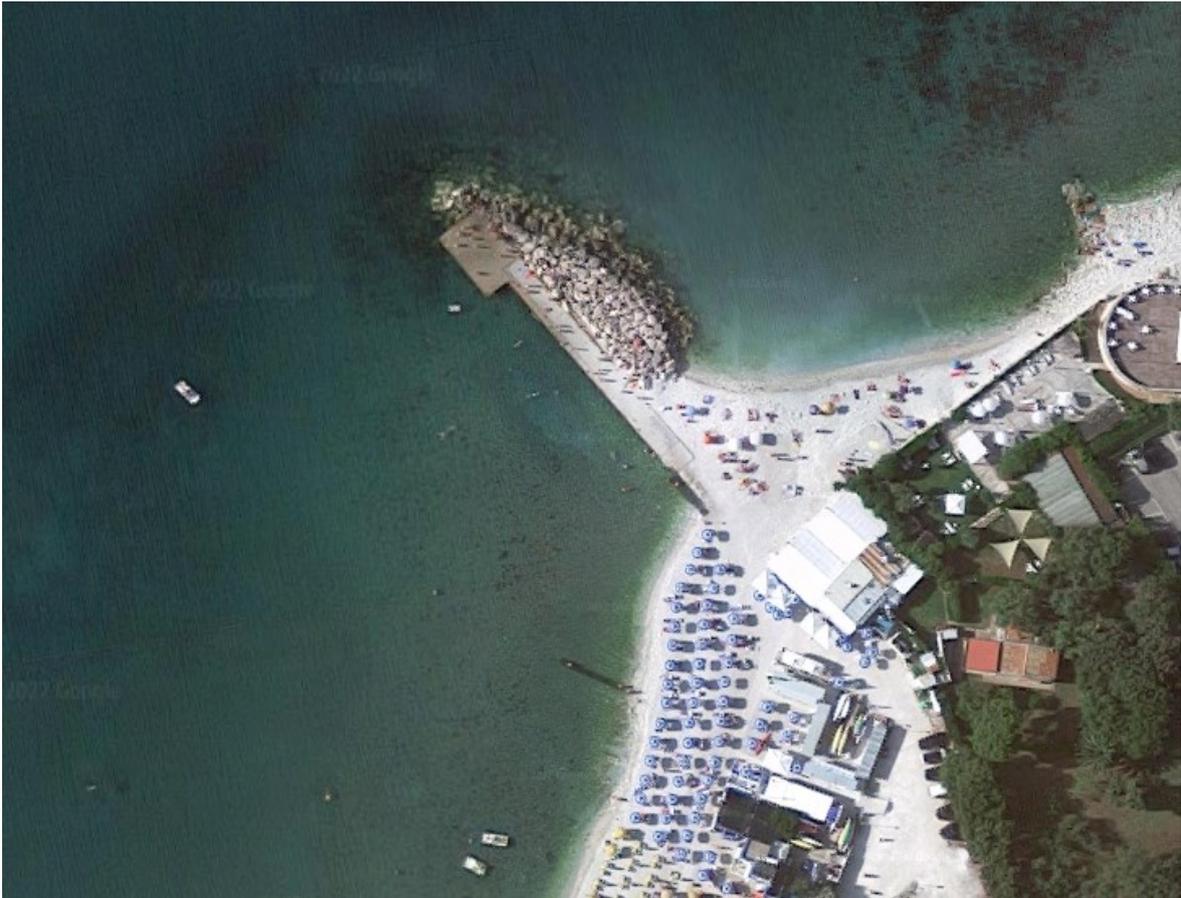


Figura 3 Area di studio: Molo di Portonovo (MP) ($43^{\circ}33'55''$ N, $13^{\circ}35'26''$ E); fondo 2/3 m.

Sono stati inoltre raccolti i seguenti campioni:

- Un campione (3 repliche) d'acqua superficiale per l'analisi dei nutrienti. Questa operazione è stata eseguita mediante l'utilizzo di una siringa (volume 50 ml), associata a un filtro di nitrocellulosa GF/F Whatman (25 mm, nominal pore size $0.7 \mu\text{m}$) e 3 provette di propilene nelle quali si è versata l'acqua di mare filtrata. Al fine di evitare la degradazione dei nutrienti, le provette sono state conservate in congelatore. Le analisi dei nutrienti sono state svolte dal CNR-ISMAR di Ancona.

- Un campione (500 ml) di acqua superficiale per l'analisi di fitoplancton; il campione veniva conservato con 0,8% di formaldeide prefiltrata e neutralizzata con esametilentetrammina, in bottiglie di vetro scuro, in frigorifero.
- Una retinata raccolta con retino da fitoplancton (con maglia da 20 μm), messo in corrente per almeno 5 min per ottenere un campione concentrato su cui effettuare l'isolamento e la messa in coltura di specie potenzialmente produttrici o accumulatrici di TTX.
- Un campione (3 repliche) di sedimento (rena grossolana) è stato raccolto in Falcon sterili da 50 ml per la caratterizzazione delle comunità batteriche produttrici di TTX. Le analisi sono state poi eseguite dal IZSUM di Ancona.
- I campioni di mitili (un numero di esemplari sufficiente a ottenere circa 200 g di polpa) sono stati prelevati alla profondità di 10-30 cm e trattati entro 24 ore dall'arrivo in laboratorio (in IZSUM) per prevenire i processi di metabolizzazione delle tossine. In laboratorio, le valve sono state aperte, pulite ed eventuali residui di sabbia e solidi sono stati rimossi con acqua corrente. Il mollusco è stato separato dal guscio mediante prelievo con bisturi metallico ed è stato quindi posto su setaccio a maglie larghe per eliminare l'acqua in eccesso. Per ogni

campione 10 individui sono stati raccolti in una provetta da 50 ml e conservati in congelatore a -20 °C, con lo scopo di avere materiale per effettuare eventuali studi di compartimentalizzazione delle tossine nei diversi organi dei mitili (ghiandola digestiva, branchie, mantello), qualora studi effettuati sul tessuto nel suo complesso ne evidenziassero la necessità. Il resto della polpa è stato, quindi, finemente sminuzzato con un omogeneizzatore a lame e l'omogenato trasferito in un barattolo di plastica e conservato a -20 °C fino al momento dell'analisi eseguita dal IZSUM.

Analisi della comunità fitoplanctonica

L'analisi della comunità fitoplanctonica è avvenuta tramite l'utilizzo di un microscopio invertito, Zeiss Axiovert AX135, dotato di contrasto di fase, utilizzando ingrandimenti di 200x e 400x, e con l'applicazione del metodo Utermohl (1958).

Brevemente, il campione è stato agitato circa cento volte per favorire l'omogenizzazione. Un volume noto di campione è stato versato all'interno di un cilindro (da 20 a 40 ml) posto sopra una camera circolare, i.e. la camera di Utermöhl, e lasciato sedimentare. Una volta trascorso il tempo necessario alla sedimentazione il cilindro è stato slittato su un cubetto di plexiglass per evitare

la dispersione del liquido e la camera con il campione è stata coperta con un vetrino coprioggetto. A questo punto il campione viene posto nel carrello del microscopio ottico rovesciato per la conta cellulare.

Il conteggio è stato svolto su 30 campi casuali, a un ingrandimento di 400x, e poi sull'intera camera a un ingrandimento di 200x. Le abbondanze sono state espresse in cell. l⁻¹.

Per la stima della biomassa sono stati calcolati i biovolumi cellulari, misurando le dimensioni delle cellule mediante l'utilizzo di un oculare micrometrico e poi ricavando il contenuto di carbonio ($\mu\text{g C/l}$) (Menden-Deuer and Lessard, 2000)

Messa in coltura e selezione dei ceppi algali

Dai campioni prelevati con il retino le specie potenzialmente tossiche sono state isolate (i.e. presenti nella IOC-UNESCO Taxonomic Reference List of Harmful Micro Algae, <http://www.marinespecies.org/hab/>) per essere messe in coltura con la tecnica microcapillare secondo il metodo di Hoshaw & Rosowski nel 1973, usando un microscopio ottico invertito (Zeiss Axiovert 135) dotato di contrasto di fase, con ingrandimento 200x. Le cellule isolate, dopo una crescita iniziale in micropiastre sono state trasferite in tubi di vetro e messe in camera di coltura a circa 21 °C con un fotoperiodo di 12:12h (Luce:Buio) e un irradiazione di 90-100 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$, in terreno f/4 (Guillard, 1975) al fine di ottenere delle colture monoclonali.

Analisi statistiche

Le differenze nei valori di abbondanza e biomassa dei gruppi di fitoplancton e dei taxa delle dinoflagellate tra il periodo di contaminazione dei mitili da TTX nel 2021 e il resto dell'anno sono state valutate attraverso un'analisi della varianza a una via (ANOVA). Le abbondanze dei taxa delle dinoflagellate sono state anche testate per le correlazioni di Pearson con tutti i parametri ambientali registrati. Quando erano rilevate differenze significative ($p < 0.05$), veniva effettuato anche il test di Tukey. Le analisi statistiche sono state condotte utilizzando il software Statistica 12, (StartSoft Inc.).

RISULTATI

Parametri ambientali

Per tutto il periodo di studio, la temperatura ha mostrato un andamento crescente, partendo da un minimo di 17.7 °C (3/06) a un valore massimo di 26.5 °C (30/07) (Figura 4). Per quanto riguarda la salinità, dopo un piccolo minimo di 34,4 (11/06) sono stati registrati dei valori superiori a 36 per tutto il mese di luglio; il valore massimo di 36.8 si è registrato per due giornate di campionamento consecutive (il giorno 08/07 e il giorno 15/07) (Figura 4).

Invece, analizzando la condizione del moto ondoso, valori di scala Douglas sono rimasti ben al di sotto del valore di 2 per tutti i giorni di campionamento a eccezione di due giornate (11/06 e 01/07, scala Douglas = 2) (Tabella 1).

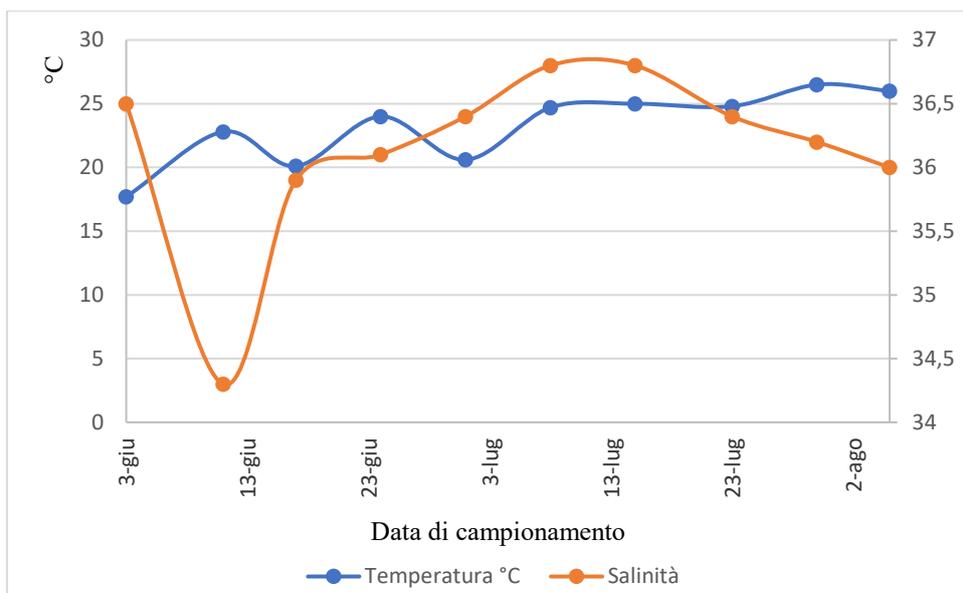


Figura 4 Andamento temporale della temperatura e della salinità nel sito MP.

Tabella 1. Condizioni meteomarine durante il periodo di studio nel sito MP.

Data	Condizioni meto-marine	Scala Douglas
03/06/2021	Mare calmo e soleggiato	0
11/06/2021	Mare poco mosso e soleggiato con qualche nuvola	2
17/06/2021	Mare calmo e soleggiato	0
24/06/2021	Mare calmo e soleggiato	0
01/07/2021	Mare poco mosso. Soleggiato con molto vento	2
08/07/2021	Mare calmo qualche nuvola	0
15/07/2021	Mare calmo e soleggiato	0
23/07/2021	Mare calmo e soleggiato	0
30/07/2021	Mare calmo e soleggiato	0
05/08/2021	Mare calmo. Soleggiato con vento	0

Nutrienti

Per quanto riguarda gli andamenti dei nutrienti inorganici (DIN = azoto inorganico disciolto e PO_4 = ortofosfato), il DIN ha mostrato due maggiori picchi di concentrazione nei giorni 17/06 e 23/07 con $5,005 \mu\text{M}$ e $4,433 \mu\text{M}$ rispettivamente, mentre il minimo di $1,071 \mu\text{M}$ è stato osservato in data 11/07 (Figura 5). Il PO_4 ha registrato il massimo di concentrazione di $0,31 \mu\text{M}$ nel giorno 17/06, mentre per tutto il mese di luglio ha mantenuto una concentrazione inferiore a $0,05 \mu\text{M}$; infine, nella prima settimana di agosto si assiste a un incremento fino al valore di $0,122 \mu\text{M}$.

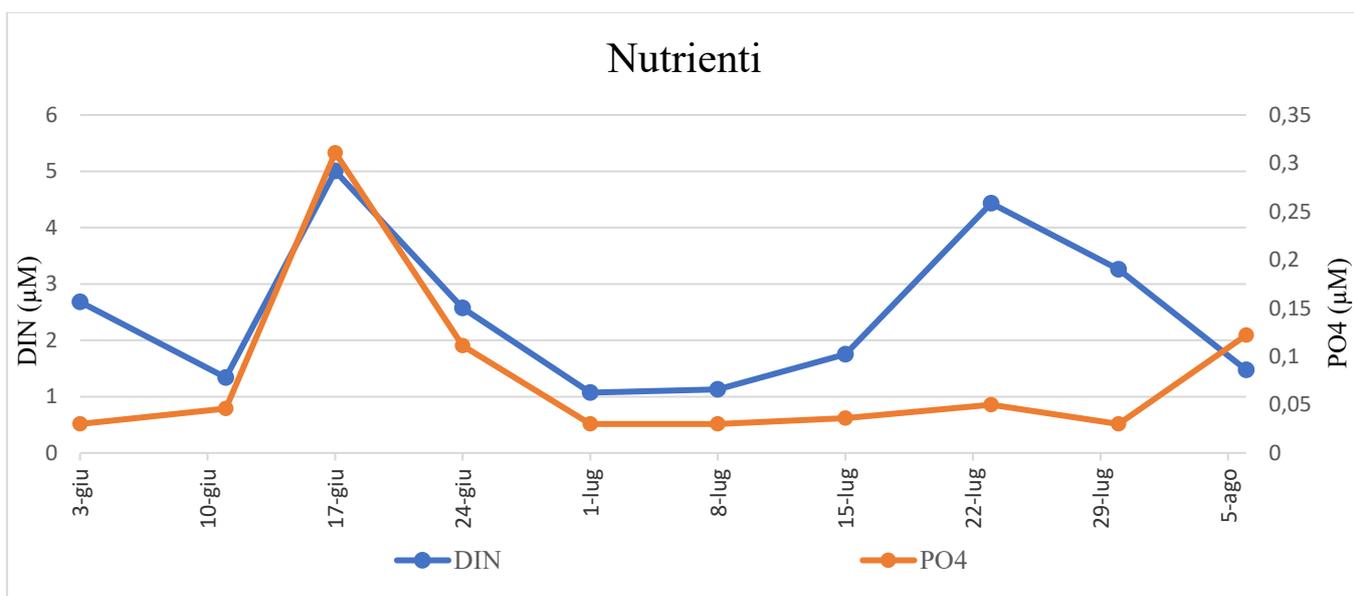


Figura 5 Andamento temporale dei nutrienti inorganici (DIN e PO_4) nel sito MP.

Andamento contaminazione TTX nei mitili

L'analisi del banco dei mitili nel sito Molo Portonovo durante l'estate 2021 ha rilevato un accumulo di TTX fin dal primo giorno di campionamento (04/06), un massimo di 296 $\mu\text{g}/\text{kg}$ il (17/06) e una fase successiva di detossificazione degli organismi fino al termine del periodo di campionamento (11/08) (Figura 6).

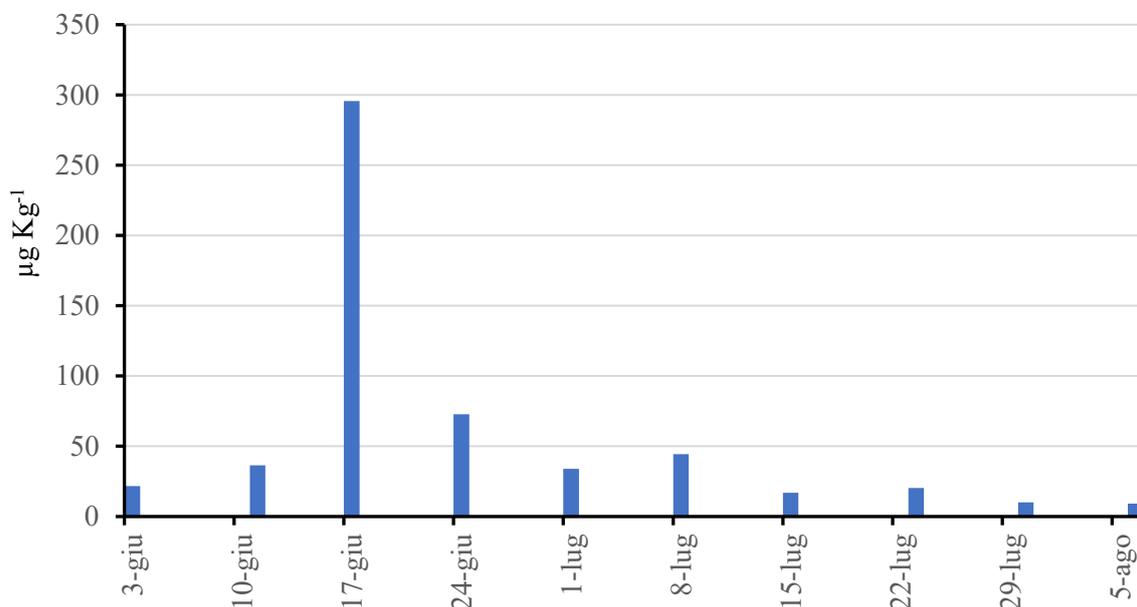


Figura 6. Livelli di contaminazione da TTXs nei tessuti dei mitili prelevati dal punto di campionamento Molo Portonovo durante l'estate 2021.

In merito alla distribuzione della TTX nei tessuti dei mitili, dall'analisi effettuata è emerso che nella prima fase della contaminazione si ha un maggiore accumulo nella ghiandola digestiva rispetto a mantello e branchie. Successivamente la tossina risultava meno concentrata nella ghiandola e con

concentrazioni minime negli altri due compartimenti oggetto di studio, probabilmente in seguito a una redistribuzione nell'intero organismo.

Caratterizzazione comunità fitoplanctonica

I taxa di fitoplancton identificati sono stati raggruppati nei gruppi principali diatomee, dinoflagellate, coccolitine, fitoflagellate.

Analizzando i dati disponibili dal sito di monitoraggio PN, nell'anno 2021 (dati non pubblicati), si osserva che le diatomee hanno raggiunto un picco di abbondanza in inverno ($7.921.554 \text{ cell. l}^{-1}$) per poi decrescere nella restante parte dell'anno registrando valori minimi di $17.252 \text{ cell. l}^{-1}$ nella stagione autunnale; le dinoflagellate e le coccolitine mostrano le massime abbondanze in tarda primavera con $152.511 \text{ cell. l}^{-1}$ e $659.184 \text{ cell. l}^{-1}$ rispettivamente per poi mantenere valori pressoché costanti ma più bassi nel resto dell'anno. Infine per quanto concerne le fitoflagellate il picco di abbondanza è stato registrato a luglio ($3.282.467 \text{ cell. l}^{-1}$) (Figura 7).

Per quanto riguarda i valori di biomassa, questi mostrano un andamento simile a quelli delle abbondanze ma in questo caso sono le dinoflagellate a mostrare i valori maggiori: le diatomee hanno mostrato picco di biomassa nel mese di gennaio ($3.504 \mu\text{g C l}^{-1}$); le dinoflagellate hanno rivelato maggiori valori di biomassa nei mesi di aprile e giugno ($2707 \mu\text{g C l}^{-1}$ e $920 \mu\text{g C l}^{-1}$); le

fitoflagellate hanno mostrato maggiore valore di biomassa nella stagione estiva ($12 \mu\text{g C l}^{-1}$), mantenendo poi un basso valore di biomassa, più o meno costante, per tutto il resto dell'anno; le coccolitine hanno raggiunto maggiore biomassa ($22 \mu\text{g C l}^{-1}$) in tarda primavera (Figura 8).

Analizzando l'andamento delle dinoflagellate durante il periodo di studio, maggiori abbondanze sono state registrate dal 21/04 al 21/06 (Figura 9), ovvero nel periodo in cui i mitili sono risultati essere contaminati da TTX. Infatti, le dinoflagellate rappresentano il maggior componente della comunità fitoplanctonica in termini di biomassa da aprile a luglio, dove il picco di aprile era dovuto a una fioritura di *Noctiluca scintillans*. Inoltre, confrontando l'abbondanza e la biomassa delle dinoflagellate tra il periodo in cui si è verificata la contaminazione da TTX nei mitili e il resto dell'anno, sono stati registrati valori significativamente più elevati durante il periodo di contaminazione ($105.000 \pm 30.541 \text{ cell. l}^{-1}$ e $120.837 \pm 34.911 \mu\text{g C l}^{-1}$) rispetto al resto dell'anno ($37.735 \pm 32.930 \text{ cellule l}^{-1}$ e $36.720 \pm 30.181 \mu\text{g C l}^{-1}$, test HSD di Tukey entrambi di livello $p < 0,05$). Nessuna differenza significativa è stata osservata per gli altri gruppi fitoplanctonici durante il periodo di osservazione.

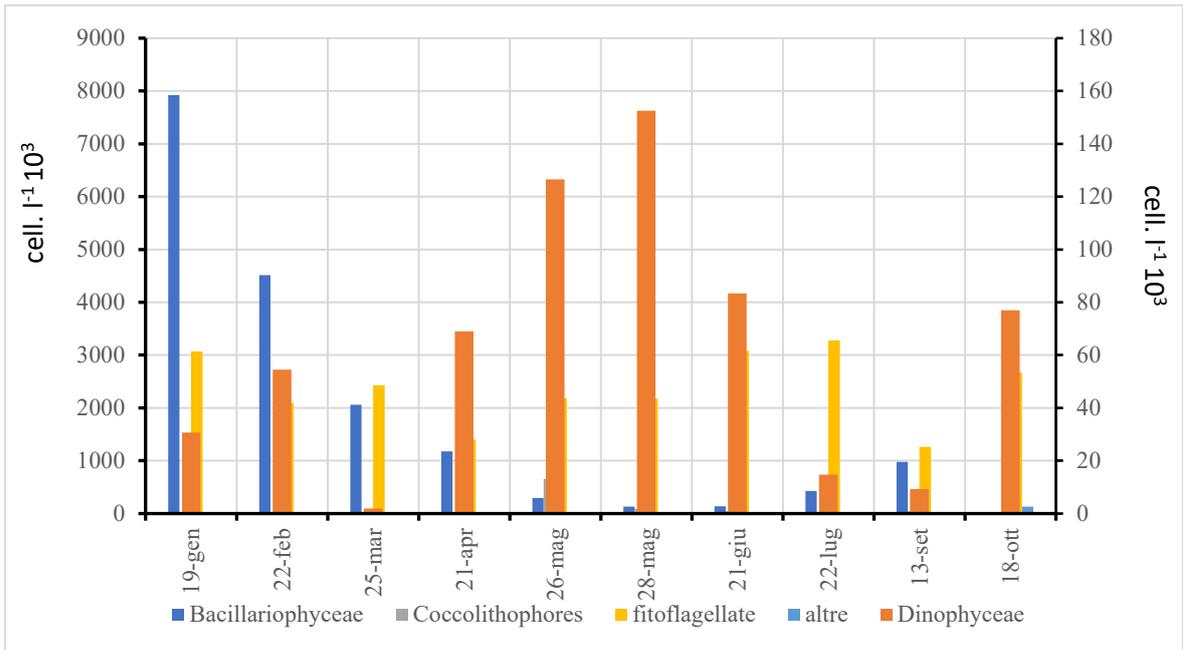


Figura 7. Andamento annuale delle abbondanze del fitoplancton nell'area di studio (stazione PN, anno 2021): diatomee, coccolitine, fitoflagellate, altre (asse y sinistro); e Dinophyceae (asse y destro).

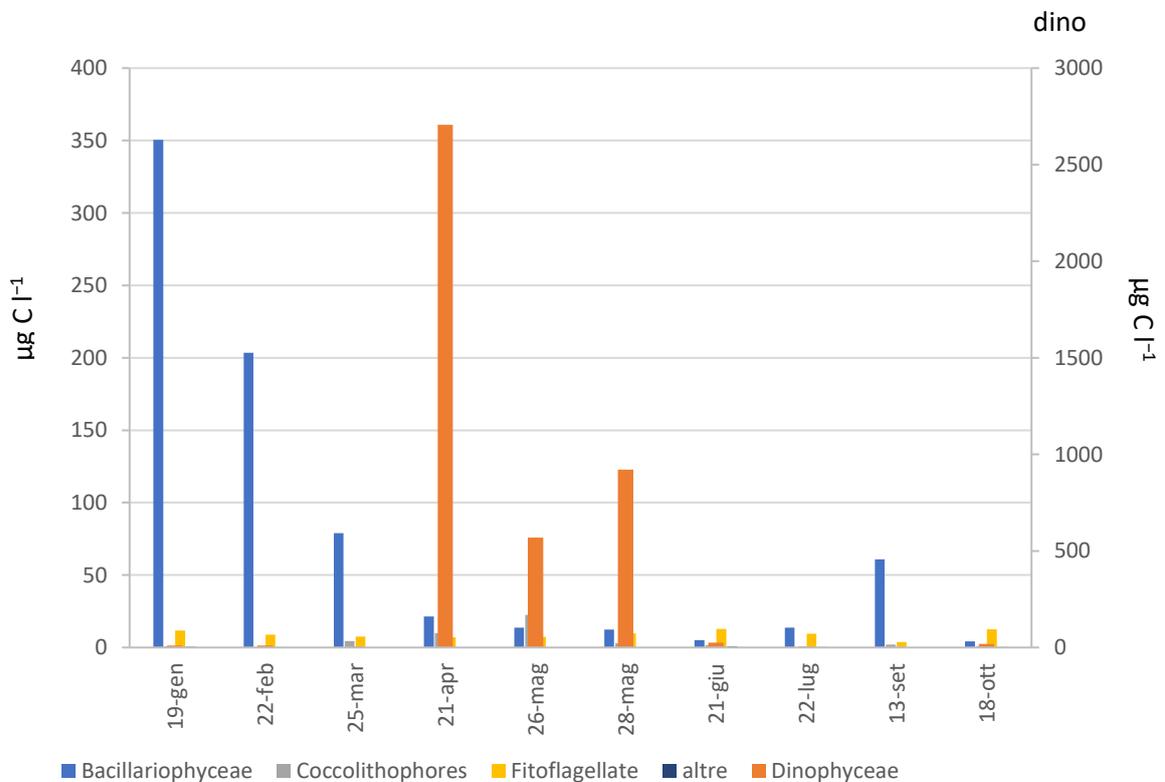


Figura 8. Andamento annuale delle biomasse del fitoplancton nell'area di studio (stazione PN, anno 2021): diatomee, coccolitine, fitoflagellate, altre (asse y sinistro) e Dinophyceae (asse y destro).

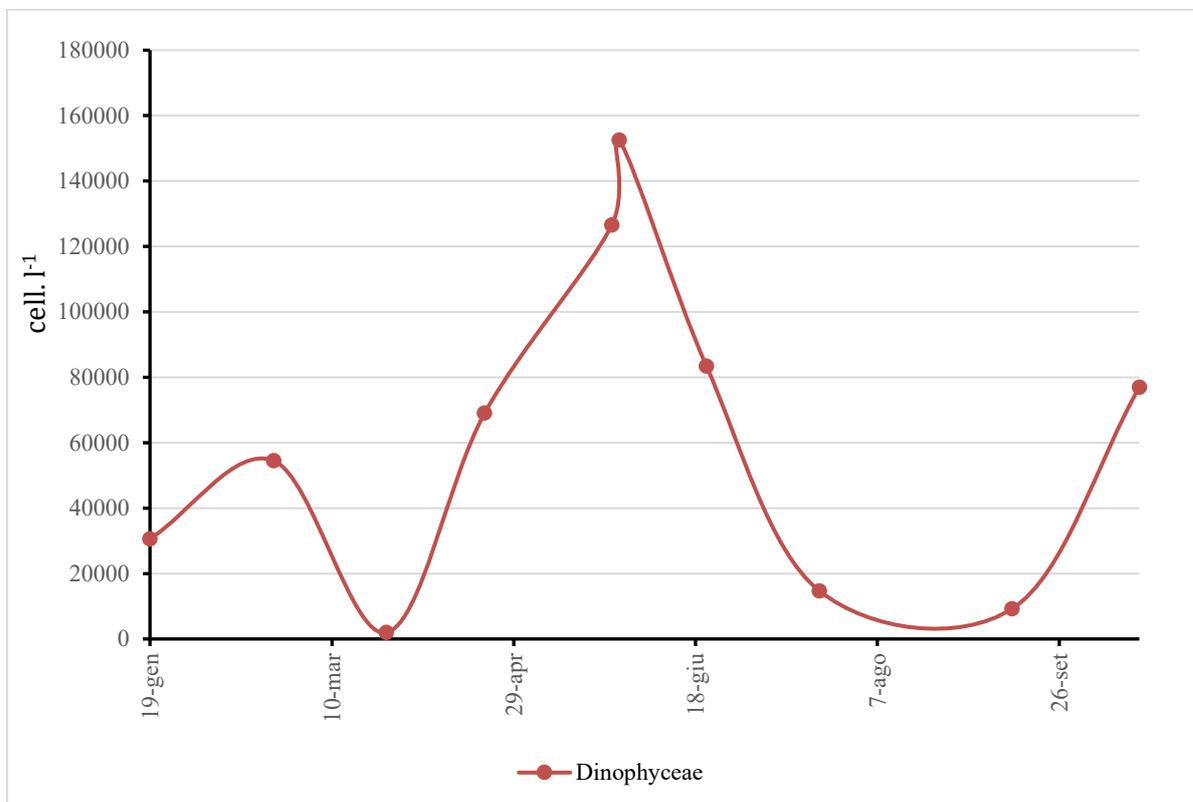


Figura 9 Andamento annuale delle abbondanze delle Dinophyceae nella stazione PN nel 2021.

Tra le dinoflagellate potenzialmente coinvolte nella produzione della TTX, *Prorocentrum micans* e *Proto-peridinium* cf. *steinii* hanno mostrato valori di abbondanza ($868,0 \pm 410,8$ e $128,3 \pm 46,6$ cell. l⁻¹, rispettivamente) e biomassa ($1,934 \pm 0,915$ e $0,409 \pm 0,149$ $\mu\text{g C l}^{-1}$, rispettivamente) significativamente più elevati durante la contaminazione dei mitili da TTX rispetto al resto dell'anno ($124,0 \pm 174,0$ e $0,0 \pm 0,0$ cellule L⁻¹ test HSD di Tukey p-level <0,01 e 0,001, rispettivamente per le abbondanze e $0,276 \pm 0,388$ e $0,0 \pm 0,0$ $\mu\text{g C l}^{-1}$

¹, test HSD di Tukey p- livello < 0,01 e 0,001, rispettivamente per la biomassa). *Protoberidinium* cf. *steinii* (una dinoflagellata eterotrofa con un'abbondanza massima e una biomassa di 81 cell. l⁻¹ e 0,268 µg C l⁻¹ registrata il 17 giugno) è stata rilevata nella colonna d'acqua solo nel periodo di contaminazione da TTX nei mitili, mentre *Prorocentrum micans* ha avuto un bloom con abbondanze fino a 3821 cell. l⁻¹ (corrispondenti a 11.749 µg C l⁻¹) l'11 giugno. *Prorocentrum cordatum* è stato registrato con un'abbondanza massima di 6726 cell. l⁻¹ (corrispondenti a 1.217 µg C l⁻¹) a fine maggio (il giorno 26/05), appena prima del periodo in cui si è scoperto che i mitili erano contaminato da TTX. Studiando più in dettaglio la comunità fitoplanctonica nel periodo di contaminazione da TTX nel sito MP, le dinoflagellate hanno mostrato abbondanze da 11.104 cell. l⁻¹ a 67.269 cell. l⁻¹ con un picco registrato il giorno 17/06 con valori di 67.269 cell. l⁻¹, mentre le fitoflagellate e le diatomee (Bacillariophyceae) continuavano a essere i due gruppi più abbondanti con valori di abbondanza da 728.351 a 2.511.377 cell. l⁻¹, e 54.424 e 331.384 cell. l⁻¹, rispettivamente, seguiti da dinoflagellate, coccolitine e cianobatteri (Figura 10).

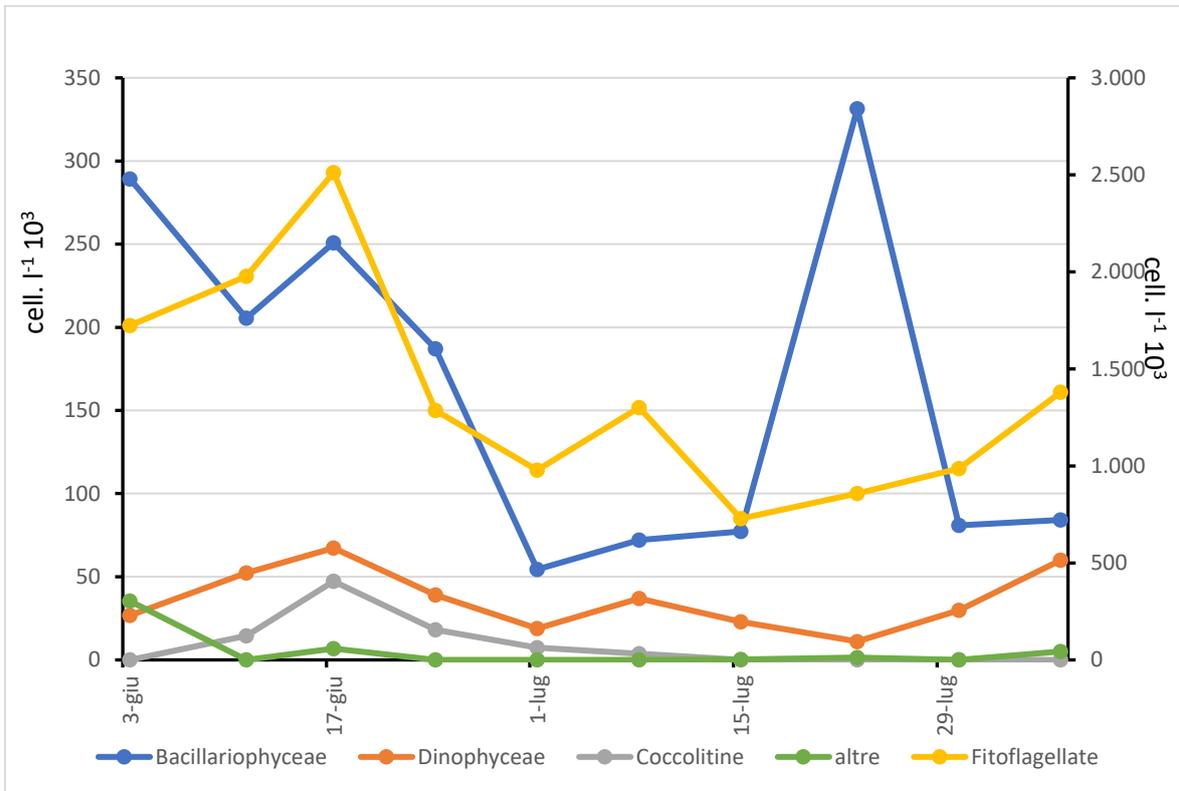


Figura 10 Andamento delle abbondanze fitoplanctoniche nell'area di studio MP, nel periodo di campionamento): Bacillariophyceae, Dinophyceae, Coccolitine, Cyanophyceae (asse Y sinistro) e fitoflagellate (asse Y destro).

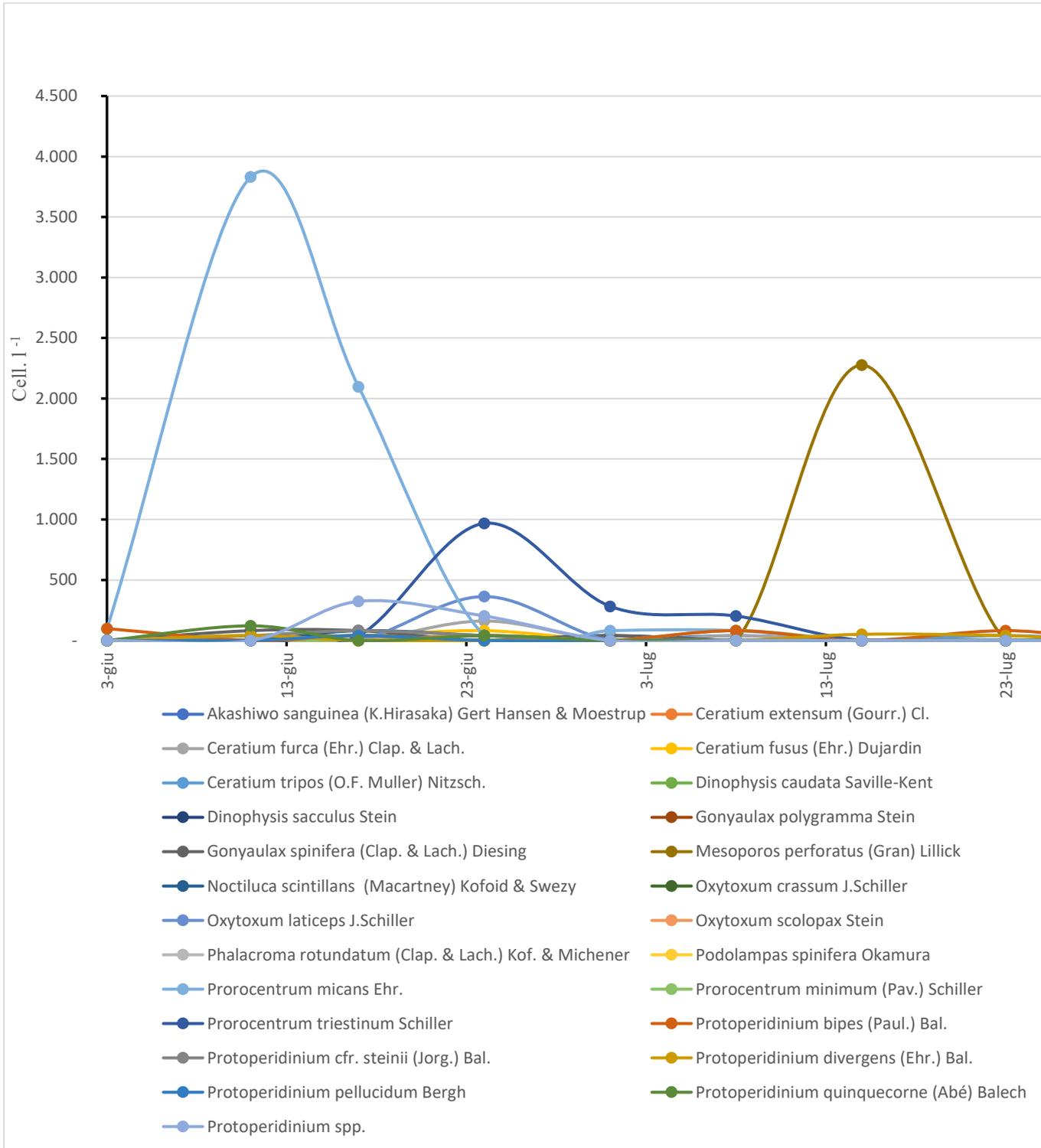


Figura 11 Andamento dell'abbondanza delle specie delle Dinophyceae nel sito MP durante il periodo di contaminazione dei mitili da TTX.

Durante la contaminazione dei mitili da TTX nel sito MP, le abbondanze totali delle specie eterotrofe obbligate hanno mostrato una significativa correlazione positiva con la quantità di TTX nelle cozze contaminate ($r = 0,860$, $n = 10$, livello $p < 0,01$). Considerando ogni taxon separatamente (Tabella 2), diversi taxa (non solo tra gli eterotrofi obbligati) hanno mostrato una significativa correlazione positiva con la quantità di TTX nei mitili contaminati: *Tripos extensum*, *Gonyaulax spinifera*, *Oxytoxum crassum*, *Protoperidinium* cf. *steinii*, *Protoperidinium pellucidum*, *Protoperidinium* sp. e *Noctiluca scintillans*. Inoltre, tutti questi dinoflagellati hanno mostrato una correlazione positiva significativa con i valori di PO_4 .

Tabella 2. Correlazione di Pearson tra le abbondanze dei taxa delle dinoflagellate e le concentrazione di TTX nei mitili, temperatura dell'acqua (T), salinità (S), valori DIN, Si(OH)₄ e PO₄. I valori indicati in rosso sono significativi per p < 0.05, quelli in corsivo sono significativi per p < 0.01, quelli in grassetto corsivo sono significativi per p < 0.001. * indica dinoflagellati eterotrofi obbligati.

Taxa	TTX	T	S	DIN	Si(OH) ₄	PO ₄ ³⁻
<i>Akashiwo sanguinea</i> (K.Hirasaka) Gert Hansen & Moestrup	-0.15	0.39	0.31	-0.19	0.04	-0.29
<i>Tripos extensum</i> (Gourret) F.Gómez	0.98	-0.38	-0.12	0.64	0.16	0.92
<i>Tripos furca</i> (Ehr.) F.Gómez	0.04	0.13	-0.16	-0.13	0.00	0.04
<i>Tripos fusus</i> (Ehr.) F.Gómez	0.42	-0.01	-0.50	0.11	-0.23	0.52
<i>Tripos muelleri</i> Bory.	-0.06	0.22	0.08	0.39	0.49	0.01
<i>Dinophysis caudata</i> Saville-Kent	-0.19	0.34	-0.07	-0.25	-0.29	0.17
<i>Dinophysis sacculus</i> Stein	-0.09	-0.32	0.13	-0.35	0.08	-0.20
<i>Gonyaulax polygramma</i> Stein	0.07	0.10	-0.02	0.03	0.12	0.13
<i>Gonyaulax spinifera</i> (Clap. & Lach.) Diesing	0.63	-0.44	-0.71	0.13	-0.39	0.51
<i>Mesoporos perforatus</i> (Gran) Lillick	-0.16	0.22	0.32	-0.18	0.06	-0.17
* <i>Noctiluca scintillans</i> (Macartney) Kofoid & Swezy	0.95	-0.31	-0.12	0.61	0.20	0.92
<i>Oxytoxum crassum</i> J.Schiller	0.98	-0.38	-0.12	0.64	0.16	0.92
<i>Oxytoxum laticeps</i> J.Schiller	0.07	0.10	-0.02	0.03	0.12	0.13
<i>Oxytoxum scolovax</i> Stein	0.07	0.10	-0.02	0.03	0.12	0.13
<i>Phalacroma rotundatum</i> (Clap. & Lach.) Kof. & Michener	-0.08	-0.05	-0.90	-0.29	-0.72	-0.13
<i>Podolampas spinifera</i> Okamura	-0.19	0.34	-0.07	-0.25	-0.29	0.17
<i>Prorocentrum micans</i> Ehr.	0.42	-0.26	-0.89	0.05	-0.58	0.33
<i>Prorocentrum cordatum</i> (Ostenfeld) I.D.Dodge	-0.10	0.30	0.33	-0.27	0.15	-0.26
<i>Prorocentrum triestinum</i> Schiller	0.07	0.02	0.08	-0.12	0.20	0.06
* <i>Protoveridinium bipes</i> (Paul.) Bal.	-0.04	-0.19	0.33	0.18	0.45	0.04
* <i>Protoveridinium</i> cf. <i>steinii</i> (Jorg.) Bal.	0.88	-0.33	-0.52	0.46	-0.13	0.83
* <i>Protoveridinium divergens</i> (Ehr.) Bal.	-0.36	0.45	-0.24	-0.18	-0.25	-0.14
* <i>Protoveridinium pellucidum</i> Bergh	0.98	-0.38	-0.12	0.64	0.16	0.92
* <i>Protoveridinium quinquecorne</i> (Abé) Balech	-0.10	0.05	-0.92	-0.33	-0.73	-0.06
* <i>Protoveridinium</i> sp.	0.89	-0.24	-0.13	0.56	0.17	0.93

Dai campioni di retinata sono stati isolati e coltivati i ceppi algali: *Prorocentrum cf. compressum*, *Prorocentrum cordatum* (syn *P. minimum*), *Coolia* spp., dinoflagellate *Azadinium* like e *Scrippsiella* spp. I risultati dei test di tossicità a cui sono stati sottoposti hanno rivelato che nessuna delle specie è produttrice di TTX.

L'analisi delle retinate algali, effettuate nella colonna d'acqua di un'area limitrofa al banco di cozze oggetto di studio ha evidenziato basse concentrazioni di TTX (4-5 µg/kg) nei soli campioni dell'8 e del 30 luglio.

DISCUSSIONE

I primi record di TTX in Italia risalgono al 2015-2017 a Siracusa (Sicilia) e al 2017-2018 nella Laguna di Marano (Udine) (Bordin et al., 2021; Dell'Aversano et al., 2019). Finora, i livelli di TTX registrati in Italia sono stati quasi sempre al di sotto dei 44 µg TTX/kg, ovvero la soglia al di sotto della quale non si verifica alcun effetto avverso (NOAEL) (Knutsen et al., 2017). In questo lavoro, i valori di TTX hanno superato di gran lunga il livello soglia indicato dall'EFSA raggiungendo la concentrazione di 296 µg TTX/kg nel giorno 17/06. Questo però non è il valore più alto rilevato nei molluschi bivalvi delle acque

europee: il massimo è stato registrato nella Laguna di Marano nel 2017 con 541 μg TTX/kg (Bordin et al., 2021), valore che supera quelli raggiunti precedentemente nei Paesi Bassi (253 μg TTX/kg di *Crassostrea gigas*)(Gerssen et al., 2018), nel Regno Unito (253 μg TTX/kg di *Crassostrea gigas*) (Turner et al., 2017) e nelle acque della Grecia (202.9 $\mu\text{g}/\text{kg}$ di *Mytilus galloprovincialis*)(Vlamiš et al., 2015). Nel mar Adriatico, gli organismi che potrebbero essere potenziali produttori di TTX, i.e. i pesce palla, appartengono alle specie *Lagocephalus sceleratus* e *Sphoeroides pachygaster* (Guardone et al., 2018). Le suddette specie potrebbero contribuire alla diffusione della TTX o degli organismi produttori di TTX appartenenti ai più bassi livelli della catena trofica, con il conseguente assorbimento delle tossine dai molluschi, come suggerito da (Noguchi and Arakawa, 2008).

Oltre che al pesce palla, la TTX è stata associata anche ad altri organismi. Vlamiš et al. (2015) in uno studio eseguito nelle acque della Baia di Vistonikos (Grecia), hanno associato la presenza di TTX nei mitili alle cellule di *Prorocentrum cordatum*. Questa dinoficea planctonica è stata già associata alla produzione di composti neurotossici capaci di indurre sintomi neurotossici e provocare la morte nei topi (Denardou-Queneherve et al., 1999; Grzebyk et al., 1997). Come per altre biotossine marine, questi composti possono anche essere

accumulati dai bivalvi senza che quest'ultimi risentano degli effetti negativi derivanti dalla contaminazione, trasformandosi così in vettori di tossine per i livelli superiori della catena trofica (Denardou-Queneherve et al., 1999). *Prorocentrum cordatum* ha un'ampia distribuzione globale (Heil et al., 2005) e la sua presenza è stata rilevata anche in Mar Adriatico in quelle aree interessate dalla contaminazione di TTX da parte dei mitili, come nella Laguna di Marano (Monti et al., 2010) e lungo la Riviera del Conero (questo studio). L'ingestione di questa specie fitoplanctonica da parte dei mitili potrebbe quindi spiegare la presenza di TTX. In questo studio, *Prorocentrum cordatum* è stato registrato con un'abbondanza massima di 6.726 cell. l⁻¹ (corrispondenti in termini di biomassa a 1.217 µg C l⁻¹) a fine maggio, appena prima del periodo in cui si è scoperta la contaminazione da TTX nei mitili. Questi valori di abbondanza sono comparabili a quelli riportati nella Laguna di Marano quando la TTX fu rilevata per la prima volta nel maggio del 2017 (valori di abbondanza intorno a 10³ cell. l⁻¹) (Bordin et al., 2021) e a quelli riportati da Vlamis et al. (2015) nel 2012 quando la TTX venne indentificata nei mitili delle acque della Grecia (abbondanza 1.89 × 10³ cell l⁻¹).

Tuttavia, la sola presenza/assenza di *P. cordatum* non spiega la presenza di TTX nei mitili perché in questo studio i mitili risultano essere contaminati anche in periodi nei quali questa dinoflagellata non era presente, come

osservato ad esempio anche nel maggio 2018 nella laguna di Marano (Bordin et al., 2021).

Questo suggerisce che esistono altri fonti di contaminazione e che queste sono influenzate anche dai parametri ambientali del sito. Come sostenuto da Rodriguez et al, 2017, la presenza di TTX in *P. cordatum* è data dalla relazione simbiotica di quest'ultima con batteri potenzialmente capaci di produrre la tossina quando le condizioni ambientali sono favorevoli (Rodríguez et al., 2017).

Fattori abiotici come la temperatura e la profondità dell'acqua e i cicli di marea e salinità dell'acqua potrebbero favorire la presenza di TTX negli organismi marini. Infatti, anche se Turner et al. (2017) non ha potuto correlare la presenza di TTX alla temperatura delle acque, ha potuto osservare che queste tossine sono maggiormente presenti nei molluschi allevati alla temperatura di 15 °C, e un grande numero di campioni di mitili positivi a TTX sono stati allevati in ambiente intertidale o acque superficiali (Turner et al., 2017).

Riguardo alla salinità, (Katikou, 2019) osservò che 45 dei 55 campioni di molluschi risultati positivi alla contaminazione da TTX erano da ambienti estuarini con bassi valori di salinità; anche Leão et al., (2018) hanno riportato molluschi contaminati da TTX prelevati da ambienti con condizioni ambientali simili (Leão et al., 2018).

Analizzando i parametri ambientali dell'area in cui si è effettuato questo studio, l'andamento della temperatura si è mostrato crescente per tutto il periodo di studio, mentre la salinità è risultata pressoché stabile con un unico forte decremento a metà giugno dove si è registrato il minimo valore di salinità 34,4 proprio 6 giorni prima del rilevamento del massimo picco di TTX dei mitili. Ciò ci suggerisce che le temperature relativamente elevate e la bassa salinità possano favorire la presenza di TTX nei mitili, magari favorendo i batteri TTX produttori.

La specie batterica *V. alginolyticus*, abbondante nel mare Adriatico (Barbieri et al., 1999), è stata isolata dai campioni di sedimento raccolti durante questo studio (Bacchiocchi et al., 2021). Questi batteri sono risultati essere portatori dei geni NRPS e PKS e quindi principali possibili responsabili della produzione di TTX nei campioni provenienti dai siti dell'area campionamento Ancona (Bacchiocchi et al., 2021). L'aumento della temperatura, contemporaneo all'aumento dell'abbondanza del genere *Vibrio* sembra suggerire che le condizioni ambientali siano importanti per lo sviluppo dei batteri, possibili produttori di TTX, come già constatato da (Tirado et al., 2010; Turner et al., 2015).

Per quanto riguarda la modalità di distribuzione della TTX nei tessuti dei mitili, le componenti maggiormente interessate sono le branchie, il mantello e le

ghiandole digestive, i.e. quelle con funzione di filtrazione e digestione. Ciò lascia ipotizzare che la tossina venga prodotta all'esterno e arrivi ai mitili attraverso la rete trofica. Il fatto che le analisi effettuate sulla comunità algale campionata con il retino abbiano rilevato, seppur a basse concentrazioni (4-5 µg/kg), la presenza di TTX, rafforzerebbe la suddetta ipotesi.

L'analisi del fitoplancton sembra suggerire un potenziale ruolo di alcune specie nella contaminazione da TTX dei mitili. Analizzando l'andamento annuale del fitoplancton, è possibile osservare che le dinoflagellate hanno mostrato le maggiori abbondanze proprio nel periodo in cui è stata registrata la contaminazione da TTX nei mitili. Considerando che molte dinoflagellate sono eterotrofe e per la maggior parte sono mixotrofe (caratteristiche che consentono loro di nutrirsi di batteri potenzialmente produttori di TTX), si potrebbe ipotizzare un loro possibile ruolo anche come semplici vettori nella contaminazione da TTX dei mitili, anche se non direttamente produttori di TTX come invece fortemente ipotizzato in *P. cordatum*.

In particolare, tra le dinoflagellate eterotrofe obbligate, *Protoperidinium cf. steinii* è stata rilevata solo in questo periodo, mentre, tra le non eterotrofe obbligate (i) *Tripos extensum*, *Gonyaulax spinifera* e *Oxytoxum crassum* risultano essere positivamente correlati con i valori di TTX nei mitili contaminati, (ii) *Prorocentrum cordatum*, talvolta associato all'accumulo di

TTX nei mitili (Bane et al., 2014; Pratheepa et al., 2016; Vlamis et al., 2015), in questo studio ha raggiunto la sua massima abbondanza appena prima del periodo in cui i mitili sono stati trovati contaminati da TTX e (iii) *Prorocentrum micans* fiorisce in concomitanza con il periodo di contaminazione da mitili. Nel complesso, queste osservazioni sottolineano la necessità di eseguire ulteriori indagini nei prossimi anni, perché non è ancora chiaro se alcune specie siano direttamente coinvolte in questo processo o se si tratti solo di una questione di biomassa, cioè se ogni dinoflagellata mixotrofa o eterotrofa possa agire da vettore grazie al raggiungimento di un certo valore di biomassa, quando nell'ambiente sono presenti batteri produttori di TTX. Quest'ultima ipotesi è rafforzata dal fatto che in questo studio le concentrazioni di TTX sono risultate essere correlate alle concentrazioni di PO_4^{3-} in acqua: essendo il mar Adriatico caratterizzato da una importante P limitazione (Cozzi and Giani, 2011; Giani et al., 2012), l'aumento di PO_4^{3-} può influenzare le abbondanze del fitoplancton e quindi indirettamente la contaminazione da TTX nei mitili.

In conclusione, dal 2017 la costa marchigiana la Riviera del Conero è caratterizzata dalla presenza di mitili contaminati da TTX, fenomeno che si verifica durante la stagione estiva, da giugno ad agosto (Bacchiocchi et al., 2021). La sua presenza si è rilevata essere più significativa nei mitili dell'area Ancona (Conero Riviera) piuttosto che in quella di Pesaro, suggerendo che la

Riviera del Conero possa essere considerata un hotspot di accumulo TTX nei mitili. Il 22-23% dei campioni di mitili analizzati ha mostrato concentrazioni moderate di TTX, mentre meno del 5% ha mostrato valori al di sopra della soglia stabilita dall' EFSA. Quindi data la concentrazione di TTX misurata nei mitili selvatici messi in commercio dalla Regione Marche non rappresentano un rischio per la salute dei consumatori anche se il livello di tossina sembra aumentare (Bacchiocchi et al., 2022).

BIBLIOGRAFIA

- Aasen, J.A.B., Espenes, A., Miles, C.O., Samdal, I.A., Hess, P., Aune, T., 2011. Combined oral toxicity of azaspiracid-1 and yessotoxin in female NMRI mice. *Toxicon* 57, 909–917. <https://doi.org/10.1016/J.TOXICON.2011.03.014>
- Abraham, A., Wang, Y., El Said, K.R., Plakas, S.M., 2012. Characterization of brevetoxin metabolism in *Karenia brevis* bloom-exposed clams (*Mercenaria* sp.) by LC-MS/MS. *Toxicon* 60, 1030–1040. <https://doi.org/10.1016/J.TOXICON.2012.06.016>
- Abraham, A., Flewelling, L.J., El Said, K.R., Odom, W., Geiger, S.P., Granholm, A.A., Jackson, J.T., Bodager, D., 2021. An occurrence of neurotoxic shellfish poisoning by consumption of gastropods contaminated with brevetoxins. *Toxicon* 191, 9–17. <https://doi.org/10.1016/J.TOXICON.2020.12.010>
- Amzil, Z., Derrien, A., Terre Terrillon, A., Duval, A., Connes, C., Marco-Miralles, F., Nézan, E., Mertens, K., 2021. Monitoring the Emergence of Algal Toxins in Shellfish: First Report on Detection of Brevetoxins in French Mediterranean Mussels. *Mar. Drugs* 19, 393. <https://doi.org/10.3390/md19070393>
- Anderson, D.M., Glibert, P.M., Burkholder, J.M., 2002. Harmful algal blooms and eutrophication: Nutrient sources, composition, and consequences. *Estuaries* 25, 704–726. <https://doi.org/10.1007/BF02804901>
- Aráoz, R., Barnes, P., Séchet, V., Delepierre, M., Zinn-Justin, S., Molgó, J., Zakarian, A., Hess, P., Servent, D., 2020. Cyclic imine toxins survey in coastal European shellfish samples: Bioaccumulation and mode of action of 28-O-palmitoyl ester of pinnatoxin-G. first report of portimine-A bioaccumulation. *Harmful Algae* 98. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2020.101887>
- Arnich, N., Abadie, E., Delcourt, N., Fessard, V., Fremy, J.M., Hort, V., Lagrange, E., Maignien, T., Molgó, J., Peyrat, M.B., Vernoux, J.P., Mattei, C., 2020. Health risk assessment related to pinnatoxins in French shellfish. *Toxicon* 180, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2020.03.007>
- Arnich, N., Abadie, E., Amzil, Z., Dechraoui Bottein, M.-Y., Comte, K., Chaix, E., Delcourt, N., Hort, V., Mattei, C., Molgó, J., Le Garrec, R., 2021. Guidance Level for Brevetoxins in French Shellfish. *Mar. Drugs* 19, 520. <https://doi.org/10.3390/md19090520>
- Artegiani, A., Paschini, E., Russo, A., Bregant, D., Raicich, F., Pinardi, N., 1997. The Adriatic Sea General Circulation. Part II: Baroclinic Circulation Structure. *J. Phys. Oceanogr.* 27, 1515–1532. [https://doi.org/10.1175/1520-0485\(1997\)027<1515:TASGCP>2.0.CO;2](https://doi.org/10.1175/1520-0485(1997)027<1515:TASGCP>2.0.CO;2)
- Bacchiocchi, S., Siracusa, M., Ruzzi, A., Gorbi, S., Ercolessi, M., Cosentino, M.A., Ammazalorso, P., Orletti, R., 2015. Two-year study of lipophilic marine toxin profile in mussels of the north-central Adriatic Sea: First report of azaspiracids in Mediterranean seafood. *Toxicon* 108, 115–125. <https://doi.org/10.1016/J.TOXICON.2015.10.002>

- Bacchiocchi, S., Siracusa, M., Campacci, D., Ciriaci, M., Dubbini, A., Tavoloni, T., Stramenga, A., Gorbi, S., Piersanti, A., 2020. Cyclic Imines (CIs) in Mussels from North-Central Adriatic Sea: First Evidence of Gymnodimine A in Italy. *Toxins (Basel)*. 12, 370. <https://doi.org/10.3390/toxins12060370>
- Bacchiocchi, S., Campacci, D., Siracusa, M., Dubbini, A., Leoni, F., Tavoloni, T., Accoroni, S., Gorbi, S., Giuliani, M.E., Stramenga, A., Piersanti, A., 2021. Tetrodotoxins (Ttxs) and *Vibrio alginolyticus* in mussels from central adriatic sea (italy): Are they closely related? *Mar. Drugs* 19. <https://doi.org/10.3390/md19060304>
- Bacchiocchi, S., Campacci, D., Siracusa, M., Dubbini, A., Accoroni, S., Romagnoli, T., Campanelli, A., Griffoni, F., Tavoloni, T., Gorbi, S., Totti, C., Piersanti, A., 2022. A Hotspot of TTX Contamination in the Adriatic Sea: Study on the Origin and Causative Factors. *Mar. Drugs* 21, 8. <https://doi.org/10.3390/md21010008>
- Band-Schmidt, C.J., Martínez-López, A., Bustillos-Guzmán, J.J., Carreón-Palau, L., Morquecho, L., Olguín-Monroy, N.O., Zenteno-Savín, T., Mendoza-Flores, A., González-Acosta, B., Hernández-Sandoval, F.H., Tomas, C., 2012. Morphology, biochemistry, and growth of raphidophyte strains from the Gulf of California. *Hydrobiologia* 693, 81–97. <https://doi.org/10.1007/s10750-012-1088-y>
- Bane, V., Lehane, M., Dikshit, M., O’Riordan, A., Furey, A., 2014. Tetrodotoxin: Chemistry, toxicity, source, distribution and detection. *Toxins (Basel)*. 6, 693–755. <https://doi.org/10.3390/toxins6020693>
- Bellocci, M., Sala, G.L., Callegari, F., Rossini, G.P., 2010. Azaspiracid-1 inhibits endocytosis of plasma membrane proteins in epithelial cells. *Toxicol. Sci.* 117, 109–121. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfq172>
- Bentur, Y., Ashkar, J., Lurie, Y., Levy, Y., Azzam, Z.S., Litmanovich, M., Golik, M., Gurevych, B., Golani, D., Eisenman, A., 2008. Lessepsian migration and tetrodotoxin poisoning due to *Lagocephalus sceleratus* in the eastern Mediterranean. *Toxicon* 52, 964–968. <https://doi.org/10.1016/J.TOXICON.2008.10.001>
- Berdalet, E., Fleming, L.E., Gowen, R., Davidson, K., Hess, P., Backer, L.C., Moore, S.K., Hoagland, P., Enevoldsen, H., 2016. Marine harmful algal blooms, human health and wellbeing: Challenges and opportunities in the 21st century. *J. Mar. Biol. Assoc. United Kingdom* 96, 61–91. <https://doi.org/10.1017/S0025315415001733>
- Bidard, J.N., Vijverberg, H.P.M., Frelin, C., 1984. Ciguatoin is a novel type of Na⁺ channel toxin. *J. Biol. Chem.* 259, 8353–8357. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(17\)39735-1](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(17)39735-1)
- Boente-Juncal, A., Vale, C., Cifuentes, M., Otero, P., Camiña, M., Rodriguez-Vieytes, M., Botana, L.M., 2019. Chronic in vivo effects of repeated exposure to low oral doses of tetrodotoxin: preliminary evidence of nephrotoxicity and cardiotoxicity. *Toxins (Basel)*. 11, 96. <https://doi.org/10.3390/toxins11020096>
- Boente-Juncal, A., Raposo-García, S., Vale, C., Louzao, M.C., Otero, P., Botana, L.M., 2020. In vivo evaluation of the chronic oral toxicity of the marine toxin palytoxin. *Toxins (Basel)*. 12, 489. <https://doi.org/10.3390/toxins12080489>

- Bordin, P., Dall'Ara, S., Tartaglione, L., Antonelli, P., Calfapietra, A., Varriale, F., Guiatti, D., Milandri, A., Dell'Aversano, C., Arcangeli, G., Barco, L., 2021. First occurrence of tetrodotoxins in bivalve mollusks from Northern Adriatic Sea (Italy). *Food Control* 120, 107510. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2020.107510>
- Botana, A.M., Otero, P., Rodriguez, P., Alfonso, A., Botana, L.M., 2013. Current situation on analysis of marine toxins. *Rev. Anal. Chem.* 32, 15–34. <https://doi.org/10.1515/revac-2012-0020>
- Campbell, K., Barnes, P., Haughey, S.A., Higgins, C., Kawatsu, K., Vasconcelos, V., Elliott, C.T., 2013. Development and single laboratory validation of an optical biosensor assay for tetrodotoxin detection as a tool to combat emerging risks in European seafood Rapid Detection in Food and Feed. *Anal. Bioanal. Chem.* 405, 7753–7763. <https://doi.org/10.1007/s00216-013-7106-8>
- Casteleyn, C., Van Den Broeck, W., Simoens, P., 2007. Regulation (EC) No 854/2004 laying down specific rules for the organisation of official controls on products of animal origin intended for human consumption is not in compliance with official anatomical nomenclature.
- Chau, R., Kalaitzis, J.A., Neilan, B.A., 2011. On the origins and biosynthesis of tetrodotoxin. *Aquat. Toxicol.* 104, 61–72. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2011.04.001>
- Ciminiello, P., Dell'Aversano, C., Fattorusso, E., Forino, M., Tartaglione, L., Grillo, C., Melchiorre, N., 2008. Putative Palytoxin and its new analogue, ovatoxin-a, in *Ostreopsis ovata* Collected along the ligurian coasts during the 2006 toxic outbreak. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 19, 111–120. <https://doi.org/10.1016/J.JASMS.2007.11.001>
- Corriero, G., Pierri, C., Accoroni, S., Alabiso, G., Bavestrello, G., Barbone, E., Bastianini, M., Bazzoni, A.M., Bernardi Aubry, F., Boero, F., Buia, M.C., Cabrini, M., Camatti, E., Cardone, F., Cataletto, B., Cattaneo Vietti, R., Cecere, E., Cibic, T., Colangelo, P., De Olazabal, A., D'onghia, G., Finotto, S., Fiore, N., Fornasaro, D., Frascchetti, S., Gambi, M.C., Giangrande, A., Gravili, C., Guglielmo, R., Longo, C., Lorenti, M., Lugliè, A., Maiorano, P., Mazzocchi, M.G., Mercurio, M., Mastrototaro, F., Mistri, M., Monti, M., Munari, C., Musco, L., Nonnis-Marzano, C., Padedda, B.M., Patti, F.P., Petrocelli, A., Piraino, S., Portacci, G., Pugnetti, A., Pulina, S., Romagnoli, T., Rosati, I., Sarno, D., Satta, C.T., Sechi, N., Schiaparelli, S., Scipione, B., Sion, L., Terlizzi, A., Tirelli, V., Totti, C., Tursi, A., Ungaro, N., Zingone, A., Zupo, V., Basset, A., 2016. Ecosystem vulnerability to alien and invasive species: a case study on marine habitats along the Italian coast. *Aquat. Conserv. Mar. Freshw. Ecosyst.* 26, 392–409. <https://doi.org/10.1002/aqc.2550>
- Costa, P.R., Estévez, P., Soliño, L., Castro, D., Rodrigues, S.M., Timoteo, V., Leao-Martins, J.M., Santos, C., Gouveia, N., Diogène, J., Gago-Martínez, A., 2021. An update on ciguatoxins and ctx-like toxicity in fish from different trophic levels of the selvagens islands (NE Atlantic, Madeira, Portugal). *Toxins (Basel)*. 13, 1–12. <https://doi.org/10.3390/toxins13080580>
- Cozzi, S., Giani, M., 2011. River water and nutrient discharges in the Northern Adriatic Sea: Current importance and long term changes. *Cont. Shelf Res.* 31, 1881–1893. <https://doi.org/10.1016/J.CSR.2011.08.010>

- Cucchiari, E., Guerrini, F., Penna, A., Totti, C., Pistocchi, R., 2008. Effect of salinity, temperature, organic and inorganic nutrients on growth of cultured *Fibrocapsa japonica* (Raphidophyceae) from the northern Adriatic Sea. *Harmful Algae* 7, 405–414. <https://doi.org/10.1016/J.HAL.2007.09.002>
- D’Ortenzio, F., D’Alcalà, M.R., 2009. On the trophic regimes of the Mediterranean Sea: A satellite analysis. *Biogeosciences* 6, 139–148. <https://doi.org/10.5194/bg-6-139-2009>
- Degobbis, D., Precali, R., Ivancic, I., Smodlaka, N., Fuks, D., Kveder, S., 2000. Long-term changes in the northern Adriatic ecosystem related to anthropogenic eutrophication. *Int. J. Environ. Pollut.* 13, 495. <https://doi.org/10.1504/IJEP.2000.002332>
- Dell’Aversano, C., Tartaglione, L., Polito, G., Dean, K., Giacobbe, M., Casabianca, S., Capellacci, S., Penna, A., Turner, A.D., 2019. First detection of tetrodotoxin and high levels of paralytic shellfish poisoning toxins in shellfish from Sicily (Italy) by three different analytical methods. *Chemosphere* 215, 881–892. <https://doi.org/10.1016/J.CHEMOSPHERE.2018.10.081>
- Denardou-Queneherve, A., Grzebyk, D., Pouchus, Y.F., Sauviat, M.P., Alliot, E., Biard, J.F., Berland, B., Verbist, J.F., 1999. Toxicity of French strains of the dinoflagellate *Prorocentrum minimum* experimental and natural contaminations of mussels. *Toxicon* 37, 1711–1719. [https://doi.org/10.1016/S0041-0101\(99\)00113-0](https://doi.org/10.1016/S0041-0101(99)00113-0)
- Díaz-Asencio, L., Clausing, R.J., Rañada, M.L., Alonso-Hernández, C.M., Dechraoui Bottein, M.Y., 2018. A radioligand receptor binding assay for ciguatoxin monitoring in environmental samples: Method development and determination of quality control criteria. *J. Environ. Radioact.* 192, 289–294. <https://doi.org/10.1016/J.JENVRAD.2018.06.019>
- Efsa, 2010. Scientific Opinion on marine biotoxins in shellfish – Cyclic imines (spirolides, gymnodimines, pinnatoxins and pteriatoxins). *EFSA J.* 8, 1–39. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2010.1628>
- EFSA, 2010. Marine biotoxins in shellfish - Brevetoxin group. *EFSA J.* 8, 1677–1706. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2010.1677>
- Estevez, P., Castro, D., Pequeño-Valtierra, A., Giraldez, J., Gago-Martinez, A., 2019. Emerging marine biotoxins in seafood from European coasts: Incidence and analytical challenges. *Foods* 8, 1–13. <https://doi.org/10.3390/foods8050149>
- European Commission, 2013. Regulation (EU) No 786/2013 of 16 August 2013 Amending Annex III to Regulation (EC) No 853/2004 of the European Parliament and of the Council as regards the permitted limits of yessotoxins in live bivalve molluscs.
- European Union, 2004. Corrigendum to Regulation (EC) No 853/2004 of the European Parliament and of the Council of 29 April 2004 laying down specific rules for the organisation of official controls on products of animal origin intended for human consumption.
- Farabegoli, F., Blanco, L., Rodríguez, L., Vieites, J., Cabado, A., 2018. Phycotoxins in marine shellfish: origin, occurrence and effects on humans. *Mar. Drugs* 16, 188. <https://doi.org/10.3390/md16060188>

- Fonda Umani, S., 1996. Pelagic production and biomass in the Adriatic Sea. *Sci. Mar.* 60, 65–77.
- Fonfría, E.S., Vilariño, N., Molgó, J., Aráoz, R., Otero, P., Espiña, B., Louzao, M.C., Alvarez, M., Botana, L.M., 2010. Detection of 13,19-didesmethyl C spirolide by fluorescence polarization using *Torpedo* electrocyte membranes. *Anal. Biochem.* 403, 102–107. <https://doi.org/10.1016/J.AB.2010.04.006>
- Forsyth, C.J., Xu, J., Nguyen, S.T., Samdal, I.A., Briggs, L.R., Rundberget, T., Sandvik, M., Miles, C.O., 2006. Antibodies with broad specificity to azaspiracids by use of synthetic haptens. *J. Am. Chem. Soc.* 128, 15114–15116. <https://doi.org/10.1021/ja066971h>
- Fraga, S., Rodríguez, F., Caillaud, A., Diogène, J., Raho, N., Zapata, M., 2011. *Gambierdiscus excentricus* sp. nov. (Dinophyceae), a benthic toxic dinoflagellate from the Canary Islands (NE Atlantic Ocean). *Harmful Algae* 11, 10–22. <https://doi.org/10.1016/J.HAL.2011.06.013>
- Friedman, M.A., Fernandez, M., Backer, L.C., Dickey, R.W., Bernstein, J., Schrank, K., Kibler, S., Stephan, W., Gribble, M.O., Bienfang, P., Bowen, R.E., Degrasse, S., Quintana, H.A.F., Loeffler, C.R., Weisman, R., Blythe, D., Berdalet, E., Ayyar, R., Clarkson-Townsend, D., Swajian, K., Benner, R., Brewer, T., Fleming, L.E., 2017. An updated review of ciguatera fish poisoning: Clinical, epidemiological, environmental, and public health management. *Mar. Drugs* 15, 72. <https://doi.org/10.3390/md15030072>
- Gerssen, A., Bovee, T.H.F., Klijstra, M.D., Poelman, M., Portier, L., Hoogenboom, R., 2018. First report on the occurrence of tetrodotoxins in bivalve mollusks in The Netherlands. *Toxins (Basel)*. 10. <https://doi.org/10.3390/toxins10110450>
- Giani, M., Djakovac, T., Degobbi, D., Cozzi, S., Solidoro, C., Umani, S.F., 2012. Recent changes in the marine ecosystems of the northern Adriatic Sea. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 115, 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.ecss.2012.08.023>
- Giuliani, M.E., Accoroni, S., Mezzelani, M., Lugarini, F., Bacchiocchi, S., Siracusa, M., Tavoloni, T., Piersanti, A., Totti, C., Regoli, F., Rossi, R., Zingone, A., Gorbi, S., 2019. Biological effects of the azaspiracid-producing dinoflagellate *Azadinium dexteroporum* in *Mytilus galloprovincialis* from the Mediterranean Sea. *Mar. Drugs* 17, 595. <https://doi.org/10.3390/md17100595>
- Grzebyk, D., Denardou, A., Berland, B., Pouchus, Y.F., 1997. Evidence of a new toxin in the red-tide dinoflagellate *Prorocentrum minimum*. *J. Plankton Res.* 19, 1111–1124. <https://doi.org/10.1093/plankt/19.8.1111>
- Guardone, L., Gasperetti, L., Maneschi, A., Ricci, E., Susini, F., Guidi, A., Armani, A., 2018. Toxic invasive pufferfish (Tetraodontidae family) along Italian coasts: Assessment of an emerging public health risk. *Food Control* 91, 330–338. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCONT.2018.04.005>
- Guillard, R.R.L., 1975. Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates, in: culture of marine invertebrate animals. Springer US, Boston, MA, pp. 29–60. https://doi.org/10.1007/978-1-4615-8714-9_3

- Guillot, S., Delcourt, N., 2022. Marine neurotoxins' effects on environmental and human health: An omics overview. *Mar. Drugs* 20, 1–23. <https://doi.org/10.3390/md20010018>
- Guinder, V.A., Tillmann, U., Krock, B., Delgado, A.L., Krohn, T., Cardona, J.E.G., Metfies, K., Abbate, C.L., Silva, R., Lara, R., 2018. Plankton multiproxy analyses in the Northern Patagonian Shelf, Argentina: Community structure, phycotoxins, and characterization of toxic *Alexandrium* strains. *Front. Mar. Sci.* 5, 1–21. <https://doi.org/10.3389/fmars.2018.00394>
- Hallegraeff, G.M., Anderson, D.M., Belin, C., Bottein, M.Y.D., Bresnan, E., Chinain, M., Enevoldsen, H., Iwataki, M., Karlson, B., McKenzie, C.H., Sunesen, I., Pitcher, G.C., Provoost, P., Richardson, A., Schweibold, L., Tester, P.A., Trainer, V.L., Yñiguez, A.T., Zingone, A., 2021. Perceived global increase in algal blooms is attributable to intensified monitoring and emerging bloom impacts. *Commun. Earth Environ.* 2, 117. <https://doi.org/10.1038/s43247-021-00178-8>
- Heil, C.A., Glibert, P.M., Fan, C., 2005. *Prorocentrum minimum* (Pavillard) Schiller: A review of a harmful algal bloom species of growing worldwide importance. *Harmful Algae* 4, 449–470. <https://doi.org/10.1016/J.HAL.2004.08.003>
- Hoagland, P., Anderson, D.M., Kaoru, Y., White, A.W., 2002. The economic effects of harmful algal blooms in the United States: Estimates, assessment issues, and information needs. *Estuaries* 25, 819–837. <https://doi.org/10.1007/BF02804908>
- How, C.K., Chern, C.H., Huang, Y.C., Wang, L.M., Lee, C.H., 2003. Tetrodotoxin poisoning. *Am. J. Emerg. Med.* 21, 51–54. <https://doi.org/10.1053/AJEM.2003.50008>
- Isbister, G.K., Kiernan, M.C., 2005. Neurotoxic marine poisoning. *Lancet Neurol.* 4, 219–228. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(05\)70041-7](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(05)70041-7)
- Karlson, B., Andersen, P., Arneborg, L., Cembella, A., Eikrem, W., John, U., West, J.J., Klemm, K., Kobos, J., Lehtinen, S., Lundholm, N., Mazur-Marzec, H., Naustvoll, L., Poelman, M., Provoost, P., De Rijke, M., Suikkanen, S., 2021. Harmful algal blooms and their effects in coastal seas of Northern Europe. *Harmful Algae* 102, 101989. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2021.101989>
- Katikou, P., Georgantelis, D., Sinouris, N., Petsi, A., Fotaras, T., 2009. First report on toxicity assessment of the Lessepsian migrant pufferfish *Lagocephalus sceleratus* (Gmelin, 1789) from European waters (Aegean Sea, Greece). *Toxicon* 54, 50–55. <https://doi.org/10.1016/J.TOXICON.2009.03.012>
- Katikou, P., 2019. Public health risks associated with tetrodotoxin and its analogues in European waters: Recent advances after the EFSA scientific opinion. *Toxins (Basel)*. 11,240. <https://doi.org/10.3390/toxins11050240>
- Knutsen, H.K., Alexander, J., Barregård, L., Bignami, M., Brüschweiler, B., Ceccatelli, S., Cottrill, B., Dinovi, M., Edler, L., Grasl-Kraupp, B., Hogstrand, C., Hoogenboom, L. (Ron), Nebbia, C.S., Oswald, I.P., Rose, M., Roudot, A., Schwerdtle, T., Vleminckx, C., Vollmer, G., Wallace, H., Arnich, N., Benford, D., Botana, L., Viviani, B., Arcella, D., Binaglia, M., Horvath, Z., Steinkellner, H., van Manen, M., Petersen, A., 2017. Risks for public health related to the presence of tetrodotoxin (TTX) and TTX

- analogues in marine bivalves and gastropods. *EFSA J.* 15. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2017.4752>
- Konoki, K., Baden, D.G., Scheuer, T., Catterall, W.A., 2019. Molecular determinants of brevetoxin binding to voltage-gated sodium channels. *Toxins (Basel)*. 11, 513. <https://doi.org/10.3390/toxins11090513>
- Kotaki, Y., Shimizu, Y., 1993. 1-Hydroxy-5,11-dideoxytetrodotoxin, the first N-hydroxy and ring-deoxy derivative of tetrodotoxin found in the newt *Taricha granulosa*. *J. Am. Chem. Soc.* 115, 827–830. <https://doi.org/10.1021/ja00056a001>
- Lamas, J., Arévalo, F., Morono, Á., Correa, J., Muñiz, S., Blanco, J., 2019. Detection and spatio-temporal distribution of pinnatoxins in shellfish from the Atlantic and Cantabrian coasts of Spain. *Toxins (Basel)*. 11, 340. <https://doi.org/10.3390/toxins11060340>
- Lamas, J.P., Arévalo, F., Morono, Á., Correa, J., Rossignoli, A.E., Blanco, J., 2021. Gymnodimine A in mollusks from the north Atlantic Coast of Spain: Prevalence, concentration, and relationship with spirolides. *Environ. Pollut.* 279, 116919. <https://doi.org/10.1016/J.ENVPOL.2021.116919>
- Leão, J., Lozano-Leon, A., Giráldez, J., Vilariño, Ó., Gago-Martínez, A., 2018. Preliminary results on the evaluation of the occurrence of tetrodotoxin associated to marine *Vibrio* spp. in bivalves from the Galician Rias (Northwest of Spain). *Mar. Drugs* 16, 81. <https://doi.org/10.3390/md16030081>
- Leyva-Valencia, I., Hernández-Castro, J., Band-Schmidt, C., Turner, A., O'Neill, A., Núñez-Vázquez, E., López-Cortés, D., Bustillos-Guzmán, J., Hernández-Sandoval, F., 2021. Lipophilic Toxins in wild bivalves from the Southern Gulf of California, Mexico. *Mar. Drugs* 19, 99. <https://doi.org/10.3390/md19020099>
- Leyva, V., Maruenda, H., 2021. Assessment of the Presence of Lipophilic Phycotoxins in scallops (*Argopecten purpuratus*) Farmed along Peruvian coastal waters. *J. Food Prot.* 84, 204–212. <https://doi.org/10.4315/JFP-20-212>
- Lombet, A., Bidard, J.N., Lazdunski, M., 1987. Ciguatoxin and brevetoxins share a common receptor site on the neuronal voltage-dependent Na⁺ channel. *FEBS Lett.* 219, 355–359. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(87\)80252-1](https://doi.org/10.1016/0014-5793(87)80252-1)
- Mak, Y.L., Wai, T.C., Murphy, M.B., Chan, W.H., Wu, J.J., Lam, J.C.W., Chan, L.L., Lam, P.K.S., 2013. Pacific ciguatoxins in food web components of coral reef systems in the Republic of Kiribati. *Environ. Sci. Technol.* 47, 14070–14079. <https://doi.org/10.1021/es403175d>
- McNabb, P.S., McCoubrey, D.J., Rhodes, L., Smith, K., Selwood, A.I., van Ginkel, R., MacKenzie, A.L., Munday, R., Holland, P.T., 2012. New perspectives on biotoxin detection in Rangaunu Harbour, New Zealand arising from the discovery of pinnatoxins. *Harmful Algae* 13, 34–39. <https://doi.org/10.1016/J.HAL.2011.09.013>
- Menden-Deuer, S., Lessard, E.J., 2000. Carbon to volume relationships for dinoflagellates, diatoms, and other protist plankton. *Limnol. Oceanogr.* 45, 569–579. <https://doi.org/10.4319/lo.2000.45.3.0569>

- Molgó, J., Girard, E., Benoit, E., 2007. Cyclic Imines: An Insight into this emerging group of bioactive marine toxins. *Phycotoxins Chem. Biochem.* 319–335. <https://doi.org/10.1002/9780470277874.ch18>
- Monti, M., Stoecker, D.K., Cataletto, B., Talarico, L., 2010. Morphology of the flagellar pore complex in *Prorocentrum minimum* (Dinophyceae) from the Adriatic and Baltic Seas. *Bot. Mar.* 53, 357–365. <https://doi.org/10.1515/BOT.2010.038>
- Moreira-González, A.R., Comas-González, A., Valle-Pombrol, A., Seisdedo-Losa, M., Hernández-Leyva, O., Fernandes, L.F., Chomérat, N., Bilien, G., Hervé, F., Rovillon, G.A., Hess, P., Alonso-Hernández, C.M., Mafra, L.L., 2021. Summer bloom of *Vulcanodinium rugosum* in Cienfuegos Bay (Cuba) associated to dermatitis in swimmers. *Sci. Total Environ.* 757, 143782. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2020.143782>
- Moreiras, G., Leão, J.M., Gago-Martínez, A., 2019. Analysis of Cyclic Imines in Mussels (*Mytilus galloprovincialis*) from Galicia (NW Spain) by LC-MS/MS. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 17, 281. <https://doi.org/10.3390/ijerph17010281>
- Morris, P.D., Campbell, D.S., Taylor, T.J., Freeman, J.I., 1991. Clinical and epidemiological features of neurotoxic shellfish poisoning in North Carolina. *Am. J. Public Health* 81, 471–474. <https://doi.org/10.2105/AJPH.81.4.471>
- Morton, S.L., Vershinin, A., Smith, L.L., Leighfield, T.A., Pankov, S., Quilliam, M.A., 2009. Seasonality of *Dinophysis* spp. and *Prorocentrum lima* in Black Sea phytoplankton and associated shellfish toxicity. *Harmful Algae* 8, 629–636. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2008.10.011>
- Mudge, E.M., Miles, C.O., Hardstaff, W.R., McCarron, P., 2020. Fatty acid esters of azaspiracids identified in mussels (*Mytilus edulis*) using liquid chromatography-high resolution mass spectrometry. *Toxicon X* 8, 100059. <https://doi.org/10.1016/J.TOXCX.2020.100059>
- Noguchi, T., Arakawa, O., 2008. Tetrodotoxin - Distribution and accumulation in aquatic organisms, and cases of human intoxication. *Mar. Drugs* 6, 220–242. <https://doi.org/10.3390/md20080011>
- Noguchi, T., Onuki, K., Arakawa, O., 2011. Tetrodotoxin Poisoning Due to Pufferfish and Gastropods, and Their Intoxication Mechanism. *ISRN Toxicol.* 2011, 1–10. <https://doi.org/10.5402/2011/276939>
- O'Neill, A., Morrell, N., Turner, A.D., Maskrey, B.H., 2021. Method performance verification for the combined detection and quantitation of the marine neurotoxins cyclic imines and brevetoxin shellfish metabolites in mussels (*Mytilus edulis*) and oysters (*Crassostrea gigas*) by UHPLC-MS/MS. *J. Chromatogr. B* 1179, 122864. <https://doi.org/10.1016/J.JCHROMB.2021.122864>
- Otero, P., Silva, M., 2022. Emerging Marine Biotoxins in European Waters: Potential Risks and Analytical Challenges. *Mar. Drugs* 20, 1–25. <https://doi.org/10.3390/md20030199>
- Otero, P., Alfonso, A., Vieytes, M.R., Cabado, A.G., Vieites, J.M., Botana, L.M., 2010a. Effects of environmental regimens on the toxin profile of *Alexandrium ostenfeldii*.

- Environ. Toxicol. Chem. 29, 301–310. <https://doi.org/10.1002/etc.41>
- Otero, P., Pérez, S., Alfonso, A., Vale, C., Rodríguez, P., Gouveia, N.N., Gouveia, N., Delgado, J., Vale, P., Hirama, M., Ishihara, Y., Molgó, J., Botana, L.M., 2010b. First toxin profile of ciguateric fish in Madeira Arquipelago (Europe). *Anal. Chem.* 82, 6032–6039. <https://doi.org/10.1021/ac100516q>
- Otero, P., Alfonso, A., Rodríguez, P., Rubiolo, J.A., Cifuentes, J.M., Bermúdez, R., Vieytes, M.R., Botana, L.M., 2012a. Pharmacokinetic and toxicological data of spiroptides after oral and intraperitoneal administration. *Food Chem. Toxicol.* 50, 232–237. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2011.10.062>
- Otero, P., Alfonso, A., Rodríguez, P., Rubiolo, J.A., Cifuentes, J.M., Bermúdez, R., Vieytes, M.R., Botana, L.M., 2012b. Pharmacokinetic and toxicological data of spiroptides after oral and intraperitoneal administration. *Food Chem. Toxicol.* 50, 232–237. <https://doi.org/10.1016/J.FCT.2011.10.062>
- Otero, P., Miguéns, N., Rodríguez, I., Botana, L.M., 2019. LC–MS/MS Analysis of the emerging toxin pinnatoxin-g and high levels of esterified oa group toxins in galician commercial mussels. *Toxins (Basel)*. 11. <https://doi.org/10.3390/toxins11070394>
- Otero, P., Vale, C., Boente-Juncal, A., Costas, C., Louzao, M.C., Botana, L.M., 2020. Detection of cyclic imine toxins in dietary supplements of green lipped mussels (*Perna canaliculus*) and in shellfish *Mytilus chilensis*. *Toxins (Basel)*. 12, 613. <https://doi.org/10.3390/toxins12100613>
- Patocka, J., Gupta, R.C., Wu, Q., Kuca, K., 2015. Toxic potential of palytoxin. *J. Huazhong Univ. Sci. Technol. [Medical Sci.* 35, 773–780. <https://doi.org/10.1007/s11596-015-1506-3>
- Patocka, J., Wu, O., Kuca, K., 2018. Handbook of Foodborne Diseases, in: Liu, D. (Ed.), Handbook of Foodborne Diseases. CRC Press, Boca Raton : Taylor & Francis,| Series: Food microbiology series| “A CRC title, part of the Taylor & Francis imprint, a member of the Taylor & Francis Group, the academic division of T&F Informa plc.,” p. 8. <https://doi.org/10.1201/b22030>
- Pavela-Vrančić, M., Marasović, I., 2004. Paralytic Shellfish Poisoning (PSP) in the Central Adriatic Sea. *Croat. Chem. Acta* 77, 627–631.
- Pérez-Arellano, J.L., Luzardo, O.P., Brito, A.P., Cabrera, M.H., Zumbado, M., Carranza, C., Angel-Moreno, A., Dickey, R.W., Boada, L.D., 2005. Ciguatera fish poisoning, Canary Islands [8]. *Emerg. Infect. Dis.* 11, 1981–1982. <https://doi.org/10.3201/eid1112.050393>
- Pierce, R.H., Henry, M.S., Blum, P.C., Hamel, S.L., Kirkpatrick, B., Cheng, Y.S., Zhou, Y., Irvin, C.M., Naar, J., Weidner, A., Fleming, L.E., Backer, L.C., Baden, D.G., 2005. Brevetoxin composition in water and marine aerosol along a Florida beach: Assessing potential human exposure to marine biotoxins. *Harmful Algae* 4, 965–972. <https://doi.org/10.1016/J.HAL.2004.11.004>
- Pottier, I., Vernoux, J.P., Jones, A., Lewis, R.J., 2002. Characterisation of multiple Caribbean ciguatoxins and congeners in individual specimens of horse-eye jack

- (*Caranx latus*) by high-performance liquid chromatography/mass spectrometry. *Toxicon* 40, 929–939. [https://doi.org/10.1016/S0041-0101\(02\)00088-0](https://doi.org/10.1016/S0041-0101(02)00088-0)
- Pratheepa, V., Alex, A., Silva, M., Vasconcelos, V., 2016. Bacterial diversity and tetrodotoxin analysis in the viscera of the gastropods from Portuguese coast. *Toxicon* 119, 186–193. <https://doi.org/10.1016/J.TOXICON.2016.06.003>
- Rambla-Alegre, M., Miles, C.O., de la Iglesia, P., Fernandez-Tejedor, M., Jacobs, S., Sioen, I., Verbeke, W., Samdal, I.A., Sandvik, M., Barbosa, V., Tediosi, A., Madorran, E., Granby, K., Kotterman, M., Calis, T., Diogene, J., 2018. Occurrence of cyclic imines in European commercial seafood and consumers risk assessment. *Environ. Res.* 161, 392–398. <https://doi.org/10.1016/J.ENVRES.2017.11.028>
- Reverté, L., Soliño, L., Carnicer, O., Diogène, J., Campàs, M., 2014. Alternative Methods for the detection of emerging marine toxins: biosensors, biochemical assays and cell-based assays. *Mar. Drugs* 12, 5719–5763. <https://doi.org/10.3390/md12125719>
- Rodríguez, P., Alfonso, A., Vale, C., Alfonso, C., Vale, P., Tellez, A., Botana, L.M., 2008. First toxicity report of tetrodotoxin and 5,6,11-trideoxyTTX in the trumpet shell *Charonia lampas lampas* in Europe. *Anal. Chem.* 80, 5622–5629. <https://doi.org/10.1021/ac800769e>
- Rodríguez, I., Alfonso, A., Alonso, E., Rubiolo, J.A., Roel, M., Vlamis, A., Katikou, P., Jackson, S.A., Menon, M.L., Dobson, A., Botana, L.M., 2017. The association of bacterial C 9 -based TTX-like compounds with *Prorocentrum minimum* opens new uncertainties about shellfish seafood safety. *Sci. Rep.* 7, 1–12. <https://doi.org/10.1038/srep40880>
- Rossi, R., Dell’Aversano, C., Krock, B., Ciminiello, P., Percopo, I., Tillmann, U., Soprano, V., Zingone, A., 2017. Mediterranean *Azadinium dexteroporum* (Dinophyceae) produces six novel azaspiracids and azaspiracid-35: a structural study by a multi-platform mass spectrometry approach. *Anal. Bioanal. Chem.* 409, 1121–1134. <https://doi.org/10.1007/s00216-016-0037-4>
- Rundberget, T., Aasen, J.A.B., Selwood, A.I., Miles, C.O., 2011. Pinnatoxins and spirolides in Norwegian blue mussels and seawater. *Toxicon* 58, 700–711. <https://doi.org/10.1016/J.TOXICON.2011.08.008>
- Salgado, P., Riobó, P., Rodríguez, F., Franco, J.M., Bravo, I., 2015. Differences in the toxin profiles of *Alexandrium ostenfeldii* (Dinophyceae) strains isolated from different geographic origins: Evidence of paralytic toxin, spirolide, and gymnodimine. *Toxicon* 103, 85–98. <https://doi.org/10.1016/J.TOXICON.2015.06.015>
- Samdal, I.A., Løvberg, K.E., Kristoffersen, A.B., Briggs, L.R., Kilcoyne, J., Forsyth, C.J., Miles, C.O., 2019. A practical ELISA for Azaspiracids in shellfish via development of a new plate-coating antigen. *J. Agric. Food Chem.* 67, 2369–2376. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b05652>
- Sellner, K.G., Doucette, G.J., Kirkpatrick, G.J., 2003. Harmful algal blooms: Causes, impacts and detection. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 30, 383–406. <https://doi.org/10.1007/s10295-003-0074-9>

- Selwood, A.I., Miles, C.O., Wilkins, A.L., Van Ginkel, R., Munday, R., Rise, F., McNabb, P., 2010. Isolation, structural determination and acute toxicity of pinnatoxins E, F and G. *J. Agric. Food Chem.* 58, 6532–6542. <https://doi.org/10.1021/jf100267a>
- Silva, M., Barreiro, A., Rodriguez, P., Otero, P., Azevedo, J., Alfonso, A., Botana, L.M., Vasconcelos, V., 2013. New invertebrate vectors for PST, spirolides and okadaic acid in the North Atlantic. *Mar. Drugs* 11, 1936–1960. <https://doi.org/10.3390/md11061936>
- Silva, M., Rodriguez, I., Barreiro, A., Kaufmann, M., Neto, A.I., Hassouani, M., Sabour, B., Alfonso, A., Botana, L.M., Vasconcelos, V., 2015. First report of ciguatoxins in two starfish species: *Ophidiaster ophidianus* and *Marthasterias glacialis*. *Toxins (Basel)*. 7, 3740–3757. <https://doi.org/10.3390/toxins7093740>
- Silva, M., Rodríguez, I., Barreiro, A., Kaufmann, M., Neto, A.I., Hassouani, M., Sabour, B., Alfonso, A., Botana, L.M., Vasconcelos, V., 2020. Lipophilic toxins occurrence in non-traditional invertebrate vectors from North Atlantic Waters (Azores, Madeira, and Morocco): Update on geographical tendencies and new challenges for monitoring routines. *Mar. Pollut. Bull.* 161, 111725. <https://doi.org/10.1016/J.MARPOLBUL.2020.111725>
- Sosa, S., Pelin, M., Cavion, F., Hervé, F., Hess, P., Tubaro, A., 2020. Acute Oral toxicity of pinnatoxin G in mice. *Toxins (Basel)*. 12, 87. <https://doi.org/10.3390/toxins12020087>
- Tester, P., Geesey, M., Vukovich, F., 1993. *Gymnodinium breve* and global warming: what are the possibilities? *Dev. Mar. Biol.* 3, 67,72.
- Thieriet, N., 2014. Auto- French Agency for Food, Environmental and Occupational Health ANSES Opinion Internal Request No OPINION of the French Agency for Food, Environmental and Occupational Health & Safety.
- Tibiriçá, C., Leite, I., Batista, T., Fernandes, L., Chomérat, N., Herve, F., Hess, P., Mafra, L., 2019. *Ostreopsis cf. ovata* Bloom in Currais, Brazil: Phylogeny, Toxin profile and contamination of mussels and marine plastic litter. *Toxins (Basel)*. 11, 446. <https://doi.org/10.3390/toxins11080446>
- Tichadou, L., Glaizal, M., Armengaud, A., Grosseil, H., Lemée, R., Kantin, R., Lasalle, J.-L., Drouet, G., Rambaud, L., Malfait, P., de Haro, L., 2010. Health impact of unicellular algae of the *Ostreopsis* genus blooms in the Mediterranean Sea: experience of the French Mediterranean coast surveillance network from 2006 to 2009. *Clin. Toxicol.* 48, 839–844. <https://doi.org/10.3109/15563650.2010.513687>
- Tirado, M.C., Clarke, R., Jaykus, L.A., McQuatters-Gollop, A., Frank, J.M., 2010a. Climate change and food safety: A review. *Food Res. Int.* 43, 1745–1765. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2010.07.003>
- Totti, C., Accoroni, S., Cerino, F., Cucchiari, E., Romagnoli, T., 2010. *Ostreopsis ovata* bloom along the Conero Riviera (northern Adriatic Sea): Relationships with environmental conditions and substrata. *Harmful Algae* 9, 233–239. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2009.10.006>
- Totti, C., Romagnoli, T., Accoroni, S., Coluccelli, A., Pellegrini, M., Campanelli, A., Grilli, F., Marini, M., 2019. Phytoplankton communities in the northwestern Adriatic Sea:

- Interdecadal variability over a 30-years period (1988–2016) and relationships with meteorological drivers. *J. Mar. Syst.* 193, 137–153. <https://doi.org/10.1016/j.jmarsys.2019.01.007>
- Townhill, B.L., Tinker, J., Jones, M., Pitois, S., Creach, V., Simpson, S.D., Dye, S., Bear, E., Pinnegar, J.K., 2018. Harmful algal blooms and climate change: exploring future distribution changes. *ICES J. Mar. Sci.* 75, 1882–1893. <https://doi.org/10.1093/icesjms/fsy113>
- Turner, A.D., Powell, A., Schofield, A., Lees, D.N., Baker-Austin, C., 2015. Detection of the pufferfish toxin tetrodotoxin in European bivalves, England, 2013 to 2014. *Eurosurveillance* 20, 21009. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES2015.20.2.21009>
- Turner, A.D., Dhanji-Rapkova, M., Coates, L., Bickerstaff, L., Milligan, S., O'Neill, A., Faulkner, D., McEneny, H., Baker-Austin, C., Lees, D.N., Algoet, M., 2017. Detection of Tetrodotoxin Shellfish Poisoning (TSP) toxins and causative factors in bivalve molluscs from the UK. *Mar. Drugs* 15, 1–18. <https://doi.org/10.3390/md15090277>
- Van de Waal, D.B., Tillmann, U., Martens, H., Krock, B., van Scheppingen, Y., John, U., 2015. Characterization of multiple isolates from an *Alexandrium ostenfeldii* bloom in The Netherlands. *Harmful Algae* 49, 94–104. <https://doi.org/10.1016/J.HAL.2015.08.002>
- Vieira, A.C., Rubiolo, J.A., López-Alonso, H., Cifuentes, J.M., Alfonso, A., Bermúdez, R., Otero, P., Vieytes, M.R., Vega, F. V., Botana, L.M., 2013. Oral toxicity of okadaic acid in mice: Study of lethality, organ damage, distribution and effects on detoxifying gene expression. *Toxins (Basel)*. 5, 2093–2108. <https://doi.org/10.3390/toxins5112093>
- Vitousek, P.M., Aber, J.D., Howarth, R.W., Likens, G.E., Matson, P.A., Schindler, D.W., Schlesinger, W.H., Tilman, D.G., 1997. Human alteration of the global nitrogen cycle: Sources and consequences. *Ecol. Appl.* 7, 737–750. [https://doi.org/10.1890/1051-0761\(1997\)007\[0737:HAOTGN\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1890/1051-0761(1997)007[0737:HAOTGN]2.0.CO;2)
- Vlami, A., Katikou, P., Rodriguez, I., Rey, V., Alfonso, A., Papazachariou, A., Zacharaki, T., Botana, A.M., Botana, L.M., 2015. First detection of tetrodotoxin in greek shellfish by UPLC-MS/MS potentially linked to the presence of the dinoflagellate *Prorocentrum minimum*. *Toxins (Basel)*. 7, 1779–1807. <https://doi.org/10.3390/toxins7051779>
- Yin, K., Harrison, P.J., Chen, J., Huang, W., Qian, P.Y., 1999. Red tides during spring 1998 in Hong Kong: Is El Niño responsible? *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 187, 289–294. <https://doi.org/10.3354/meps187289>
- Yotsu-Yamashita, M., Sugimoto, A., Takai, A., Yasumoto, T., 1999. Effects of specific modifications of several hydroxyls of tetrodotoxin on its affinity to rat brain membrane. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 289, 1688–1696.
- Zingone, A., Enevoldsen, H.O., 2000. The diversity of harmful algal blooms: A challenge for science and management. *Ocean Coast. Manag.* 43, 725–748. [https://doi.org/10.1016/S0964-5691\(00\)00056-9](https://doi.org/10.1016/S0964-5691(00)00056-9)

RINGRAZIAMENTI

Concludo questo elaborato ringraziando le persone incontrate lungo questo percorso.

Innanzitutto, ringrazio il mio relatore *Stefano Accoroni* per avermi seguita con tanta pazienza, dedizione e simpatia.

La mia correlatrice, la professoressa *Cecilia Maria Totti* che con le sue lezioni mi ha avvicinata al mondo delle alghe.

Ringrazio infinitamente la correlatrice *Tiziana Romagnoli* che in laboratorio, giorno dopo giorno con dolcezza, simpatia e comprensione, mi ha guidata nella parte più affascinante di questa tesi sperimentale.

Un grazie speciale va all'assegnista *Marika*, persona meravigliosa che mi ha seguito in ogni passo di questo lavoro; grazie per i numerosi insegnamenti, scientifici e non, per essermi stata sempre accanto e per avermi aiutata nei periodi più difficili.

Le dottorande *Francesca* e *Apurva* per i bei momenti passati in laboratorio, per le lunghe conversazioni sulla scienza e sulla vita.

Ringrazio la mia compagna di corso e amica *Annalisa*, con la quale ho condiviso pianti e risate. Ringrazio mia zia *Roberta*, il mio punto di fermento e *Silvia*, molto più di un'amica. Ringrazio le mie due vecchie rocce *Serena* e *Hilary*, amiche da una vita.

Ringrazio *Manuel*, per esserci stato e avermi supportato sempre.

Dedico questa tesi ai *miei genitori* e a *mia sorella*, per il loro immenso amore e supporto in ogni circostanza