



Università Politecnica delle Marche

DIPARTIMENTO DI SCIENZE DELLA VITA E DELL'AMBIENTE

Corso di Laurea Magistrale in Biologia Marina

Accumulo di composti palytossino-simili in un banco naturale di mitili durante una fioritura di *Ostreopsis cf. ovata* (Dinophyceae)

Palytoxin-like compounds accumulation in natural mussel banks during an *Ostreopsis cf. ovata* bloom

Tesi di Laurea di:

Luigi Barbetti

Relatore:

Prof. Stefano Accoroni

Correlatore

Prof. Cecilia Maria Totti

Sessione straordinaria

Anno Accademico 2020/2021

INTRODUZIONE.....	3
HARMFUL ALGAL BLOOMS.....	3
LE DINOPHYCEAE	8
IL GENERE OSTREOPSIS.....	12
<i>Tossicità di Ostreopsis</i>	16
<i>Mar Mediterraneo e Atlantico orientale</i>	22
<i>Regioni caraibiche e dell'Atlantico occidentale</i>	24
<i>Oceano Pacifico</i>	24
<i>Oceano Indiano e Indonesia</i>	25
<i>Oceania</i>	25
ECOLOGIA.....	26
<i>Substrato</i>	26
<i>Idrodinamismo</i>	28
<i>Temperatura</i>	29
<i>Salinità</i>	31
<i>Profondità e intensità luminosa</i>	31
<i>Nutrienti</i>	33
ACCUMULO DI COMPOSTI PALITOSSINO-SIMILI NEI PRODOTTI ITTICI DURANTE LE FIORITURE DI OSTREOPSIS	35
SCOPO DELLA TESI.....	42
MATERIALI E METODI	43
AREA DI STUDIO	43
CAMPIONAMENTO	44
SEPARAZIONE DELLA COMUNITÀ EPIFITICA DALLE MACROALGHE.....	47
DETERMINAZIONE DEL PESO UMIDO, PESO SECCO E SUPERFICIE DELLE MACROALGHE.....	48
ANALISI DELLE CELLULE DI OSTREOPSIS SPP. AL MICROSCOPIO	49
CAMPIONAMENTO DEI MITILI.....	50
ANALISI STATISTICHE.....	51
RISULTATI	51
PARAMETRI AMBIENTALI.....	51
OSTREOPSIS CF. OVATA	54
ACCUMULO DI COMPOSTI PALITOSSINO-SIMILI NEI MITILI	58
DISCUSSIONE	61
RELAZIONE CON I PARAMETRI AMBIENTALI	61
ACCUMULO DI COMPOSTI PALITOSSINO-SIMILI NEI MITILI	65
BIBLIOGRAFIA.....	ERRORE. IL SEGNALIBRO NON È DEFINITO.

INTRODUZIONE

Harmful algal blooms

Gli Harmful Algal Blooms (HABs) sono fenomeni naturali caratterizzati dalla crescita di specie algali tossiche o nocive che, raggiungendo un'elevata abbondanza, sono in grado di danneggiare l'equilibrio negli ecosistemi marini e provocare conseguenze negative per le attività economiche umane. Alcune di queste fioriture sono tossiche, ovvero sono indotte da specie in grado di produrre tossine, composti chimici che possono entrare nella rete trofica tramite processi di bioaccumulo e biomagnificazione e raggiungere, in questo modo i consumatori umani tramite diverse vie di trasmissione (aerosol, contatto, consumo di prodotti ittici contaminati). Alcune di queste tossine sono responsabili di eventi di mortalità di massa di specie di invertebrati e pesci, con un grande impatto economico per il settore della pesca e acquacoltura. Altre perdite economiche si riscontrano nel settore turistico, ricreativo, industriale associato alla produzione di prodotti ittici, a cui si aggiungono i costi necessari per mantenere i servizi di pubblica sicurezza e i programmi di monitoraggio per la valutazione delle tossine accumulate nei molluschi,

qualità dell'acqua e composizione del plancton: questo ha comportato un crescente interesse nello studio delle fioriture algali (Sellner et al., 2003).

Specie algali tossiche appartengono alle classi Dinophyceae, Raphidophyceae, Prymnesiophyceae, Dictyochophyceae e Bacillariophyceae, oltreché ai cianobatteri (Sellner et al., 2003). Le tossine algali sono metaboliti secondari come fenoli, alcaloidi e peptidi, la cui tossicità è legata a specifici gruppi funzionali (Lindahl et al. 1998). Alcune di queste specie produttrici di tossine possono causare conseguenze negative a bassa densità cellulare, altre invece solo quando raggiungono un'elevata abbondanza cellulare. Le tossine hanno una tossicità differente e, in base alla loro struttura chimica, al tipo di organi e tessuti che colpiscono in cui si possono accumulare, si classificano in DSP (Diarrethic shellfish poisoning), PSP (Paralithic Shellfish Poisoning), NSP (Neurotoxic Shellfish Poisoning), CFP (Ciguatera Fish Poisoning), ASP (Amnesic Shellfish Poisoning), AZP (Azaspiracid Poisoning), CTP (Cyanobacteria Toxin Poisoning). I sintomi più gravi consistono in problemi digestivi e respiratori, lesioni al sistema nervoso con perdita della memoria, disturbi convulsivi, lesioni ed irritazioni cutanee e nei casi peggiori la morte di pesci, uccelli e mammiferi, tra cui l'uomo (Sellner et al., 2003).

Un altro tipo di HAB riguarda lo sviluppo di alghe non produttrici di tossine, che possono comunque provocare danni negli ecosistemi marini in altri modi: il raggiungimento di un'elevata biomassa può provocare una colorazione delle acque marine (red, green and brown tides) causando una diminuzione dell'intensità di luce attraverso la colonna d'acqua con un conseguente impatto negativo sulla fotosintesi soprattutto del fitobenthos; si possono produrre e accumulare schiume lungo le spiagge determinando un importante danno estetico compromettendo numerose attività ricreative; una grande quantità di biomassa algale può comportare un'elevata produzione di materia organica che favorisce un aumento della biomassa batterica capace di degradare tale materia con conseguente consumo di ossigeno e formazione di zone ipossiche o anossiche innescando eventi di mortalità di massa sia di invertebrati che vertebrati (Anderson et al., 2002).

Una delle cause principali della comparsa di HAB è rappresentato dall'arricchimento di nutrienti in determinate aree: tale processo è definito con il termine di eutrofizzazione. L'eutrofizzazione di diverse aree marine costiere, a livello globale, è dovuta principalmente ad un aumento degli scarichi di rifiuti provenienti da aree industriali legate alla produzione di combustibili fossili, urbane, domestiche, attività agricole,

zootecniche e impianti di acquacoltura: un incremento dell'intensità di queste attività negli ultimi decenni, insieme a variazioni dei parametri ambientali dovute ai cambiamenti climatici stanno innescando un incremento della frequenza dei fenomeni HABs anche in aree del pianeta in cui non si erano mai verificate prima (Anderson et al., 2002; Hesler et al., 2008; Gobler et al., 2020). Alcune di queste specie sono aliene e invasive ed introdotte in nuovi ambienti in modi diversi, principalmente tramite acque di zavorra. L'abbondanza, a sua volta, può dipendere da variazioni della comunità dei grazers, causate da attività di pesca e acquacoltura (overfishing ed aumento dell'acquacoltura riducono la pressione dei grazers). Relazioni chiare tra dose dei nutrienti-biomassa algale sono presenti maggiormente negli ecosistemi d'acqua dolce rispetto a quelli marini. Gli Harmful algal blooms determinano delle alterazioni nella rete trofica, composizione della comunità planctonica, variazioni nelle interazioni tra preda-predatore, causando anche cambiamenti nel flusso di nutrienti. La fase esponenziale di crescita algale può causare una riduzione della quantità di nutrienti, nel caso in cui essi siano utilizzati per la produzione di biomassa. In generale, per sostenere un HAB è necessario un grande input di fonti esterne di nutrienti, ma a volte per sostenere un

HAB è sufficiente la fonte interna di nutrienti che devono essere riciclati e rigenerati (Hesler et al., 2008).

Le attività antropiche responsabili dell'eutrofizzazione nei vari ambienti, i.e. acqua dolce, salmastra o marini, non rappresentano l'unica causa che sta determinando l'incremento della frequenza e dell'intensità degli HAB negli ultimi decenni, ma diversi studi suggeriscono una combinazione di esse con gli effetti provocati dai cambiamenti climatici responsabili della modifica di vari parametri ambientali che esercitano anch'essi una influenza sulla dinamica degli HAB. Le conseguenze del cambiamento climatico riguardano il riscaldamento delle acque marine superficiali che influenza la crescita di varie specie ognuna delle quali ha una temperatura ottimale di crescita, il rafforzamento della stratificazione della colonna d'acqua che determina l'aumento della temperatura superficiale e la riduzione del processo di mescolamento delle masse d'acqua favorendo l'accumulo di biomassa algale, l'incremento dell'acidificazione oceanica che induce cambiamenti nella comunità del plancton, e l'aumento della frequenza di fenomeni meteorologici estremi in grado di aumentare l'input d'acqua dolce e dei nutrienti negli ambienti marini (Glibert, 2020; Sellner et al., 2003; Gobler et al., 2020; Tester et al., 2020).

Le Dinophyceae

Le Dinophyceae sono uno dei gruppi di microalghe unicellulari, più importanti presenti negli ambienti acquatici principalmente in mare. Appartengono al supergruppo degli Alveolata perché presentano un set di vescicole piatte, denominate alveoli al di sotto del plasmalemma. Sono caratterizzate da un'elevata diversità morfologica e trofica che riflette la loro adattabilità a un ampio range di condizioni ambientali (Gomez, 2012). Comprendono sia produttori primari che consumatori nella catena trofica e possono essere anche ecto o endo parassiti; diverse specie sono responsabili di Harmful Algal Blooms. Mostrano una grande eterogeneità di habitat distribuendosi sia in acque marine sia continentali. Diverse specie sono adatte a vivere in ambienti salmastri caratterizzati da un'ampia tolleranza a diversi valori di salinità. Troviamo specie bentoniche e pelagiche, anche se spesso la distinzione non è chiara per via dell'effetto della turbolenza che crea risospensione in colonna d'acqua; nel caso di specie parassite, lo stile di vita bentonico o pelagico è indicato sulla base di quello dell'ospite, nel quale sono ospitate. Varie specie partecipano a interazioni simbiotiche mutualistiche, come simbionti in coralli, anemoni, molluschi ecc., altre agiscono invece come ospiti per cianobatteri formando dei consorzi dinoflagellate-cianobatteri.

Hanno un rivestimento cellulare, chiamato amphiesma o teca, che consiste di un plasmalemma esterno e un sistema di membrane che possono essere ricche di cellulosa (dinoflagellate tectate), oppure vuote (dinoflagellate nude). Questo gruppo mostra un'ampia variabilità morfologica che comprende forme flagellate (principalmente) e non mobili (che producono dinospore flagellate). In base alla posizione dei flagelli si distinguono in dinoconte (la maggior parte), desmoconte (ad es. prorocentroidi) (Okamoto et al., 2014): nelle desmoconte, la cellula forma due valve distinte e i flagelli emergono dalla parte apicale della cellula; nelle dinoconte, la cellula è attraversata da due scanalature, il cingolo sul piano trasversale/equatoriale e il solco su quello longitudinale, mentre i flagelli emergono ventralmente da un poro e si sviluppano ciascuno all'interno di una delle due scanalature.

Le dinoflagellate sono spesso dotate di strutture eiettili, organuli responsabili dell'espulsione di sostanze a vari scopi (difensivo, movimento). Esse comprendono le tricocisti, che espellono proteine accumulate alla periferia cellulare, mucocisti, che rilasciano mucillagine, nematocisti, simili alle cnidocisti presenti nei cnidari.

Il pusulo è un elemento tipico delle dinoflagellate con una funzione ancora non completamente conosciuta (forse osmoregolatoria), formato da due

parti: una struttura simile ad un sacco, che si apre nel canale flagellare attraverso un poro, e un elemento di raccolta che, invece, è un vacuolo dotato di evaginazioni (Graham et al., 2009).

I plastidi sono chiamati '*peridinin plastid*' e sono stati ottenuti da un'endosimbiosi secondaria con un'alga rossa. Sono dotati di tre membrane, tilacoidi distribuiti a gruppi di tre, e ricchi di clorofille, carotenoidi e peridininina, da cui prendono il nome. Alcune dinoflagellate possiedono plastidi differenti ottenuti da eventi di endosimbiosi terziaria o secondaria seriale dopo la perdita del *peridinin plastid*. Circa la metà, invece, è priva di plastidi e quindi sono specie eterotrofe. Infine, alcune, sono in grado di acquisirlo temporaneamente per espletare una funzione fotosintetica (keptoplastidia). Le dinoflagellate accumulano prodotti di riserva come amido, gocce lipidiche come riserve energetiche ma, anche, prodotti di rifiuto (Honsell et al., 2013).

Il nucleo delle dinoflagellate viene chiamato dinocarion, contiene una grande quantità di DNA e ha caratteristiche citologiche uniche, come la presenza di cromosomi permanentemente condensati, privi dei tipici istoni eucarioti che rimangono sempre attaccati alla membrana nucleare la quale rimane intatta durante la divisione (mitosi chiusa) (F. Gomez, 2012).

La maggior parte delle dinoflagellate presenta un ciclo vitale aplonte, con uno stadio aploide, mobile e biflagellato. La generazione aploide si riproduce asessualmente ma anche per via sessuale. Nella riproduzione sessuale, i gameti (due cellule aploidi spesso indistinguibili dalle normali cellule vegetative) si fondono producendo uno stadio diploide flagellato, il planozigote che successivamente può produrre uno stadio privo di flagelli dormiente, l'ipnozigote, per poi riformare uno planozigote una volta germinato. Il planozigote va poi incontro a meiosi riformando la generazione aploide.

Le cisti rappresentano delle forme di resistenza che si possono formare nelle dinoflagellate come uno stadio del ciclo vitale, per riproduzione sessuale o agamica, generalmente in condizioni ambientali sfavorevoli alla crescita. Le cisti presentano all'estremità apicale un poro, l'archoopilo, da cui inizia la germinazione che è anche utilizzato come carattere tassonomico. Si distinguono cisti di resistenza, quelle dotate di una parete molto spessa e in grado di accumulare prodotti di riserva per rimanere dormienti per un lungo periodo, e cisti temporanee che, invece, presentano una parete meno resistente e un minore quantità di prodotti di riserva accumulati e una resistenza più ridotta nel tempo. Entrambe si possono

differenziare dalla riproduzione sessuale o asessuale. Un'altra funzione delle cisti è quella di favorire la dispersione delle specie.

Il genere Ostreopsis

Il genere *Ostreopsis* include attualmente 11 specie (Guiry & Guiry, 2022). La prima specie ad essere stata descritta è stata *O. siamensis* (Johs. Schmidt) nel 1900 nel Golfo di Siam (Thailandia). Da quel momento sono state identificate e descritte altre 10 specie di *Ostreopsis*: *O. ovata* Fukuyo, *O. lenticularis* Fukuyo, *O. heptagona* Norris, Bomber & Balech, *O. labens* Faust & Morton, *O. mascarenensis* Quod, *O. belizeana* Faust, *O. caribbeana* Faust, *O. marina* Faust e, più recentemente, *O. fattorussoi* Accoroni, Romagnoli & Totti e *O. rhodesiae* Verma, Hoppenrath & Murray. Tradizionalmente, la descrizione delle varie specie si basava su caratteri morfologici: taglia, forma e disposizione delle placche. Tuttavia, l'esistenza di un'ampia variabilità morfologica e dimensionale all'interno della stessa specie ha reso necessario applicare approcci molecolari basati su specifici marker molecolari: regioni dello Internal Transcribed Spacer (ITS1 e ITS2), domini del gene nucleare LSU (D1/D2, D8-D10) e del gene ribosomiale ITS-5.8S rDNA. L'analisi di queste regioni è importante per la

determinazione di relazioni filogenetiche tra le varie specie appartenenti a tale genere (Pavaux et al., 2020).

Come la maggior parte delle dinoflagellate marine, *Ostreopsis* ha un ciclo vitale aplonte con un'unica fase aploide rappresentata da cellule mobili biflagellate (Bravo et al., 2012; Accoroni et al., 2014; Accoroni et al., 2016).

La riproduzione asessuale e sessuale è stata studiata principalmente in *O. ovata* sia nelle popolazioni naturali che in cultura.

La riproduzione asessuata avviene nello stadio mobile e prevede la divisione delle cellule per desmoschisi lungo il piano sagittale, con ciascuna cellula figlia che rimane aderente parzialmente alle placche tecali parentali. Durante il processo di divisione cellulare, dapprima viene duplicato il genoma, poi si sviluppa una partizione sulla parete dal lato ventrale a quello dorsale, mentre la teca originale parentale viene mantenuta. Una volta che le cellule si sono divise, le placche tecali si dividono e sono distribuite tra le due cellule figlie, che si separano rapidamente nonostante abbiano ancora delle teche incomplete. Nelle culture sono evidenziate differenze nella capacità di divisione cellulare e una variabilità di taglia cellulare. Le cellule più grandi (diametro dorsoventrale maggiore di 50 μm) hanno tassi di divisione giornalieri più elevati, mentre nessuna cellula più piccola (diametro dorsoventrale

minore di 35 μm) è stata osservata a dividersi entro i 2 giorni dall'isolamento in coltura e solo il 28% di cellule si divide al terzo giorno (Bravo et al., 2012).

La riproduzione sessuale inizia con la fusione della coppia di gameti aploidi con la formazione di una cellula diploide flagellata, denominata planozigote. La coniugazione dei due gameti avviene per cariogamia, caratterizzata dalla migrazione di un nucleo di uno verso il nucleo dell'altro e la successiva unione, senza che sia richiesta la fusione citoplasmatica, definita plasmogamia, dopo che le due cellule sono entrate in contatto a livello dell'epiteca e, anch'esse, presentano dimensioni variabili come le cellule vegetative (Bravo et al., 2012). Alternativamente, non può essere escluso che qualche coppia di gameti si divida prima della migrazione dei nuclei: questo si può verificare nel caso in cui i gameti presentino solamente un contatto tra le due teche, oppure se presentano un modello di divisione simile a quello delle cellule vegetative (Bravo et al., 2012).

Un'altra modalità di unione dei due gameti è stata osservata da uno studio condotto da Accoroni et al. (2014), in cui i due gameti si allineano lateralmente con i cingoli perpendicolari l'uno all'altro, e oltre alla cariogamia, la plasmogamia sembra avvenire. In tale studio sono state

evidenziate due tipi di cisti: temporanee e di resistenza. Le cisti temporanee sono cellule non mobili, non dormienti, che si possono differenziare dalle cellule vegetative o dai planozigoti tramite ecdisi (Bravo et al., 2012; Accoroni et al.; 2014). Questo tipo di cisti, quando poste in condizioni favorevoli caratterizzate da un terreno di coltura fresco e una temperatura di 21°C, germinano entro 3 giorni originando cellule vegetative. Le cisti a doppia parete invece sono state osservate sia in coltura che nei campioni naturali e sono caratterizzate da una parete cellulare più spessa e, occasionalmente, il cingolo che attraversa la parete risulta visibile, così come i frammenti della vecchia parete trovati sopra il nuovo rivestimento. Queste cellule sono spesso organizzate in gruppi immerse completamente da muco, che si supponga possa agire come rivestimento protettivo. Queste cisti resistenti, isolate da colture di 5 mesi, e messe in un nuovo terreno, germinano dopo 3-5 giorni a 25° C, diversamente dalle altre in cui è sufficiente una temperatura più bassa (Accoroni et al., 2014). La temperatura svolge un ruolo chiave nello sviluppo del bloom di *O. ovata*, perché influenza la germinazione delle cisti. Tuttavia, la fioritura si verifica in nord Adriatico in tarda estate quando la temperatura è in decrescita; questo significa che altri fattori ambientali

intervengono nello sviluppo della fioritura di questa specie (Accoroni et al., 2014).

Le acque del mar Mediterraneo sono interessate da massicce fioriture di *Ostreopsis*, principalmente generate dal genotipo *Ostreopsis cf. ovata*, che proliferano tipicamente in prossimità di acque costiere poco profonde e a livello di insenature, formando un biofilm mucillaginoso brunastro, in grado di coprire reef, substrati rocciosi, sedimenti molli, macroalghe, angiosperme marine e invertebrati (Totti et al., 2010; Accoroni & Totti, 2016).

Tossicità di Ostreopsis

Delle 11 specie del genere *Ostreopsis* tuttora identificate, 8 sono considerate potenzialmente tossiche per l'uomo e altri organismi marini a causa della produzione di tossine palitossino-simili. La palitossina (PITX) è la più potente tossina di origine biologica non batterica, isolata inizialmente nel 1971 dal genere di coralli tropicali *Palythoa*, e ora riconosciuta come 42-OH-PITX (Ciminiello et al., 2011). PITX, C₁₂₉H₂₂₁O₅₄, è una molecola con una struttura chimica complessa costituita da gruppi lipofilici e idrofilici (Fig. 1).

Il principale target biologico della PITX sembra essere Na⁺/K⁺ ATPasi. Una pompa proteica della membrana plasmatica coinvolta nel mantenimento dei gradienti ionici transmembrana delle cellule animali, essenziale per le funzioni cellulari e la vita. PITX e analoghi sono in grado di modificare questa pompa in un poro non selettivo per cationi monovalenti, in tal modo, distruggendo il gradiente ionico transmembrana e stimolando effetti biologici avversi (Habermann, 1989; Artigas and Gadsby, 2003).

I composti PITX-simili prodotti da *Ostreopsis* hanno struttura chimica derivata da quella parentale di PITX, un sito e una modalità d'azione simili.

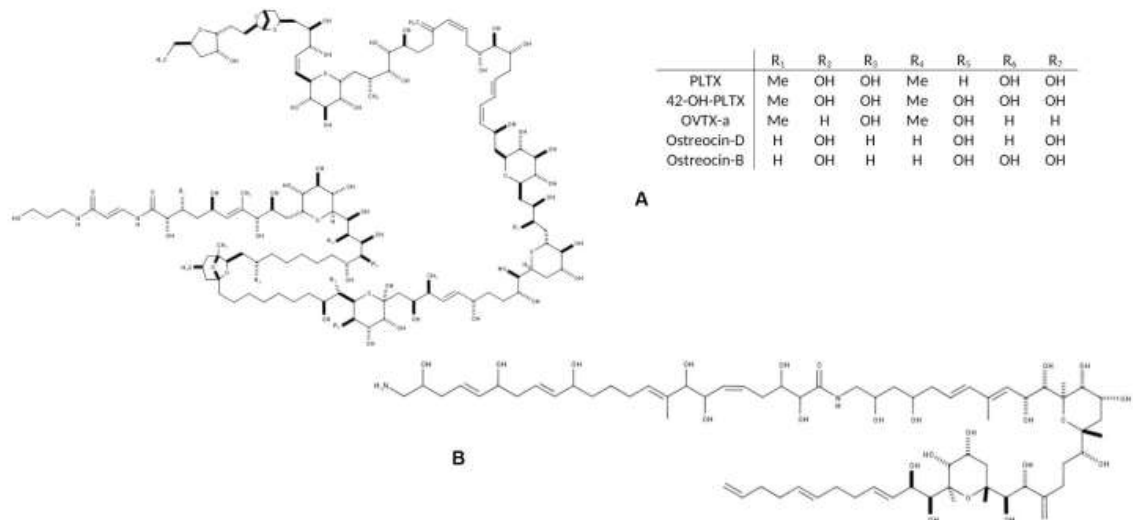


Fig. 1. Struttura chimica delle principali tossine trovate nelle specie di *Ostreopsis*: (A) *Palitossina* e i suoi principali analoghi; e (B) *Ostreol-A*, presente in alcuni ceppi coreani.

Da Pavaux et al., 2020.

L'ostreocina D è stata la prima di queste tossine ad essere stata isolata da *O. siamensis* da Usami et al. (1995), mentre gli altri composti PITX-simili, i.e. ovatossine, ostreocine e mascarenotossine, sono state isolate da altre specie come *O. fattorussoi*, *O. mascarensis*, e *O. cf. ovata* (Mercado et al., 1994; Deeds and Schwartz, 2010; Parsons et al., 2012). La tossicità di *O. lenticularis* invece rimane incerta, in quanto Mercado et al. (1994) hanno riportato la produzione delle ostreotossine 1 e 3 da colture di *O. lenticularis* isolate dai Caraibi ma suggerendo che la presenza di determinati batteri potrebbero essere la vera fonte di quelle tossine, come riportato poi da successive ricerche (Parsons et al. 2012; Mercado et al., 1994, 1995; Meunier et al., 1997; Pérez-Guzmán et al., 2008). Inoltre, recentemente Chomérat et al. (2019) hanno riportato l'assenza di tossicità di ceppi di *O. lenticularis* usando analisi CBA-N2a e LC-UV-MS/MS. Invece, la tossicità di *O. heptagona*, *O. labens* e *O. rhodesiae*, è stata descritta solo attraverso approcci biologici, mentre non sono ancora state identificate le tossine responsabili di questi effetti.

Nel caso di *O. cf. ovata*, sono state identificate da diversi ceppi isolati più di 12 ovatossine (OVTX) (Ciminiello et al., 2008, 2010, 2012; Suzuki et al., 2012; Garcia-Altare et al., 2015; Brissard et al., 2015) e la PLTX isobarica (isoPLTX) (Garcia-Altare et al., 2015), dove le forme più comuni sono

OVTX-a e OVTX-b. A causa di un'alta varietà e complessità della struttura chimica delle tossine risulta difficile stabilire quali sono i valori limite di accumulo delle tossine nei prodotti ittici senza provocare danni alla salute umana. (Pavaux et al., 2020)

Fattori ambientali come la temperatura, salinità, luce o nutrienti, profondità o substrato macroalgale ma anche caratteristiche del ceppo isolato in coltura (sito di isolamento, tempo mantenuto in coltura, fase di crescita della coltura) potrebbero influenzare la produzione di tossine (Ciminiello et al., 2012; Pezzolesi et al., 2012, 2014; Scalco et al., 2012; Vanucci et al., 2012b; Gémin et al., 2019). Riguardo a *O. cf. ovata*, Accoroni et al. (2017) hanno evidenziato la massima produzione di tossine per ogni singola cellula all'inizio della fioritura e una progressiva diminuzione con l'avanzare del bloom fino ad essere completamente assente a fine bloom. Al tempo stesso, l'andamento del contenuto di tossine, accumulate sulla superficie delle macroalghe campionate, segue quello dell'abbondanza di *Ostreopsis*, con il valore più alto registrato in corrispondenza del picco della fioritura: si evidenzia quindi, una correlazione positiva tra l'abbondanza di *Ostreopsis* e la quantità di tossina sulla superficie della stessa macroalga. La concentrazione relativamente bassa in ogni singola cellula di tossine durante il picco della fioritura rispetto alle fasi

precedenti, potrebbe essere spiegato dalla riduzione del contenuto di tossine dovuto a una continua divisione delle cellule madri nelle cellule figlie durante la fase esponenziale del bloom (Granéli and Flynn, 2006; Pezolesi et al., 2014) caratterizzata da una proliferazione cellulare, in cui la taglia media delle cellule tende a ridursi (Accoroni et al., 2012; Carnicer et al., 2015). La temperatura e la disponibilità dei nutrienti (rapporto N:P) sembrano influenzare la produzione di tossine di *O. cf. ovata*: alta temperatura e un rapporto N:P basso rappresentano condizioni favorevoli sia per l'inizio della fioritura sia per la massimizzazione della produzione delle tossine in *O. cf. ovata*; questo spiegherebbe la maggior concentrazione di tossine per cellula nelle prime fasi di sviluppo, i.e. quando le condizioni ambientali sono ottimali, e il loro repentino abbassamento dopo il picco della fioritura, ovvero quando le condizioni ambientali non sono più ottime né per la crescita né per la produzione di tossina (Accoroni et al., 2017). Tra i fattori che influenzano la produzione di tossine è stata anche supposta la presenza di altri microrganismi durante le fioriture di *Ostreopsis*. Per esempio, sono stati trovati batteri associati alle superfici o alle matrici extracellulari di *O. lenticularis* correlati a un'alta tossicità delle dinoflagellate durante la fase stazionaria delle colture (Tosteson et al., 1989 and Ashton et al., 2003).

La trasmissione all'uomo di queste tossine può avvenire in 3 modi diversi: (i) consumo di prodotto ittico contaminato dalle tossine di *Ostreopsis*, (ii) esposizione diretta con l'acqua di mare contenente le cellule di *Ostreopsis* e/o le tossine da essa prodotta e (iii) respirazione di aerosol contenente le cellule di *Ostreopsis* e/o le tossine da essa prodotta.

L'intossicazione da consumo di prodotti ittici contaminati da PLTX e analoghi include sintomi di varia natura: nausea, stanchezza, diarrea, vomito, crampi muscolari, parestesia, difficoltà respiratorie a tachicardia. Nei casi drammatici, i pazienti muoiono tra le 15 ore e i 4 giorni dopo l'intossicazione da consumo di cibo contaminato, anche dopo l'ospedalizzazione. Lungo le coste mediterranee è stata riportata la presenza di queste tossine in alcuni organismi della macrofauna, principalmente ricci di mare, granchi e cefali (Amzil et al., 2012; Biré et al., 2013; Biré et al. 2015; and Brissard et al., 2014). Non è ancora chiaro se *Ostreopsis* sia l'ultimo organismo che sintetizza questi composti riconducibili a PLTX e come questi composti siano trasferibili lungo la rete trofica. Fortunatamente, fino a questo momento, nessun avvelenamento da ingestione di cibo contaminato da queste tossine è stato registrato nelle coste del Mediterraneo (Pavaux et al., 2020). I sintomi più frequenti cui sono state associate negli ultimi anni le fioriture di *Ostreopsis* sono quelli

respiratori e cutanei, in seguito ad un contatto diretto con acqua contaminata e/o dopo respirazione di aerosol marino. Essi includono rinorrea, dolore faringeo, mal di testa, febbre, irritazione agli occhi e dermatiti. Nella maggior parte dei casi, i sintomi scompaiono entro poche ore senza una specifica medicazione nel caso di un'esposizione limitata; in caso di un'esposizione prolungata è invece richiesta l'ospedalizzazione (Durando et al., 2007).

Distribuzione geografica di *Ostreopsis* spp.

Il genere *Ostreopsis* inizialmente era considerato prettamente tropicale, ma negli ultimi decenni si sta assistendo a un aumento della sua distribuzione geografica anche alle latitudini temperate, come l'espansione soprattutto di *O. ovata* / *O. cf. ovata* nelle acque costiere di Australia, Brasile, Cina, mar dei Caraibi, Polinesia francese, Hawaii, oceano Indiano, Giappone, Malesia, Nuova Caledonia, Nuova Zelanda, Russia, Venezuela, Vietnam e, specialmente, nel mar Mediterraneo (Testler et al., 2020; Pavaux et al., 2020).

Mar Mediterraneo e Atlantico orientale

La presenza di questo genere di dinoflagellate è stata per la prima volta registrato nel mar Mediterraneo nel 1972 a Villefrance-Sur-Mer, in

Francia. In seguito, Tognetto et al. (1995) osservarono la presenza di *O. cf. ovata* lungo le coste del Tirreno, in Italia, mentre Vila et al. (2001) evidenziarono la presenza di questa specie lungo le coste della Catalogna. Il genotipo di *O. cf. ovata* rimane quello più abbondante nel mar Mediterraneo, ma presenta una distribuzione più globale, dal Brasile fino alle isole Canarie e di Madeira, popolazioni incluse nel clade Mediterraneo e Atlantico (Penna et al., 2010). La distribuzione di *O. siamensis* riguarda le coste catalane, dell'Italia meridionale e del nord Africa, ma anche nell'Atlantico orientale lungo le coste del Portogallo, Spagna nordorientale e Marocco (Parsons et al., 2012). Nell'Adriatico settentrionale, il primo record di *Ostreopsis cf. ovata* è stato osservato nel 2006, in seguito all'analisi su macroalghe campionate in due siti differenti, golfo di Trieste e vicino a Rovinj, in Croazia (Monti et al., 2007). Successive analisi molecolari hanno evidenziato la presenza esclusiva del genotipo *O. cf. ovata* nel mar Adriatico (Kuzat et al., 2021). Infine, una nuova specie appartenente al genere *Ostreopsis* è stata identificata da Accoroni et al. (2016) nel Mediterraneo orientale, *O. fattorussoi*, indicata come la specie morfologicamente più piccola del genere assieme a *O. ovata*.

Regioni caraibiche e dell'Atlantico occidentale

Altre specie sono state descritte nella regione caraibica: *O. heptagona* è stata scoperta nell'area della Florida, USA nel 1980 e descritta da Norris et al. (1985); *O. labens* nelle acque costiere del Brasile all'inizio degli anni 90, mentre altre tre specie, *O. marina*, *O. belizeana* e *O. caribbeana* sono state riportate dal Brasile, Porto Rico e isole Virgin britanniche. Si ritrovano spesso associate con *O. labens*, *O. lenticularis*, *O. mascarenensis* e i generi *Prorocentrum* e *Gamberdiscus* (Parsons et al., 2012).

Oceano Pacifico

Sono stati riportati da Bourdeau et al. (1995) due bloom di *O. cf. siamensis* e *O. lenticularis* nelle zone costiere delle Indie occidentali francesi, mentre *O. cf. ovata* è stata campionata a basse concentrazioni, come parte permanente della microflora. Una presenza di tale specie è stata documentata anche nelle isole Hawaii, mentre bloom di *O. siamensis* si verificano anche lungo le coste pacifiche del Messico. Nel Pacifico occidentale, fioriture di *O. cf. ovata* avvengono frequentemente dalle aree sub-tropicali fino alle acque più temperate (Parsons et al., 2012).

Oceano Indiano e Indonesia

Nelle varie regioni che si estendono dalle Filippine, comprendendo le acque malesiane costiere, Vietnam, vengono segnalate fioriture di varie specie di *Ostreopsis*: *O. cf. ovata*, *O. labens*, *O. lenticularis*, *O. cf. siamensis*, *O. marina* e *O. siamensis*, (quest'ultima proprio originaria dal golfo della Thailandia). Negli habitat delle barriere coralline dell'oceano Indiano sudoccidentale sono presenti *O. belizeana*, *O. caribbeana*, *O. lenticularis*, *O. marina*, *O. mascarenensis*, *O. cf. ovata* e *O. heptagona* (Parsons et al., 2012).

Oceania

In Nuova Zelanda, *O. siamensis* produce intense fioriture formando una mat estesa di mucillagine che ricopre le macroalghe, mentre fioriture di *O. cf. ovata*, *O. cf. siamensis* e *O. lenticularis* sono state riportate in Nuova Caledonia ma anche negli altri mari più temperati di questa area (Parsons et al., 2012).

Ecologia

Di tutte le specie di *Ostreopsis* note, la più studiata da un punto di vista ecologico è *O. cf. ovata*, grazie alla sua ampia distribuzione globale. Diversi sono i fattori ambientali noti per influenzare la dinamica dei suoi bloom.

Substrato

Ostreopsis cf. ovata è una dinoflagellata bentonica in grado di crescere su una grande varietà di substrati, sia viventi come epifitica o epizoica, che non viventi come epilitica su substrati duri ma anche mobili. Non si tratta quindi di una epifitica obbligata, ma alte abbondanze sono state registrate anche su substrati rocciosi, rispetto invece alle conchiglie di molluschi che non sono in grado di supportare un'alta concentrazione di epibionti, probabilmente a causa della presenza di alcune strategie da parte dell'organismo vivente che la ospita che ne scoraggia la colonizzazione (Totti et al., 2010). Il ruolo del substrato può essere anche considerato comparando le abbondanze su diverse macrofite: si è evidenziato, indipendentemente dal gruppo tassonomico della macrofita ospite, una maggiore abbondanza di questa microalga su macroalghe caratterizzate da talli ramificati, flessibili e tridimensionali rispetto a quelle con talli laminari (Totti et al., 2010). Questo tipo di talli sembrano essere più adatti

per la crescita di *O. cf. ovata*, in quanto garantiscono una maggiore resistenza all'idrodinamismo (Accoroni et al. 2012; Pavaux et al., 2020). Elevate abbondanze di *O. cf. ovata* sono state trovate su *Ellissolandia elongata*, un'alga corallina rossa, e sulla comunità turf macroalgale, matrice complessa formata da Corallinales, Ceramiales e altre alghe filamentose (Meroni et al., 2018, Pavaux et al., 2020). Invece, *Cystoseira amentacea*, nonostante un tallo ramificato, presenta una minore superficie disponibile per l'adesione delle cellule di *Ostreopsis*, e quindi ospita un'abbondanza ridotta (Meroni et al., 2018). Inoltre, alcune macroalghe, appartenenti alle alghe brune, sono responsabili della produzione di composti bioattivi con un ipotizzabile effetto algicida sulle microalghe (Meroni et al., 2018), di conseguenza la produzione di questi metaboliti secondari da parte di alcune macroalghe potrebbe spiegare la preferenza di *Ostreopsis* a crescere su determinati substrati. In particolare, è stato osservato come *Ulva rigida* e *Dyctyota dichotoma* esercitano un potente effetto inibitorio su *O. cf. ovata* riducendo la sua crescita, morfologia, produzione di tossine, fisiologia e l'adesione delle cellule alla superficie fitobentonica (Accoroni et al., 2015; Pavaux et al., 2020).

Idrodinamismo

Diversi studi considerano le condizioni idrodinamiche come il principale fattore che influenza i trend del bloom di *Ostreopsis*, sottolineando che le maggiori abbondanze si registrano nei siti riparati dal moto ondoso, piuttosto che nei siti maggiormente esposti da esso (Totti et al., 2010). Un forte idrodinamismo tende a rimuovere le dinoflagellate bentoniche dal substrato che sono facilmente risospese in colonna d'acqua. Queste osservazioni, oltre ad essere state eseguite per varie specie di *Ostreopsis* in varie regioni del globo, sono state realizzate anche nel bloom di *O. cf. ovata* dell'Adriatico settentrionale, suggerendo come questo parametro ambientale esercita un importante effetto sulla variabilità temporale della fioritura, perché eventuali mareggiate possono causare un crollo delle abbondanze cellulari bentoniche, le quali possono ristabilirsi ad alte densità dopo diversi giorni di condizioni di mare piatto (Totti et al., 2010; Accoroni et al., 2012a). Inoltre, è stato anche evidenziato che la turbolenza può influenzare il tasso di crescita e la taglia cellulare (Accoroni et al., 2012b). La maggiore differenza, in termini di abbondanza cellulare, tra i siti esposti a un alto idrodinamismo e i siti protetti si registra durante la fase di proliferazione del bloom, rispetto alle fasi iniziali e terminali di decrescita, caratterizzata dalla formazione di una pellicola brunastra,

costituita da mucillagine secreta dalle cellule di *Ostreopsis*, adesa al substrato e prodotta solo durante la fase esponenziale di crescita del bloom. Questo rivestimento polisaccaridico viene facilmente rimosso dall'azione di forti correnti e di moto ondoso (Totti et al., 2010).

Temperatura

Inizialmente diversi autori suggerivano come le alte temperature fossero necessarie per favorire la proliferazione di *O. cf. ovata*, ma in seguito un'analisi più accurata dei dati in letteratura scientifica mostra come il ruolo della temperatura non sia lo stesso in tutte le aree costiere del globo. Nelle aree temperate, le fioriture di *O. cf. ovata* iniziano in estate e terminano in autunno. Nell'Adriatico settentrionale, la crescita inizia intorno alla metà/fine di agosto, con un picco raggiunto intorno alla metà di settembre, e termina verso le ultime settimane di ottobre (Monti et al., 2007; Totti et al., 2010; Accoroni et al., 2015b). Al contrario, nel mar Ligure il bloom inizia alla fine di luglio con valori di temperatura misurati sempre superiori a 26 °C durante il periodo di massima proliferazione, fino ad un massimo di 30,2 °C (Mangialajo et al., 2008). Vila et al. (2001) hanno osservato picchi di abbondanza di *Ostreopsis* in primavera nel Mediterraneo nord-occidentale e anche, nel mar Egeo, Spatharis et al.

(2009) hanno trovato questi picchi di abbondanza a maggio. In tutte le aree mediterranee analizzate, la più alta abbondanza di questa dinoflagellata non si verifica in corrispondenza della temperatura più alta, tuttavia, sembrerebbe che un valore soglia della temperatura sia un fattore chiave che inneschi l'inizio della fioritura: in base a studi condotti negli anni passati lungo la Riviera del Conero (Adriatico settentrionale), l'abbondanza più alta si registra a temperature comprese tra 18,8 e 24°C (tarda estate), mentre l'inizio del bloom si registra alle temperature più alte, tra 25 e 28,6°C (Accoroni et al., 2015). Questi valori suggeriscono come l'elevata temperatura sia fondamentale per dare inizio alla fioritura, in quanto si è dimostrato che la germinazione delle cisti di resistenza si verifici intorno ai 25°C (Accoroni et al., 2014). Una volta avvenuta la germinazione, le forme vegetative sembrano in grado di proliferare anche in seguito ad una diminuzione della temperatura. In generale, la fioritura di *O. cf. ovata* viene stimolata da una combinazione di temperatura ottimale e disponibilità di nutrienti, in cui un'alta temperatura è necessaria per la germinazione delle cisti, mentre un rapporto ottimale N:P intorno al valore di Redfield rappresenta una condizione necessaria per permettere la proliferazione cellulare (Accoroni et al., 2016).

Salinità

La letteratura scientifica riporta risultati contrastanti riguardo l'effetto della salinità sullo sviluppo delle fioriture di *Ostreopsis*. Nel Mediterraneo occidentale i valori di salinità durante i bloom di *Ostreopsis* variano tra 37-38 (Vila et al, 2001; Mangialajo et al., 2008) e simili valori sono stati misurati nel golfo di Trieste da Monti et al. (2007); nella Riviera del Conero, il range di salinità, durante le fioriture di *O. cf. ovata* tra il 2007 e il 2012, era molto vasto, oscillando tra 31.3 e 39.3, e non si è trovato una significativa correlazione tra questo parametro e l'abbondanza cellulare (Accoroni et al., 2015a). Diversamente dalle condizioni sperimentali, in cui diversi studi hanno dimostrato come il tasso di crescita di alcuni ceppi coltivati in laboratorio possa essere influenzato da diversi valori di salinità, in natura la relazione tra gli algal blooms e la salinità sembra più complicata da individuare (Accoroni et al., 2016).

Profondità e intensità luminosa

L'azione della profondità sulle abbondanze di *Ostreopsis*, nella Riviera del Conero, è stata studiata nel 2007, in cui sono stati eseguiti dei campionamenti a specifici siti target collocati a profondità comprese tra 0,5 e 10 m. (Totti et al., 2010). I risultati di tale studio mostrano una

significativa diminuzione delle abbondanze di *O. cf. ovata* con la profondità: questo potrebbe suggerire un potenziale effetto dell'intensità luminosa nel regolare la distribuzione delle cellule. Questa analisi spiegherebbe la ragione per cui i bloom di *Ostreopsis* si sviluppano principalmente in acque costiere poco profonde, anche se in certe condizioni, si è registrata un'abbondanza nei siti meno profondi a causa dell'azione di un intenso moto ondoso (Totti et al., 2010). La profondità influenza il grado di penetrazione della luce, la cui intensità regola il tasso di crescita cellulare, ma esperimenti condotti su colture cellulari mostrano dei risultati conflittuali riguardo alla correlazione tra l'intensità luminosa e il tasso di crescita; diverse linee cellulari di *Ostreopsis* sp. presentano un tasso di crescita ottimale a intensità luminose differenti e non molto alte: $50 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ per alcune linee cellulari di *O. cf. ovata* analizzate da Scalco et al. (2012), mentre Yamaguchi et al. (2014) osservarono per alcuni colture di *Ostreopsis* sp. una crescita proporzionale con un incremento dell'intensità luminosa da 49.5 a $199 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$, ma una inibizione di essa a una esposizione di luce al di sopra di un valore soglia di $263 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$. I pochi dati a disposizione su tale relazione in condizioni di campo evidenziano, invece, delle discrepanze con i risultati sperimentali descritti sopra. In particolare, in base ad uno

studio eseguito lungo diverse aree costiere italiane interessate da fioriture di *Ostreopsis*, si è notato alle profondità alle quali la microalga è stata campionata dei valori di intensità luminosa molto alti, $1800 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ (ISPRA, 2012). In ogni caso, sono necessari ulteriori studi per chiarire il reale ruolo dell'intensità luminosa nelle dinamiche del bloom di *Ostreopsis* (Accoroni & Totti, 2016).

Nutrienti

La relazione esistente tra incremento della frequenza degli Harmful Algal Blooms negli ultimi decenni e l'aumento dell'eutrofizzazione delle aree marine costiere, dovuta all'intensificazione delle attività antropogeniche risulta ormai chiara. Considerando l'influenza di azoto e fosforo sulla crescita *O. cf. ovata* nella Riviera del Conero che viene considerata un'area fortemente P limitata, in seguito ai campionamenti eseguiti negli ultimi decenni, si è visto che l'area interessata dalle fioriture estive di *Ostreopsis*, all'inizio della fioritura presentava delle concentrazioni di PO_4 significativamente più alte rispetto al resto del periodo di studio, mentre il periodo seguente era caratterizzato da un elevato rapporto N:P: di conseguenza, era molto probabile che l'inizio della fioritura fosse innescato da un rapporto N:P basso (probabilmente stimolato da un input

di nutrienti fosfati o materiale organico) che permetterebbe alle cellule appena germinate di aumentare il tasso di crescita. Il consumo di fosforo da parte di queste dinoflagellate risulta essere più rapido proporzionalmente rispetto a quello dell'azoto, sottolineando la forte richiesta di fosforo di *O. cf. ovata*: questo provoca un aumento del rapporto N:P con l'aumentare dell'abbondanza algale (Vanucci et al., 2012b; Pezolesi et al., 2014). In seguito ad uno successivo studio condotto nel 2015, la capacità di *O. cf. ovata* di utilizzare anche P organico per far fronte alla limitazione di P in questa area è stata evidenziata dall'analisi dell'attività delle fosfatasi (fosfomonoesterasi e fosfodiesterasi) della comunità microepifitica dominata da *O. cf. ovata*. Queste hanno mostrato elevati valori di attività che, assieme all'elevata quantità di DOP (Dissolved Organic Phosphorous) registrato in ambiente, hanno dimostrato la capacità di questa dinoflagellata di sfruttare rapidamente un ampio range di fonti di fosforo organico (Accoroni et al., 2017).

Accumulo di composti palitossino-simili nei prodotti ittici durante le fioriture di *Ostreopsis*

Una delle possibili vie di trasmissione dei composti PITX-simili verso gli esseri umani è il consumo di prodotti ittici contaminati. Esistono diversi studi in letteratura scientifica che riportano la presenza di PITX e composti PITX-simili in organismi marini edibili, valutati con metodi differenti come test biologici (test emolitico, biotest sui ratti) e chimici (LC-MS, Liquid chromatography and mass spectrometry).

In Mar Mediterraneo ad oggi non ci sono segnalazioni di intossicazioni da ingestione di frutti di mare contaminati, mentre altri casi sospetti ma non del tutto confermati sono stati registrati in altre aree dove vivono altre specie tossiche di *Ostreopsis*; a tal riguardo, alcune specie del genere *Ostreopsis* sono sospettate di essere la fonte di tossine responsabili di un'intossicazione umana mortale nota come clupeotossismo (e.g., Onuma et al., 1999; Randall, 2005).

Il clupeotossismo è una delle intossicazioni umane dovute al consumo di clupeiformi (sardine, aringhe e acciughe) contaminati. La sintomatologia è simile a quella della ciguatera (Yasumoto et al., 1986), sebbene il clupeotossismo abbia un tasso di mortalità più alta (Onuma et al., 1999).

Diverse segnalazioni di questa intossicazione sono state riportate nelle aree insulari tropicali del Pacifico e dei Caraibi negli ultimi 30 anni (Yasumoto et al., 1986; Fukui et al., 1987; Gleibs et al., 1995). Recentemente, il clupeatossismo è comparso nell'Oceano Indiano sudoccidentale, principalmente in Madagascar dove le composti palitossino-simili sono state coinvolte in fatalità verificatesi dopo il consumo di pesci del genere *Sardinella* (Yasumoto 1998; Hansen et al., 2001).

Le fioriture di *Ostreopsis* hanno un chiaro effetto sulla fauna bentonica. Questo è stato osservato per la prima volta nelle acque del Tirreno nell'estate del 1998, 2000 e 2001, quando i ricci di mare e stelle marine hanno mostrato, rispettivamente, una perdita di spine e un'anomala posizione dei bracci (Sansoni et al., 2003). Il primo caso registrato di contaminazione di molluschi bivalvi da PITX dovute alla presenza di specie di *Ostreopsis* si è verificato nelle acque marine costiere greche nel periodo tra il 2004 e il 2006 (Aligizaki et al., 2008) mentre eventi di mortalità di massa di ricci di mare ed altri invertebrati sono stati osservati lungo le coste brasiliane (Ferreira, 2006) e lungo le coste della Nuova Zelanda (Shears & Ross, 2009).

Esperimenti di laboratorio hanno mostrato come *O. cf. ovata* sia dannosa per gli stadi larvali di pesci e invertebrati (Simonini *et al.*, 2011; Faimali *et al.*, 2012), con una riduzione della fertilità dello sperma (Pagliara & Caroppo, 2012) e una crescita anomala degli embrioni prodotti dalla fertilizzazione dei ricci di mare raccolti durante le fioriture (Migliaccio *et al.*, 2016; Neves *et al.*, 2018) e nelle larve di meduse (Giussani *et al.*, 2016). A concentrazioni superiori a 1.5 nM, la palitossina era altamente citotossica per i mitili (Louzao *et al.*, 2010) causando una forte diminuzione dei tassi metabolici nel mantello e nelle cellule pancreatiche. In aggiunta, la palitossina aumenta la percentuale degli immunociti fagocitizzanti nei mitili (Malagoli *et al.*, 2008). La suscettibilità dei mitili verso *Ostreopsis* è stata mostrata nell'inibizione della Na⁺/K⁺ ATPasi e nell'alterazione delle attività enzimatiche di glutazione perossidasi, catalasi, glutazione reduttasi (Gorbi *et al.*, 2012, 2013), così come nei segnali immunologici, tra cui una riduzione del numero di granulociti e della loro attività di fagocitosi (Gorbi *et al.*, 2013). Infatti, mitili apparentemente sani esposti a queste microalghe tossiche attivano una risposta infiammatoria, principalmente caratterizzata da aggregati di emociti e danni sui tubuli digestivi che potrebbero prevenire una piena alimentazione e l'assimilazione del cibo (Carella *et al.*, 2015). Altri studi

condotti in laboratorio hanno mostrato l'insorgenza di danni a livello tissutale nei mitili esposti a colture cellulari di *O. cf. ovata* innescando lo sviluppo di meccanismi di detossificazione che durano più di due settimane. I ricci di mare, alimentati con l'alga rossa *Asparagopsis taxiformis*, epifittizzata da *O. cf. ovata*, hanno mostrato, invece, l'insorgenza di anomalie morfologiche come la perdita di spine (Sardo et al., 2021).

Gli impatti osservati delle fioriture di *Ostreopsis* spp. sugli invertebrati marini suggerirebbero probabilità molto basse che questi animali accumulino tossine e le trasferiscano verso gli alti livelli trofici e gli esseri umani. Tuttavia, le molecole palitossino-simili sono state rilevate in diversi organismi marini, come pesci, granchi, mitili, anemoni di mare e ricci marini, senza mostrare comunque segni di danni (Briggs et al., 1998; Gleibs & Mebs, 1999; Pearce et al., 2001). Nel mar Mediterraneo composti palitossino-simili sono stati trovati in stelle marine apparentemente sane campionate nel mar Egeo settentrionale, lungo le coste francesi e nel golfo di Napoli in concentrazioni superiori a $97 \mu\text{m kg}^{-1}$ (Aligizaki et al., 2008), $450 \mu\text{m kg}^{-1}$ (Amzil et al., 2021) e $600 \mu\text{m Kg}^{-1}$ (EF et PC, dati non pubblicati), rispettivamente.

Analisi di laboratorio condotte in Francia, nella baia di Morgiret (Marsiglia), durante le fioriture di *O. cf. ovata* lungo le coste mediterranee

per tre anni dall'estate 2007 al 2009, evidenziarono un contenuto totale di palitossine di 450 μg PLTX eq kg^{-1} peso fresco (estate 2008) negli echinodermi, mentre nei mitili la massima quantità riscontrata è stata di 230 μg eq PLTX kg^{-1} (estate 2009) mentre nei ricci erano presenti concentrazioni superiori (360 μg eq PLTX kg^{-1} (Amzil et al., 2012). In seguito a dei campionamenti condotti tra giugno e settembre del 2009, a Nizza e Villefranche-sur-Mer, è stata evidenziata l'esistenza di una probabile correlazione tra i livelli di contaminazione dei diversi animali e la loro modalità alimentare, con i livelli più alti trovati nelle specie erbivore o onnivore rispetto a quelle carnivore, come *Patella* spp., *Paracentrotus lividus*, *Sarpa salpa* e *Mugil cephalus*: questo può essere spiegato dal comportamento di grazing di queste specie che si nutrono di macroalghe epifitate da *Ostreopsis* spp. (Birè et al., 2013). Anche in studi eseguiti successivamente nell'estate del 2010, si evidenziò la presenza di composti PLTX analoghi in 31 specie di pesci, echinodermi, gasteropodi, cefalopodi e spugne campionati nella baia di Villefranche-sur-Mer. In tale caso, si notò come si erano accumulate quasi esclusivamente nel tubo digestivo delle specie testate, con l'eccezione dei cefalopodi del genere *Octopus*, in cui erano presenti anche negli altri tessuti (Birè et al. 2015).

In Brasile sono stati eseguiti esperimenti di *transplantation* con *Mytilus galloprovincialis*: banchi di questi mitili sono stati trasferiti da un'area di controllo, in corrispondenza dell'isola di Galheta, non interessata da fioriture di *Ostreopsis* spp., in un'altra area influenzata dallo sviluppo del bloom, ovvero l'arcipelago di Currhais. Dall'analisi del contenuto di tossine si è notato che i mitili erano già contaminati prima dell'esperimento, contenendo una media di $22.3 \mu\text{g kg}^{-1}$ PLTX, ma, dopo 24 ore dall'inizio dell'esposizione, le concentrazioni delle tossine raggiungevano circa $130 \mu\text{g kg}^{-1}$ nei mitili trapiantati (Tibiriçá et al., 2019).

Dai dati di letteratura sopra esposti, nonostante l'assenza di intossicazioni umane certificate legate al consumo di prodotti ittici contaminati, si evince che la possibilità che queste tossine vengano ingerite dall'uomo è comunque molto alta. Tuttavia, la comunità europea non ha ancora stabilito dei valori di PLTX al di sopra delle quali i prodotti ittici contaminati non possono venire commercializzati come avviene per le altre tossine microalgali legate ad esempio alla DSP o PSP. A tal proposito, l'Autorità europea per la sicurezza alimentare (EFSA), per ridurre il rischio di intossicazione a seguito di ingestione di cibi contaminati, ha stabilito una concentrazione massima di palitossine e suoi analoghi nei prodotti ittici: assumendo un consumo di 400 grammi di prodotto, il limite

massimo, protettivo per la salute dei consumatori, è di 30 µg/kg di parte edibile (EFSA, 2009).

Scopo della tesi

Lo scopo di questa tesi è stato quello di studiare l'accumulo di composti palitossino-simili in un banco naturale di mitili durante una fioritura di *Ostreopsis cf. ovata* avvenuta durante l'estate del 2021 in un'area considerata hot-spot per le fioriture di questa dinoflagellata tossica, i.e. la Riviera del Conero (N Adriatico). I risultati di questo studio aiuteranno a meglio definire il pericolo legato al consumo di mitili contaminati durante questi fenomeni.

MATERIALI E METODI

Area di studio

Lo studio è stato eseguito lungo la Riviera del Conero, a sud-est del porto di Ancona, nella località del Passetto (Fig. 2).



Figura 2. Area di studio

La Riviera del Conero è caratterizzata da una costa rocciosa e frastagliata, diversamente dalla maggior parte del litorale adriatico che, invece, è basso e lineare. La stazione di campionamento è caratterizzata dalla presenza di

scogliere naturali, che riducono fortemente l'idrodinamismo, un fondale alto e roccioso e una profondità media di circa 1 metro (Fig. 3).



Figura 3. Stazione di campionamento

La zona del Passetto è influenzata da un moderato impatto antropico in particolare, durante la stagione estiva per la presenza di grotte utilizzate, spesso, dai bagnanti a scopo ricreativo.

Campionamento

I campionamenti si sono svolti dal 21 maggio al 28 ottobre 2021. Inizialmente sono stati condotti con una frequenza mensile poi, a partire dal mese di agosto, mese in cui solitamente inizia la fioritura, si è

proseguito con una frequenza di 6-10 giorni fino al termine del bloom di *Ostreopsis cf. ovata*.

I parametri di temperatura e salinità sono stati misurati tramite la multisonda YSI 30 Salinity, Conductivity, Temperature. A ogni giorno di campionamento, prima di prelevare i campioni, il protocollo prevedeva la registrazione delle condizioni meteo e l'altezza del moto ondoso corrispondente a un determinato stato del mare attraverso l'utilizzo della scala Douglas (Tab. 1):

Tabella 1. Scala Douglas; questa scala determina la condizione dello stato del mare in base all'altezza media delle onde.

Scala Douglas	Altezza media delle onde	Stato del mare
0	-	Calmo
1	0-0.10 m	Quasi calmo
2	0.10-0.50 m	Poco mosso
3	0.50-1.25 m	Mosso
4	1.25-2.50 m	Molto mosso
5	2.50-4 m	Agitato
6	4-6 m	Molto agitato

7	6-9 m	Grosso
8	9-14 m	Molto grosso
9	> 14 m	Tempestoso

I campioni per le analisi dei nutrienti (3 repliche) sono stati raccolti in superficie. L'acqua di mare veniva prelevata e filtrata mediante una siringa (volume 60 ml) associata a un apparato di filtrazione con un filtro di nitrocellulosa GF/F Whatman (25 mm, nominal pore size 0.7 μm) e raccolta in provette di propilene conservate in congelatore a -20 °C per evitare la degradazione dei nutrienti.

I campioni per l'analisi di *O. cf. ovata* nel plancton sono stati raccolti in superficie tramite una bottiglia di propilene di 500 ml quindi fissati con formalina allo 0.8%.

I campioni per l'analisi di *O. cf. ovata* sui substrati bentonici sono stati prelevati in 3 repliche una stessa specie di macroalga. Ciascuna replica è stata prelevata manualmente avvolgendola con dei sacchetti di plastica e staccandole direttamente dal substrato. Il materiale prelevato, costituito dall'alga e dal volume d'acqua circostante, è stata poi conservata in un barattolo di propilene. L'identificazione delle macroalghe è avvenuta sulla

base di caratteri morfologici che le contraddistinguono. Nei primi due campionamenti è stata raccolta *Dictyota dichotoma*, dal 21 luglio al 10 agosto è stata campionata *Hypnea musciformis*, dal 19 agosto al 16 settembre *Chondria* sp., il 23 settembre *Dyctiopteris polypodioides* e, infine, dal 29 settembre al 28 ottobre nuovamente *Chondria* spp.

Separazione della comunità epifitica dalle macroalghe

Ogni barattolo è stato agitato energeticamente per un certo intervallo di tempo per favorire il distacco delle cellule della comunità epifitica dal tallo della macroalga; in seguito il tallo è stato estratto con una pinza e riposto in una vaschetta, mentre in un'altra è stata versata l'acqua di raccolta della macroalga. Successivamente il tallo è stato riposizionato all'interno del barattolo con dell'acqua di mare filtrata (FSW) e l'intera operazione è stata ripetuta per tre volte per risciacquare e assicurare una completa separazione delle cellule epifite dal tallo. Al termine della procedura di distacco, il volume totale ottenuto, dato dall'acqua di raccolta del campione e dall'acqua di risciacquo è stato fissato con formalina allo 0.8%, fondamentale per conservare le cellule evitando la degradazione. I

campioni sono stati poi conservati a 4 °C al buio prima dell'osservazione al microscopio.

Determinazione del peso umido, peso secco e superficie delle macroalghe

I talli delle alghe campionate sono stati asciugati delicatamente con carta assorbente e pesati con una bilancia BL 602 per ottenere il peso umido (g fw); in seguito, dopo essere stati messi in una stufa a 160°C per 24 h, è stato misurato anche il peso secco (g dw). La superficie del tallo è stata calcolata mediante un fattore di conversione tra peso e superficie, specifico per ogni specie macroalgale (Accoroni et al., 2011). Il valore di quest'ultimo è stato ottenuto precedentemente determinando la superficie dei talli con l'ausilio di uno scanner e di un software di grafica. La misura è stata moltiplicata per due considerando che il tallo viene epifitato su entrambi i lati. Il peso umido, il peso secco e la superficie delle macroalghe saranno poi utilizzati per il calcolo delle abbondanze di *O. cf. ovata*.

Analisi delle cellule di *Ostreopsis* spp. al microscopio

L'identificazione di *Ostreopsis* cf. *ovata*, e delle altre specie di microalghe tossiche che si trovano generalmente associate ad essa, *Coolia*, *Procentrum*, *Amphidinium*, è avvenuta tramite l'utilizzo di un microscopio rovesciato, Zeiss Axiovert AX25 o AX135, munito di contrasto di fase, utilizzando un ingrandimento di 20x, secondo il metodo Utermhol (1958).

Il campione è stato agitato circa cento volte per renderlo omogeneo e favorire la risospensione delle cellule e l'omogeneizzazione del subcampione che verrà prelevato. Un determinato volume di campione è stato versato all'interno di un cilindro posto sopra un vetrino costituito da una camera circolare interna: è stato utilizzato un cilindro 10 ml per la sedimentazione del campione bentonico e un cilindro 40 ml per il plancton, corrispondenti a un volume effettivo, rispettivamente, di 10,2 ml e 39,6 ml. Il cilindro è stato chiuso superiormente da un vetrino per evitare la perdita dell'acqua durante la sedimentazione delle cellule sul fondo della camera. La sedimentazione delle cellule sospese in acqua nel cilindro richiede almeno un'ora per ogni millilitro di volume sedimentato. Al termine del periodo necessario per la sedimentazione è stata preparata la camera per la conta cellulare facendo scorrere il cilindro su una piastra

posta adiacente alla camera e coprendo quest'ultima con un vetrino coprioggetto.

La determinazione delle abbondanze cellulari è stata realizzata attraverso il conteggio delle cellule su un'area nota della camera (intera camera, transetto, o 10-30 campi casuali. I risultati sono stati infine espressi in cellule per g di peso umido, peso secco e superficie del tallo. Oltre alle abbondanze medie sulle macroalghe, è stata calcolata anche l'abbondanza nella comunità planctonica, considerando, in questo caso, il volume del campione d'acqua, il volume effettivo sedimentato, il numero di cellule contate nella camera, il coefficiente del microscopio e il numero dei campi contati.

Campionamento dei mitili

Campioni di mitili prelevati dai banchi naturali sono stati prelevati dal 3 agosto al 20 ottobre, i.e. durante tutta la fioritura di *O. cf. ovata* nella stazione del Passetto. Campioni ulteriori sono stati prelevati tra il 20 e il 27 settembre in altre due stazioni lungo la Riviera del Conero (i.e. Portonovo e Sirolo) per valutare la distribuzione spaziale della contaminazione di PITX nei mitili. L'analisi delle tossine è stata svolta

dall'Istituto Zooprofilattico Sperimentale Umbria e Marche (IZSUM). I campioni sono stati analizzati in LC-MS/MS.

Analisi statistiche

Le analisi statistiche sono state effettuate tramite il software Microsoft Excel. È stata costruita una matrice di correlazione con le abbondanze di *O. cf. ovata* nei due substrati analizzati (macroalghe e colonna d'acqua), con i parametri ambientali di temperatura, salinità e moto ondoso, e l'accumulo di OVTX-a nei mitili.

RISULTATI

Parametri ambientali

La temperatura variava da un minimo di 16.2 °C il 28 ottobre a un massimo di 26.5 °C il 19 agosto (Fig. 4). Durante la stagione estiva sono stati registrati valori superiori a 25 °C poi, da metà settembre è stato osservato un decremento fino al raggiungimento di valori minimi. Per quanto riguarda la salinità, si sono registrati dei valori superiori a 35 fino al 19 agosto, in corrispondenza del quale si è raggiunto un picco di 36.4, seguito da una netta diminuzione a 33.8 il 26 agosto, una successiva fase di fluttuazione tra i 34 e i 35 nel mese di settembre, fino a un calo a 30.7 verso

fine ottobre (Fig. 5). Infine, analizzando la condizione del moto ondoso, si evince come il mare sia stato calmo o poco mosso per tutta la durata del periodo di studio, mantenendosi su valori bassi della scala Douglas, ad eccezione di un'alta mareggiata che si è verificata il 15 ottobre (Fig. 6). Non sono state riscontrate correlazioni significative tra i parametri ambientali analizzati (temperatura e salinità) e le abbondanze di *O. cf. ovata*.

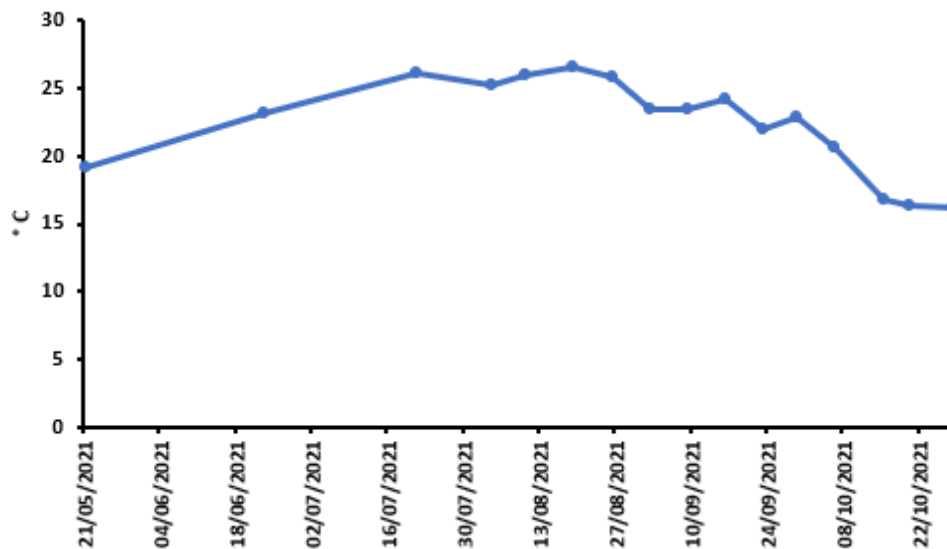


Fig. 3 Andamento temporale della temperatura ($^{\circ}$ C) dell'acqua nel sito del Passetto

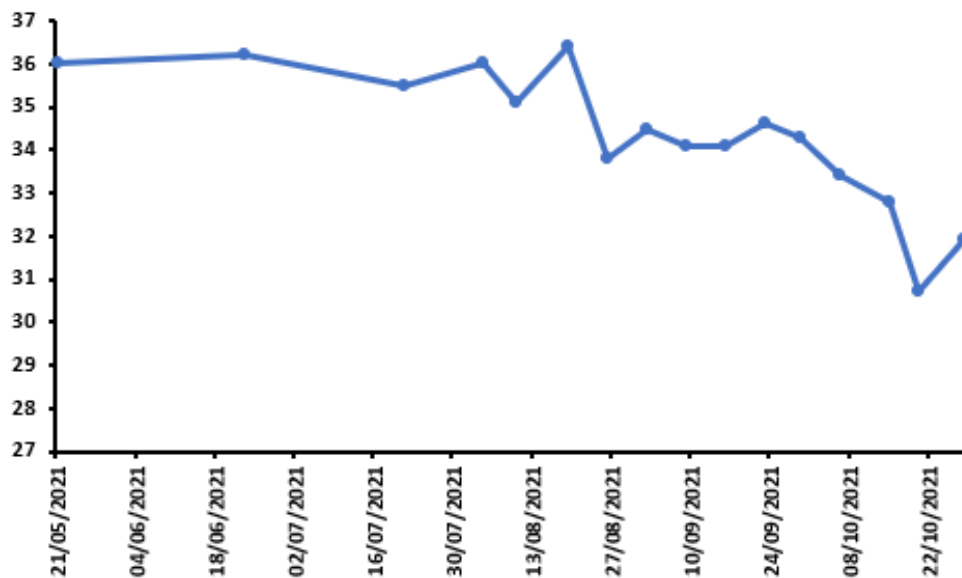


Fig. 4 Andamento temporale della salinità

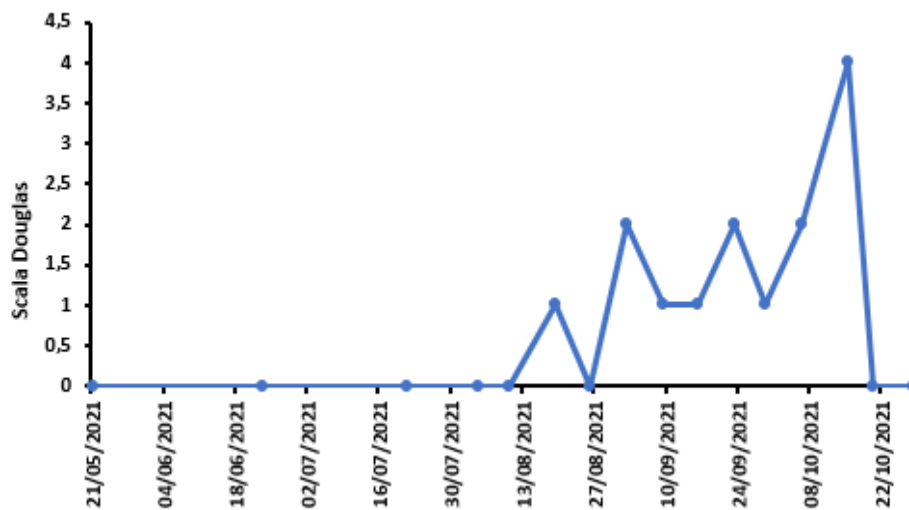


Fig. 6. Andamento temporale del moto ondoso (secondo la scala Douglas) nel sito del Passetto

Ostreopsis cf. ovata

La fioritura di *Ostreopsis cf. ovata* nell'area di studio è iniziata nella seconda metà di agosto quando sono state rilevate le prime cellule sulle macroalghe. La massima proliferazione è stata raggiunta intorno alla metà di settembre, seguita poi da una progressiva diminuzione fino alla scomparsa definitiva registrata il 28 ottobre. Durante la fase di massima fioritura tutti i substrati bentonici (macroalghe, rocce, etc.) erano ricoperti da una mat mucillaginosa di colore brunastro; questa veniva risospesa dall'azione del moto ondoso, contribuendo a rendere lo strato superficiale dell'acqua torbido. Questo rivestimento diminuiva progressivamente con la discesa della curva di abbondanza algale fino a scomparire completamente con l'arrivo di mareggiate avvenuta il giorno 15 ottobre come indicato dal grafico delle condizioni del mare (fig. 6).

Nei tre grafici seguenti (Fig. 7) sono mostrati gli andamenti temporali delle abbondanze medie di *O. cf. ovata* sulle macroalghe, rispettivamente su peso umido (g fw), peso secco (g dw) e superficie del tallo (cell. cm⁻²). Le prime cellule sono state rilevate il 19 agosto con valori di abbondanza media di 15 ± 5.9 cell. g⁻¹ fw, 122 ± 67 cell. g⁻¹ dw e 1 ± 0.6 cell. cm⁻². Le

abbondanze sono rimaste relativamente basse fino al 2 settembre quando si sono rilevate $1.2 \pm 0.57 \times 10^3$ cell. g⁻¹ fw, $1.1 \pm 0.53 \times 10^4$ cell. g⁻¹ dw e 55 ± 27 cell. cm⁻². Dopodiché la fioritura è entrata in fase esponenziale fino al raggiungimento del picco della fioritura raggiunto il 16 settembre, in cui sono osservati valori di $2.4 \pm 0.94 \times 10^4$ cell. g⁻¹ fw, $1.9 \pm 0.88 \times 10^5$ cell. g⁻¹ dw e $9.6 \pm 4.4 \times 10^2$ cell. cm⁻² (fig.7). Superata questa data, si è andati incontro a una progressiva decrescita con una registrazione di $2.1 \pm 0.16 \times 10^3$ cell. g⁻¹ fw, $1.5 \pm 0.15 \times 10^4$ cell. g⁻¹ dw e 76 ± 7.8 cell. cm⁻² il 29 settembre, un debole innalzamento registrato il 6 ottobre con $3.1 \pm 0.13 \times 10^3$ cell. g⁻¹ fw, $2.0 \pm 0.74 \times 10^4$ cell. g⁻¹ dw, $1.0 \pm 0.37 \times 10^2$ cell. cm⁻² e, infine, un calo definitivo fino all'assenza di cellule confermato il 28 ottobre (fig.7).

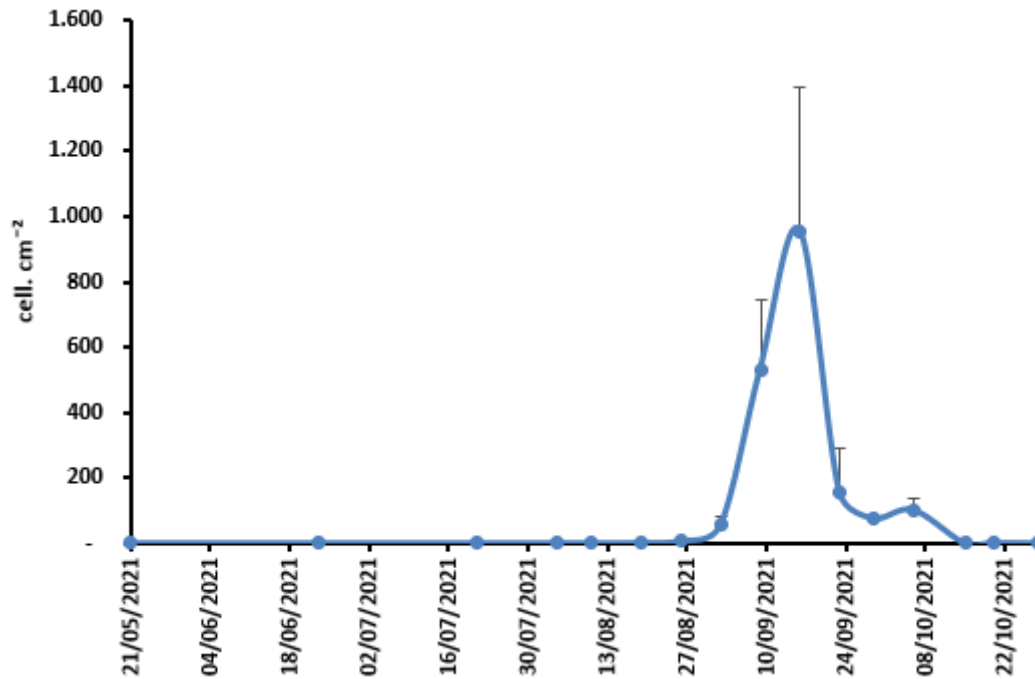


Figura 7. Abbondanze medie di *Ostreopsis cf. ovata* sulle macroalghe espresse in cellule su superficie di tallo (cell. cm⁻²).

La Fig. 8 mostra l'andamento temporale di *O. cf. ovata* in colonna d'acqua. La presenza delle cellule nella comunità planctonica non coincide con l'inizio della fioritura registrata sulle macroalghe il 19 agosto ma, in questo caso, le prime cellule sono state registrate il 2 settembre con un'abbondanza pari a 1.3×10^2 cell. l⁻¹. L'andamento mostra un valore di abbondanza massima il 16 settembre di 1.3×10^4 cell. l⁻¹, seguito da una forte discesa con una densità pari a 7.8×10^2 cell. l⁻¹ analizzata il 29

settembre. Da metà ottobre *O. cf. ovata* non è stata più rilevata in colonna d'acqua.

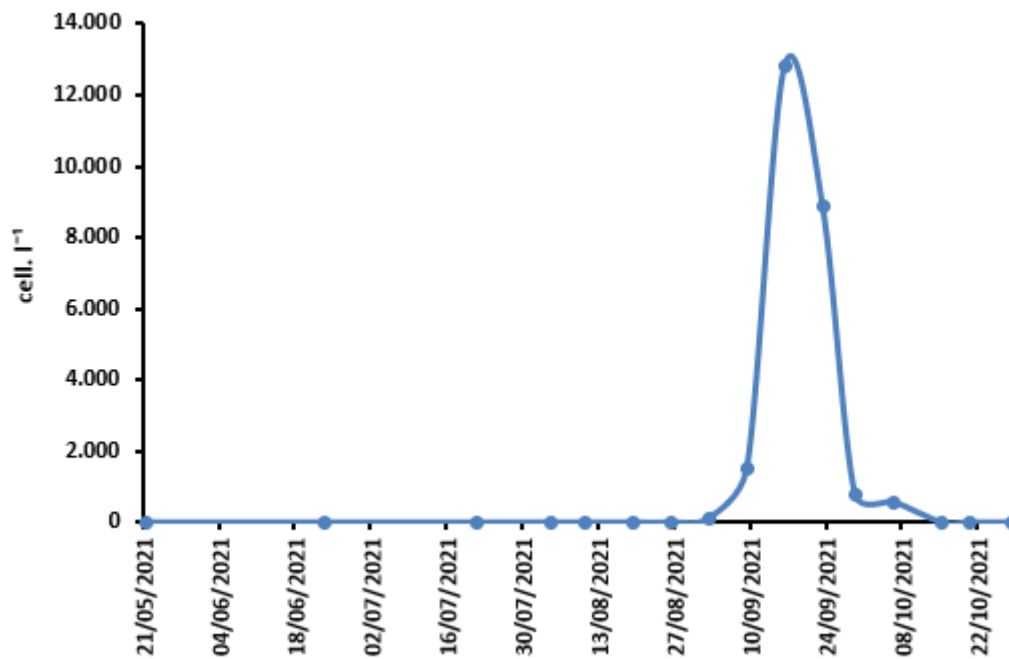


Figura 8. Andamento temporale dell'abbondanza di *O. cf. ovata* in colonna d'acqua (cell. l⁻¹).

Le abbondanze di *O. cf. ovata* in colonna d'acqua mostravano una correlazione positiva con le abbondanze registrate sulle macroalghe ($r^2=0.8114$, 0.7631 e 0.6405 , rispettivamente per peso umido, secco e superficie dei talli).

Accumulo di composti palitossino-simili nei mitili

L'analisi delle tossine nei mitili prelevati nell'aria di studio ha mostrato la sola presenza dell'ovatossina-a (OVTX-a). L'andamento temporale della concentrazione della tossina OVTX-a nei mitili (Fig. 9) non si sovrappone al trend della fioritura algale di *O. cf. ovata*, ma mostra un ritardo di 4-6 giorni. Fino al 14 settembre non si è registrata la presenza di questa tossina negli organismi campionati nell'area del Passetto che, invece, è stata segnalata, per la prima volta, il 20 settembre (i.e. 32 giorni dopo la comparsa di *O. cf. ovata* sulle macroalghe e 18 giorni dopo il primo record di *O. cf. ovata* in acqua) a una concentrazione pari a $15.8 \mu\text{g kg}^{-1}$, corrispondente anche al valore massimo del trend di accumulo della tossina in quell'area (Fig.11); nel giorno di campionamento di *Ostreopsis* precedente a questa giornata, 16 settembre, *O. cf. ovata* era presente a una concentrazione di $2.4 \pm 0.94 \times 10^4 \text{ cell. g}^{-1} \text{ fw}$ (corrispondente a $9.6 \pm 4.4 \times 10^2 \text{ cell. cm}^{-2}$) sulle macroalghe e a $1.3 \times 10^4 \text{ cell. l}^{-1}$ in colonna d'acqua. Nello stesso giorno è stato registrato un valore di OVTX-a nei mitili campionati nel sito di Portonovo (i.e. $36.4 \mu\text{g kg}^{-1}$) superiore a quanto osservato nel sito del Passetto. Nella data successiva di campionamento (27 settembre) le concentrazioni di OVTX-a erano significativamente

diminuite in entrambi i siti, i.e. 1.9 e 21.3 $\mu\text{g kg}^{-1}$, rispettivamente nel sito del Passetto e a Portonovo (Fig. 11); quattro giorni prima, nel sito del Passetto *O. cf. ovata* era presente a una concentrazione di $9.6 \pm 7.6 \times 10^3$ cell. g^{-1} fw (corrispondente a $1.6 \pm 1.3 \times 10^2$ cell. cm^{-2}) sulle macroalghe e a 8.9×10^3 cell. l^{-1} in colonna d'acqua. Nello stesso giorno a Sirolo, non è stata rilevata la presenza di tossine nei mitili analizzati (Fig. 11). Infine, la scomparsa definitiva delle tossine nei mitili è stata registrata il 20 ottobre, in seguito a un campionamento eseguito solamente al Passetto, quando *O. cf. ovata* non era più rilevata in acqua già da 14 giorni.

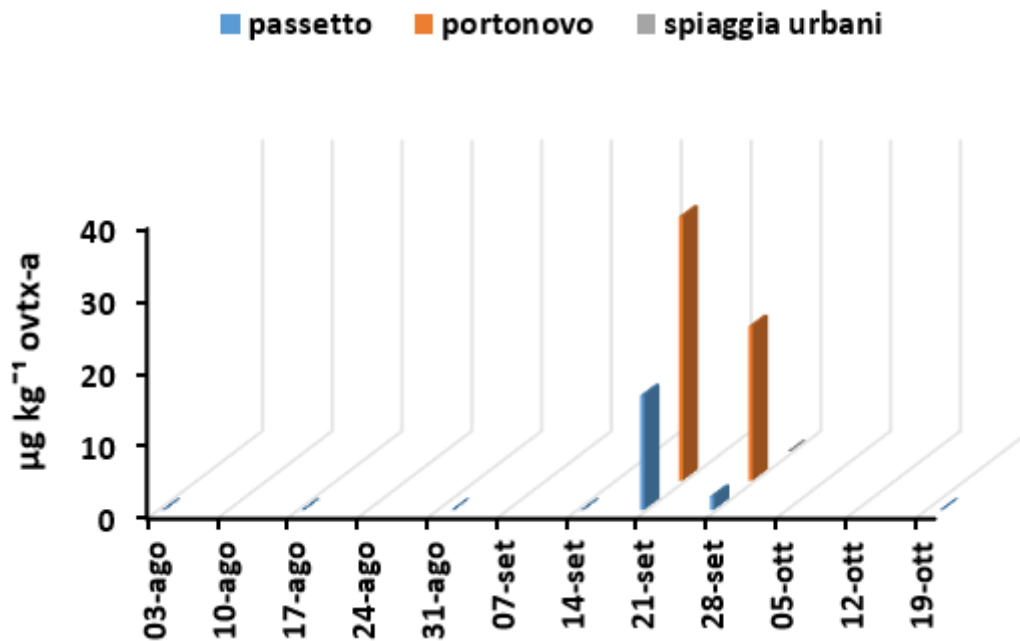


Figura 9. Andamento temporale della concentrazione della tossina OVTX-a nei mitili in tre siti di campionamento lungo la Riviera del Conero (Passetto, Portonovo, Sirolo)

Anche se le tossine nei mitili sono state rilevate solamente quando in acqua e sulle macroalghe le abbondanze superavano le 1.3×10^4 cell. l^{-1} e $2.4 \pm 0.94 \times 10^4$ cell g^{-1} fw, queste mostravano una correlazione significativa con le abbondanze di *O. cf. ovata*. In particolare, le concentrazioni di OVTX-a nei mitili mostravano una correlazione più marcata con le abbondanze di *O. cf. ovata* in colonna d'acqua ($r^2= 0.7351$) rispetto a quelle sulle macroalghe ($r^2= 0.7313$, $0,7130$ e 0.7271 , su peso umido, peso secco e superficie del tallo, rispettivamente).

Discussione

La fioritura di *O. cf. ovata* viene costantemente segnalata lungo la Riviera del Conero tra la fine della stagione estiva e l'inizio di quella autunnale (Totti et al., 2010; Accoroni et al., 2011; Accoroni et al., 2012; Accoroni et al., 2015) dall'estate del 2006, in cui venne registrata per la prima volta (Totti et al., 2007). In questo studio, oltre alle relazioni tra la fioritura e i parametri ambientali, già analizzate negli anni precedenti, è stato valutato l'accumulo delle tossine prodotte da *O. cf. ovata* nei mitili presenti nello stesso sito durante la sua fioritura. Come nei casi di studio passati, *Ostreopsis* è presente in associazione con altre dinoflagellate bentoniche, tra cui *Coolia monotis*, *Prorocentrum lima* e *Amphidinium* spp., ma le loro abbondanze non sono significativamente alte e non seguono lo stesso pattern temporale di *Ostreopsis* durante il periodo di campionamento (Totti et al., 2010).

Relazione con i parametri ambientali

La fioritura di *O. cf. ovata* del 2021 si è manifestata dalla seconda metà di agosto, ha raggiunto un picco massimo di abbondanza intorno alla terza settimana di settembre, ha subito un decremento dalla fine dello stesso mese con un secondo picco più lieve alla prima settimana di ottobre, in

seguito a un decremento delle temperature, fino alla scomparsa alla fine del mese; questo è il tipico andamento osservato ogni anno in questo sito (Accoroni et al., 2015a). L'inizio del bloom di *Ostreopsis* è stato registrato in corrispondenza di una temperatura dell'acqua di 26.5 °C, che è il massimo valore registrato durante l'intero periodo di studio. Il punto di massima proliferazione è stato raggiunto a una temperatura di 24.2 °C, mentre il secondo picco molto lieve si è verificato a una temperatura di 20.6 °C. In relazione alla variazione della temperatura durante il periodo di studio, i dati raccolti confermerebbero l'esistenza di un valore soglia necessario per stimolare la germinazione delle cisti necessario per dare inizio alla fioritura, come dimostrato da uno studio precedente (Accoroni et al., 2014). Una volta avvenuta la germinazione, la proliferazione delle cellule può proseguire anche a temperature inferiori (Accoroni et al., 2015a).

Analizzando la variazione della salinità, le prime cellule di *Ostreopsis* si sono osservate a 36.4, il valore più alto registrato durante l'intero arco dei campionamenti. La fioritura si è sviluppata intorno a valori oscillanti tra 33.8 e 34.6, seguiti da un decremento a 30.7 verso la fine della fioritura. In conclusione, risulta difficile indicare una possibile relazione tra la fioritura di *O. cf. ovata* e la salinità. In questo sito si è visto che le fioriture di

Ostreopsis possono avvenire a un range di valori di salinità molto ampio, i.e. 31.3 - 39.3 (Accoroni & Totti, 2016).

Riguardo alle condizioni idrodinamiche, l'area del Passetto, caratterizzata da una bassa profondità e dalla presenza di scogliere naturali in grado di attenuare il moto ondoso, rappresenta un sito particolarmente adatto alla proliferazione di questo tipo di dinoflagellata tossica. Lo stato del moto ondoso, ovviamente, è influenzato dalle condizioni meteo marine che svolgono un ruolo chiave nello sviluppo del bloom, perché condizioni di mare calmo sono favorevoli per il proseguimento della fioritura, mentre le mareggiate causano una forte diminuzione, o anche la scomparsa, dell'abbondanza di *Ostreopsis* su substrati bentonici, dovuta alla risospensione delle cellule in colonna d'acqua e la successiva diluizione in mare aperto. Questo si è verificato quest'anno intono alla metà di ottobre, confermando quanto osservato gli anni precedenti (Totti et al., 2010; Accoroni et al., 2015 a).

L'andamento della fioritura di *Ostreopsis* sul substrato bentonico presenta una distribuzione bimodale, i.e. caratterizzato dalla presenza di un primo picco di abbondanze registrato il 16 settembre (corrispondente al massimo registrato durante tutta la fioritura), e un secondo picco, seppur molto più debole, verificatosi tre settimane dopo. L'esistenza di questo

secondo incremento è stata osservata anche negli anni passati, ma non è stata ancora trovata nessuna chiara relazione con i parametri ambientali tale da spiegare questo evento. Tuttavia molto spesso, e anche in questo caso, tra questi due picchi vengono registrate condizioni idrodinamiche elevate che potrebbero spiegare questo fenomeno: il moto ondoso elevato potrebbe “spezzare” in due una fioritura che altrimenti avrebbe un andamento unimodale, tipica di una curva di crescita in condizioni controllate; il moto ondoso risospingerebbe le cellule bentoniche in acqua, abbassando le abbondanze sul fondo che subiranno un incremento una volta cessato il periodo di idrodinamismo elevato, generando il tipico secondo picco.

Altri fattori influenzano sicuramente le abbondanze sulle macroalghe. Ad esempio, il 23 settembre è stata campionata, per stimare le abbondanze di *Ostreopsis*, un'alga bruna, *Dyctiopteris polyploides*, la quale presenta un tallo meno ramificato rispetto alle alghe rosse *Chondria* spp. e *Hypnea musciformis* campionate per tutto il periodo della fioritura. Questo potrebbe spiegare il debole abbassamento delle abbondanze rispetto al giorno di campionamento precedente, nonostante le condizioni idrodinamiche ancora ottimali: è già stato dimostrato che la crescita di questa microalga tossica avviene preferibilmente su macrofite

caratterizzate da talli più ramificati, maggiormente adatti alla crescita di *Ostreopsis* (Vila et al., 2001) e con una maggiore resistenza all'azione del moto ondoso (Totti et al., 2010); inoltre, le alghe brune sono note per scoraggiare la crescita di *Ostreopsis*, a confronto della alghe verdi e rosse (Accoroni et al., 2015b).

O. cf. ovata è una specie bentonica e la sua presenza in colonna d'acqua si può osservare in periodi in cui si hanno alti valori di abbondanza sui substrati, come dimostrato dalla significativa correlazione positiva trovata tra le abbondanze registrate sulle macroalghe e quelle in colonna. Ovviamente anche l'idrodinamismo svolge un ruolo fondamentale nella regolazione delle cellule sul fondale marino e in quelle in colonna d'acqua, per colpa della risospensione.

Accumulo di composti palitossino-simili nei mitili

Le tossine prodotte da specie del genere *Ostreopsis* spp. possono contaminare i prodotti ittici al punto che *Ostreopsis* è sospettata di essere la causa di diversi eventi di intossicazione di clupeotossismo (Onuma et al., 1999, Randall, 2005). Nel mar Mediterraneo il primo caso di contaminazione di organismi marini è stato pubblicato da Aligizaki et al. (2008) in Grecia, in cui venne notata una corrispondenza tra le

concentrazioni di palitossina putativa (p-PITX) nei molluschi e i picchi stagionali di *Ostreopsis* durante la stagione estiva e autunnale tra il 2004 e il 2006.

In questo studio è stato analizzato l'accumulo di composti PITX-simili nei mitili durante la fioritura di *O. cf. ovata*. Innanzitutto, l'unico composto PITX-simile rilevato nei mitili è stata la OVTX-a, che è la principale tossina prodotta proprio da *O. cf. ovata* in questa area (Tartaglione et al., 2017). Nella parte iniziale del bloom la tossina nei mitili non era presente, ma veniva rilevata solo circa 4 settimane dopo la comparsa delle prime cellule. L'andamento temporale della concentrazione della tossina nei mitili presenta una distribuzione unimodale, con una concentrazione massima di 15.8 µg di OVTX-a kg⁻¹ rilevata il 20 settembre, i.e. con un piccolo ritardo temporale rispetto al picco della fioritura registrato il 16 settembre. L'assenza di tossine nei mitili durante le prime settimane della fioritura (fine agosto/inizio settembre) potrebbe dipendere da una bassa quantità di tossina OVTX-a presente in acqua dovuta principalmente da una bassa concentrazione cellulare non sufficiente per essere assimilata e accumulata dai mitili. Inoltre, l'accumulo necessita dei suoi tempi e quindi irragionevole aspettarsi una correlazione significativa tra le abbondanze di *Ostreopsis* e le concentrazioni delle loro tossine nei mitili in tempo reale.

Difatti un'elevata correlazione è stata osservata solo considerando un delay di 4-6 giorni tra le abbondanze di *Ostreopsis* e le concentrazioni di OVTX-a nei tessuti dei mitili; una volta raggiunto il picco della fioritura, 4 giorni dopo si è osservato il primo valore positivo di OVTX-a nei mitili, corrispondente al massimo mai rilevato durante il periodo di studio. Dopo il picco, la fioritura ha avuto un netto decremento che si è registrato anche nei valori di tossina accumulati nei mitili: 1.9 µg di OVTX-a kg⁻¹. Infine, le tossine accumulate nei mitili risultano completamente assenti alla fine di ottobre quando, ormai, *Ostreopsis cf. ovata* non veniva più registrata in acqua e sulle macrofite.

La fioritura di *Ostreopsis* è un fenomeno che interessa soprattutto il dominio bentonico e le cellule rinvenute in colonna d'acqua derivano principalmente dalla risospensione di quelle presenti sul fondale. Tuttavia, essendo i mitili dei filtratori, le concentrazioni di OVTX-a nei loro tessuti erano maggiormente correlate con le abbondanze di *Ostreopsis* in colonna d'acqua era rispetto a quelle sui substrati bentonici, dimostrando che sono le cellule in colonna d'acqua ad influenzare maggiormente i tassi di accumulo delle tossine di *Ostreopsis* nei mitili.

Il sito del Passetto è considerato un sito hot-spot per le fioriture di *Ostreopsis* lungo la Riviera del Conero, rispetto ad esempio a quello di

Portonovo, dove le fioriture mostrano un andamento simile ma con abbondanze generalmente più basse sui substrati bentonici (Totti et al., 2010; Accoroni et al., 2011). Nonostante questo, nel sito di Portonovo (dove le abbondanze di *Ostreopsis* sono state monitorate dall'ARPAM che ha mostrato anche quest'anno concentrazioni inferiori rispetto al sito del Passetto, <https://www.arpa.marche.it/balneazione-nuovo/ostreopsis-cf-ovata>) i mitili dei banchi naturali lì presenti hanno mostrato una concentrazione massima di OVTX-a pari a $36.4 \mu\text{g kg}^{-1}$, i.e. valore superiore al limite massimo stabilito dall'Autorità europea per la sicurezza alimentare (EFSA), corrispondente a $30 \mu\text{g kg}^{-1}$ di PITX-simile, di parte edibile di prodotti ittici contaminati.

Questo dimostra che oltre ai valori di abbondanza di *Ostreopsis* in colonna d'acqua e sul fondale, altri fattori influenzano fortemente la capacità di accumulo di queste tossine negli organismi filtratori (ad esempio, l'abbondanza relativa delle alghe tossiche, la temperatura e l'idrodinamismo che influenzano i tassi di filtrazione e di detossificazione degli organismi filtratore, etc.) i quali meritano di essere meglio studiati per poter meglio identificare il rischio di intossicazione umana legato al consumo di prodotti ittici contaminati da tossine prodotte durante questo fenomeno molto esteso lungo tutte le coste del Mediterraneo.

Bibliografia

Accoroni, S. & Totti, C. (2016). The toxic benthic dinoflagellates of the genus *Ostreopsis* in temperate areas: A review. *Advances in Oceanography and Limnology*, 7(1), 1–15. <https://doi.org/10.4081/aiol.2016.5591>

Accoroni, S., Glibert, P. M., Pichierri, S., Romagnoli, T., Marini, M. & Totti, C. (2015). A conceptual model of annual *Ostreopsis* cf. *ovata* blooms in the northern Adriatic Sea based on the synergic effects of hydrodynamics, temperature, and the N:P ratio of water column nutrients. *Harmful Algae*, 45, 14–25. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2015.04.002>

Accoroni, S., Percopo, I., Cerino, F., Romagnoli, T., Pichierri, S., Perrone, C. & Totti, C. (2015). Allelopathic interactions between the HAB dinoflagellate *Ostreopsis* cf. *ovata* and macroalgae. *Harmful Algae*, 49, 147–155. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2015.08.007>

Accoroni, S., Romagnoli, T., Colombo, F., Pennesi, C., di Camillo, C. G., Marini, M., Battocchi, C., Ciminiello, P., Dell'Aversano, C., Dello Iacovo, E., Fattorusso, E., Tartaglione, L., Penna, A. & Totti, C. (2011). *Ostreopsis* cf. *ovata* bloom in the northern Adriatic Sea during summer 2009: Ecology, molecular characterization and toxin profile. *Marine Pollution Bulletin*, 62(11), 2512–2519. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2011.08.003>

Accoroni, S., Romagnoli, T., Pichierri, S. & Totti, C. (2014). New insights on the life cycle stages of the toxic benthic dinoflagellate *Ostreopsis* cf. *ovata*. *Harmful Algae*, 34, 7–16. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2014.02.003>

Accoroni, S., Romagnoli, T., Pichierri, S., Colombo, F. & Totti, C. (2012). Morphometric analysis of *Ostreopsis* cf. *ovata* cells in relation to environmental conditions and bloom phases. *Harmful Algae*, 19, 15–22. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2012.05.003>

Accoroni, S., Tartaglione, L., Dello Iacovo, E., Pichierri, S., Marini, M., Campanelli, A., Dell'Aversano, C. & Totti, C. (2017). Influence of environmental factors on the toxin production of *Ostreopsis* cf. *ovata* during bloom events. *Marine Pollution Bulletin*, 123(1–2), 261–268. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2017.08.049>

Accoroni, S., Totti, C., Razza, E., Congestri, R., Campanelli, A., Marini, M. & Ellwood, N.T.W. (2017). Phosphatase activities of a microepiphytic community during a bloom of *Ostreopsis* cf. *ovata* in the northern Adriatic

Sea. *Water Research*, 120, 272–279.
<https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.05.004>

Aligizaki, K., Katikou, P., Nikolaidis, G. & Panou, A. (2008). First episode of shellfish contamination by palytoxin-like compounds from *Ostreopsis* species (Aegean Sea, Greece). *Toxicon*, 51(3), 418–427.
<https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2007.10.016>

Amzil, Z., Sibat, M., Chomerat, N., Grosseil, H., Marco-Miralles, F., Lemée, R., Nezan, E. & Sechet, V. (2012). Ovatoxin-a and Palytoxin Accumulation in Seafood in Relation to *Ostreopsis* cf. *ovata* Blooms on the French Mediterranean Coast. *Marine Drugs*, 10(2), 477–496.
<https://doi.org/10.3390/md10020477>

Anderson, D. M., Glibert, P. M., Burkholder, J. M. (2002) Harmful algal blooms and eutrophication: nutrient sources, composition, and consequences. *Estuaries* 25: 704–72

Artigas, P. & Gadsby, D. C. (2003). Na⁺/K⁺-pump ligands modulate gating of palytoxin-induced ion channels. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(2), 501–505.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0135849100>

Ashton, M., Rosado, W., Govind, N.S. & Tosteson, T. R. (2003). Culturable and nonculturable bacterial symbionts in the toxic benthic dinoflagellate *Ostreopsis lenticularis*. *Toxicon*, 42(4), 419–424.
[https://doi.org/10.1016/S0041-0101\(03\)00174-0](https://doi.org/10.1016/S0041-0101(03)00174-0)

Biré, R., Trottereau, S., Lemée, R., Delpont, C., Chabot, B., Aumond, Y. & Krys, S. (2013). Occurrence of palytoxins in marine organisms from different trophic levels of the French Mediterranean coast harvested in 2009. *Harmful Algae*, 28, 10–22. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2013.04.007>

Biré, R., Trottereau, S., Lemée, R., Oregioni, D., Delpont, C., Krys, S. & Guérin, T. (2015). Hunt for palytoxins in a wide variety of marine organisms harvested in 2010 on the French Mediterranean coast. *Marine Drugs*, 13(8), 5425–5446. <https://doi.org/10.3390/md13085425>

Bourdeau, P., Durand-Clement, M., Ammar, M. & Fessard, V. (1995). Ecological and toxicological characteristics of benthic dinoflagellates in a ciguateric area (Saint Barthelemy: French West Indies). In: Lassus, P., Arzul, G., Erard-Le Denn, E., Gentien, P., Marcaillou-Le Baut, C. (Eds.), *Harmful Marine Algal Blooms*. Lavoisier, Intercept Ltd., pp. 133–137.

Bravo, I., Vila, M., Casabianca, S., Rodriguez, F., Rial, P., Riobó, P. & Penna, A. (2012). Life cycle stages of the benthic palytoxin-producing dinoflagellate *Ostreopsis* cf. *ovata* (Dinophyceae). *Harmful Algae*, 18, 24–34. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2012.04.001>

Briggs, L., Rhodes, L., Munday, R. & Towers, N., 1998. Detection of palytoxin using a haemolysis neutralisation assay. In: *Proceedings of the 10th New Zealand Marine Biotoxin Science Workshop*, New Zealand Marine Biotoxin Management Board, Wellington.

Brissard, C.; Herve, F.; Sibat, M.; Séchet, V.; Hess, P.; Amzil, Z.; Herrenknecht, C. Characterization of ovatoxin-h, a new ovatoxin analog, and evaluation of chromatographic columns for ovatoxin analysis and purification. *J. Chromatogr. A* 2015, 1388, 87–101.

Brissard, C., Herrenknecht, C., Séchet, V., Hervé, F., Pisapia, F., Harcouet, J., Lemée, R., Chomérat, N., Hess, P. & Amzil, Z. (2014). Complex toxin profile of French Mediterranean *Ostreopsis* cf. *ovata* strains, seafood accumulation and ovatoxins prepurification. *Marine Drugs*, 12(5), 2851–2876. <https://doi.org/10.3390/md12052851>

Carella, F., Sardo, A., Mangoni, O., Di Cioccio, D., Urciuolo, G., De Vico, G. & Zingone, A. (2015). Quantitative histopathology of the Mediterranean mussel (*Mytilus galloprovincialis* L.) exposed to the harmful dinoflagellate *Ostreopsis* cf. *ovata*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 127, 130–140. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2015.03.001>

Carnicer, O., Guallar, C., Andree, K. B., Diogène, J. & Fernández-Tejedor, M. (2015). *Ostreopsis* cf. *ovata* dynamics in the NW Mediterranean Sea in relation to biotic and abiotic factors. *Environmental Research*, 143, 89–99. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2015.08.023>

Chomérat, N., Bilien, G., Derrien, A., Henry, K., Ung, A., Viallon, J., Darius, H. T., Mahana iti Gatti, C., Roué, M., Hervé, F., Réveillon, D., Amzil, Z. & Chinain, M. (2019). *Ostreopsis lenticularis* Y. Fukuyo (Dinophyceae, Gonyaulacales) from French Polynesia (South Pacific Ocean): A revisit of its morphology, molecular phylogeny and toxicity. *Harmful Algae*, 84(January), 95–111. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2019.02.004>

Ciminiello, P., Dell’Aversano, C., Dello Iacovo, E., Fattorusso, E., Forino, M., Grauso, L., Tartaglione, L., Guerrini, F., Pezzolesi, L., Pistocchi, R. & Vanucci, S. (2012). Isolation and structure elucidation of ovatoxin-a, the major toxin produced by *Ostreopsis ovata*. *Journal of the American Chemical Society*, 134(3), 1869–1875. <https://doi.org/10.1021/ja210784u>

Ciminiello, P., Dell'Aversano, C., Fattorusso, E., Forino, M., Grauso, L. & Tartaglione, L. (2011). A 4-decade-long (and still ongoing) hunt for palytoxins chemical architecture. *Toxicon*, 57(3), 362–367. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2010.09.005>

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. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 19(1), 111–120. <https://doi.org/10.1016/j.jasms.2007.11.001>

Ciminiello P, Dell'Aversano C, Dello Iacovo E, Fattorusso E, Forino M, Grauso L, Tartaglione L, Guerrini F, Pistocchi R (2010) Complex palytoxin-like profile of *Ostreopsis ovata*. Identification of four new ovatoxins by high-resolution liquid chromatography/mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 24(18):2735–2744

Ciminiello P, Dell'Aversano C, Dello Iacovo E, Fattorusso E, Forino M, Tartaglione L, Battocchi C, Crinelli R, Carloni E, Magnani M, Penna A (2012) Unique toxin profile of a Mediterranean *Ostreopsis cf. ovata* strain: HR LC-MSn characterization of ovatoxin-f, a new palytoxin congener. *Chem Res Toxicol* 25(6):1243–1252

Deeds, J. R. & Schwartz, M. D. (2010). Human risk associated with palytoxin exposure. *Toxicon*, 56(2), 150–162. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2009.05.035>

Durando, P., Ansaldi, F., Oreste, P., Moscatelli, P., Marensi, L., Grillo, C., Gasparini R., Icardi G. (2007). *Ostreopsis ovata* and human health: epidemiological and clinical features of respiratory syndrome outbreaks from a two-year syndromic surveillance, 2005-06, in north-west Italy. *Euro Surveill*. 12: E070607.1. doi: 10.2807/esw.12.23.03212-en

EFSA (2009) EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM); Scientific Opinion on marine biotoxins in shellfish–Palytoxin group. *EFSA Journal* 7:1393. [1338 pp.].

Faimali, M., Giussani, V., Piazza, V., Garaventa, F., Corrà, C., Asnaghi, V., Privitera, D., Gallus, L., Cattaneo-Vietti, R., Mangialajo, L. & Chiantore, M. (2012). Toxic effects of harmful benthic dinoflagellate *Ostreopsis ovata* on invertebrate and vertebrate marine organisms. *Marine Environmental Research*, 76, 97–107. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2011.09.010>

Ferreira, C.E.L., 2006. Sea urchins killed by toxic algae. *Journal of Marine Biological Association Global Marine Environment*, 3, 22–23.

Fukui M., Murata M., Inoue A., Gawel M. & Yasumoto T, 1987. Occurrence of palytoxin in the trigger fish *Melichtys vidua*. *Toxicon* 25:1121-1124.

García-Altare, M., Tartaglione, L., Dell’Aversano, C., Carnicer, O., De La Iglesia, P., Forino, M., Diogène, J. & Ciminiello, P. (2015). The novel ovatoxin-g and isobaric palytoxin (so far referred to as putative palytoxin) from *Ostreopsis* cf. *ovata* (NW Mediterranean Sea): Structural insights by LC-high resolution MSn. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 407(4), 1191–1204. <https://doi.org/10.1007/s00216-014-8338-y>

Gémin, M. P., Réveillon, D., Hervé, F., Pavaux, A. S., Tharaud, M., Séchet, V., Bertrand, S., Lemée, R. & Amzil, Z. (2020). Toxin content of *Ostreopsis* cf. *ovata* depends on bloom phases, depth and macroalgal substrate in the NW Mediterranean Sea. *Harmful Algae*, 92(December 2019), 101727. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2019.101727>

Giussani, V., Costa, E., Pecorino, D., Berdalet, E., Giampaulis, G. De, Gentile, M., Fuentes, V., Vila, M., Penna, A., Chiantore, M., Garaventa, F., Lavorano, S., & Faimali, M. (2016). Effects of the harmful dinoflagellate *Ostreopsis* cf. *ovata* on different life cycle stages of the common moon jellyfish *Aurelia* sp. *Harmful Algae*, 57, 49–58. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2016.05.005>

Gleibs, S., Mebs, D. & Werding, B. (1995). Studies on the origin and distribution of palytoxin in a Caribbean coral reef. *Toxicon*, 33(11), 1531–1537. [https://doi.org/10.1016/0041-0101\(95\)00079-2](https://doi.org/10.1016/0041-0101(95)00079-2)

Gleibs, S. & Mebs, D. (1999). Distribution and sequestration of palytoxin in coral reef animals. *Toxicon*, 37(11), 1521–1527. [https://doi.org/10.1016/S0041-0101\(99\)00093-8](https://doi.org/10.1016/S0041-0101(99)00093-8).

Glibert, P.M. (2020). Harmful algae at the complex nexus of eutrophication and climate change. *Harmful Algae*, 91(March 2019), 101583. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2019.03.001>

Gobler, C.J. (2020). Climate Change and Harmful Algal Blooms: Insights and perspective. *Harmful Algae*, 91(December 2019), 101731. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2019.101731>

Gomez, F. (2012). A quantitative review of the lifestyle, habitat and trophic diversity of dinoflagellates (Dinoflagellata, Alveolata). *Systematics and Biodiversity*, 10(3), 267–275. <https://doi.org/10.1080/14772000.2012.721021>

Gorbi, S., Bocchetti, R., Binelli, A., Bacchiocchi, S., Orletti, R., Nanetti, L., Raffaelli, F., Vignini, A., Accoroni, S., Totti, C. & Regoli, F. (2012). Biological effects of palytoxin-like compounds from *Ostreopsis cf. ovata*: A multibiomarkers approach with mussels *Mytilus galloprovincialis*. *Chemosphere*, 89(5), 623–632. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2012.05.064>

Gorbi, S., Avio, G. C., Benedetti, M., Totti, C., Accoroni, S., Pichierri, S., Bacchiocchi, S., Orletti, R., Graziosi, T. & Regoli, F. (2013). Effects of harmful dinoflagellate *Ostreopsis cf. ovata* exposure on immunological, histological and oxidative responses of mussels *Mytilus galloprovincialis*. *Fish and Shellfish Immunology*, 35(3), 941–950. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2013.07.003>

Guiry, M.D. & Guiry, G.M. (2022). AlgaeBase. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. <https://www.algaebase.org>; searched on 10 /02/ 2022

Habermann, E. (1989). Palytoxin acts through Na⁺, K⁺-ATPase. *Toxicon* 27, 1171–1187. doi: 10.1016/0041-0101(89)90026-3

Hansen G., Turquet J., Quod J.P., Ten-Hage L., Lugomela C., Kyewalyanga M., Hurbungs M., Wawiye P., Ogongo B., Tunje S. & Rakotoarinjanahary H. 2001. Potentially harmful algae of the western Indian Ocean: a guide based on a preliminary survey. I.O.C., *Manuals and Guides* 41. Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO

Heisler, J., Glibert, P. M., Burkholder, J. M., Anderson, D. M., Cochlan, W., Dennison, W. C., Dortch, Q., Gobler, C. J., Heil, C. A., Humphries, E., Lewitus, A., Magnien, R., Marshall, H. G., Sellner, K., Stockwell, D. A., Stoecker, D.K. & Suddleson, M. (2008). Eutrophication and harmful algal blooms: A scientific consensus. *Harmful Algae*, 8(1), 3–13. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2008.08.006>

Kuzat, N., Baricevic, A., Tankovic, M. S., Pfannkuchen, D. M., Ivancic, I. & Pfannkuchen, M. (2021). A study on *Ostreopsis cf. ovata* along the eastern Adriatic coast. *Regional Studies in Marine Science*, 45, 101808. <https://doi.org/10.1016/j.rsma.2021.101808>

Lindahl, O., 1998. Occurrence and Monitoring of harmful algae in the marine environment. In: Miraglia, M., Van Egmond, H., Brera, C., Gilbert, J. (Eds) *Mycotoxins and phycotoxins - developments in chemistry, toxicology and food safety*. Proceedings of the IX International IUPAC

Symposium on *Mycotoxins and Phycotoxins*, pp. 409–423. Fort Collins, Colorado, Alaken Press

Louzao, M. C., Espiña, B., Cagide, E., Ares, I. R., Alfonso, A., Vieytes, M. R. & Botana, L. M. (2010). Cytotoxic effect of palytoxin on mussel. *Toxicon*, 56(5), 842–847. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2010.02.027>

Malagoli, D., Casarini, L. & Ottaviani, E. (2008). Effects of the marine toxins okadaic acid and palytoxin on mussel phagocytosis. *Fish and Shellfish Immunology*, 24(2), 180–186. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2007.10.012>

Mangialajo, L., Bertolotto, R., Cattaneo-Vietti, R., Chiantore, M., Grillo, C., Lemée, R., Melchiorre, N., Moretto, P., Povero, P. & Ruggieri, N. (2008). The toxic benthic dinoflagellate *Ostreopsis ovata*: Quantification of proliferation along the coastline of Genoa, Italy. *Marine Pollution Bulletin*, 56(6), 1209–1214. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2008.02.028>

Mercado, J. A., Viera, M., Tosteson, T. R., Gonzalez, I., Silva, W. & Escalona de Motta, G. (1995). Differences in the toxicity and biological activity of *Ostreopsis lenticularis* observed using different extraction procedures harmful marine algal blooms,” in Proceedings of the Sixth International Conference on Toxic Marine Phytoplankton, eds P. Lassus, G. Arzul, E. Erard-Le Denn, P. Gentien, C. Marcaillou-le Baut (*Nantes: Lavoisier*), 321–326.

Mercado, J., Rivera-Rentas, A., González, I., Tosteson, T. R., Molgó, J. & Escalona de Motta, G. (1994). Neuro-and myo-toxicity of extracts from the benthic dinoflagellate *Ostreopsis lenticularis* is sensitive to μ -conotoxin. *Soc. Neurosci. Abstr.* 20:718.

Meroni, L., Chiantore, M., Petrillo, M. & Asnaghi, V. (2018). Habitat effects on *Ostreopsis cf. ovata* bloom dynamics. *Harmful Algae*, 80, 64–71. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2018.09.006>

Meunier, F. A., Mercado, J. A., Molgó, J., Tosteson, T. R. & Escalona De Motta, G. (1997). Selective depolarization of the muscle membrane in frog nerve-muscle preparations by a chromatographically purified extract of the dinoflagellate *Ostreopsis lenticularis*. *British Journal of Pharmacology*, 121(6), 1224–1230. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0701256>

Migliaccio, O., Castellano, I., Di Cioccio, D., Tedeschi, G., Negri, A., Cirino, P., Romano, G., Zingone, A. & Palumbo, A. (2016). Subtle reproductive impairment through nitric oxide-mediated mechanisms in sea urchins from an area affected by harmful algal blooms. *Scientific Reports*, 6(May), 1–14. <https://doi.org/10.1038/srep26086>

- Monti, M., Minocci, M., Beran, A. & Iveša, L. (2007). First record of *Ostreopsis* cf. *ovata* on macroalgae in the Northern Adriatic Sea. *Marine Pollution Bulletin*, 54(5), 598–601. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2007.01.013>
- Neves, R. A. F., Contins, M. & Nascimento, S. M. (2018). Effects of the toxic benthic dinoflagellate *Ostreopsis* cf. *ovata* on fertilization and early development of the sea urchin *Lytechinus variegatus*. *Marine Environmental Research*, 135(January), 11–17. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2018.01.014>
- Norris, D.R., Bomber, J.W. & Balech, E. (1985). Benthic dinoflagellates associated with ciguatera from Florida Keys. I. *Ostreopsis heptagona* sp. nov. In: Anderson, D.M., White, A.W., Baden, D.G. (Eds.), Toxic Dinoflagellates. *Elsevier*, Amsterdam, pp. 39–44
- Okamoto, N., & Keeling, P. J. (2014). A comparative overview of the flagellar apparatus of dinoflagellate, perkinsids and colpodellids. *Microorganisms*, 2(1), 73–91. <https://doi.org/10.3390/microorganisms2010073>
- Onuma, Y., Satake, M., Ukena, T., Roux, J., Chanteau, S., Rasolofonirina, N., Ratsimaloto, M., Naoki, H. & Yasumoto, T. (1999). Identification of putative palytoxin as the cause of clupectoxism. *Toxicon*, 37(1), 55–65. [https://doi.org/10.1016/S0041-0101\(98\)00133-0](https://doi.org/10.1016/S0041-0101(98)00133-0)
- Pagliara, P. & Caroppo, C. (2012). Toxicity assessment of *Amphidinium carterae*, *Coolia* cf. *monotis* and *Ostreopsis* cf. *ovata* (Dinophyta) isolated from the northern Ionian Sea (Mediterranean Sea). *Toxicon*, 60(6), 1203–1214. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2012.08.005>
- Parsons, M. L., Aligizaki, K., Bottein, M. Y. D., Fraga, S., Morton, S. L., Penna, A. & Rhodes, L. (2012). *Gambierdiscus* and *Ostreopsis*: Reassessment of the state of knowledge of their taxonomy, geography, ecophysiology, and toxicology. *Harmful Algae*, 14, 107–129. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2011.10.017>
- Pavaux, A. S., Berdalet, E. & Lemée, R. (2020). Chemical Ecology of the Benthic Dinoflagellate Genus *Ostreopsis*: Review of Progress and Future Directions. *Frontiers in Marine Science*, 7, 1–28. <https://doi.org/10.3389/fmars.2020.00498>
- Pearce, I., Marshall, J., Hallegraef, G.H., 2001. Toxic epiphytic dinoflagellates from East Coast Tasmania. pp. 54-57. In: *Harmful Algal*

Blooms, 2000. Hallegraeff, G., Blackburn, S.I., Bolch, C.J., Lewis, R.J. (Eds). Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO, Hobart, Tasmania

Pérez-Guzmán, L., Pérez-Matos, A. E., Rosado, W., Tosteson, T. R. & Govind, N. S. (2008). Bacteria associated with toxic clonal cultures of the dinoflagellate *Ostreopsis lenticularis*. *Marine Biotechnology*, 10(5), 492–496. <https://doi.org/10.1007/s10126-008-9088-7>

Pezzolesi, L., Guerrini, F., Ciminiello, P., Dell'Aversano, C., Dello Iacovo, E., Fattorusso, E., Forino, M., Tartaglione, L. & Pistocchi, R. (2012). Influence of temperature and salinity on *Ostreopsis cf. ovata* growth and evaluation of toxin content through HR LC-MS and biological assays. *Water Research*, 46(1), 82–92. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2011.10.029>

Pezzolesi, L., Pistocchi, R., Fratangeli, F., Dell'Aversano, C., Dello Iacovo, E. & Tartaglione, L. (2014). Growth dynamics in relation to the production of the main cellular components in the toxic dinoflagellate *Ostreopsis cf. ovata*. *Harmful Algae*, 36, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2014.03.006>

Randall JE, 2005. Review of Clupeotoxism, an often fatal illness from the consumption of clupeoid fishes. *Pac. Sci.* 59:73-77.

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

Scalco, E., Brunet, C., Marino, F., Rossi, R., Soprano, V., Zingone, A. & Montresor, M. (2012). Growth and toxicity responses of Mediterranean *Ostreopsis cf. ovata* to seasonal irradiance and temperature conditions. *Harmful Algae*, 17, 25–34. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2012.02.008>

Sellner, K.G., Doucette, G.J. & Kirkpatrick, G. J. (2003). Harmful algal blooms: Causes, impacts and detection. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 30(7), 383–406. <https://doi.org/10.1007/s10295-003-0074-9>

Shears, N. T. & Ross, P. M. (2009). Blooms of benthic dinoflagellates of the genus *Ostreopsis*; an increasing and ecologically important phenomenon on temperate reefs in New Zealand and worldwide. *Harmful Algae*, 8(6), 916–925. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2009.05.003>

Simonini, R., Orlandi, M. & Abbate, M. (2011). Is the toxic dinoflagellate *Ostreopsis cf. ovata* harmful to Mediterranean benthic invertebrates?

Evidences from ecotoxicological tests with the polychaete *Dinophilus gyrociliatus*. *Marine Environmental Research*, 72(4), 230–233. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2011.08.009>

Spatharis S, Dolapsakis NP, Economou-Amilli A, Tsirtsis G, Danielidis DB, 2009. Dynamics of potentially harmful microalgae in a confined Mediterranean Gulf-Assessing the risk of bloom formation. *Harmful Algae* 8:736-743.

Suzuki T, Watanabe R, Uchida H, Matsushima R, Nagai H, Yasumoto T, Yoshimatsu T, Sato S, Adachi M (2012) LC-MS/MS analysis of novel ovatoxin isomers in several *Ostreopsis* strains collected in Japan. *Harmful Algae* 20:81–91.

Tartaglione, L., Dello Iacovo, E., Mazzeo, A., Casabianca, S., Ciminiello, P., Penna, A. & Dell’Aversano, C. (2017). Variability in Toxin Profiles of the Mediterranean *Ostreopsis* cf. *ovata* and in Structural Features of the Produced Ovatoxins. *Environmental Science & Technology*, 51(23), 13920–13928.

Tester, P. A., Litaker, R. W., & Berdalet, E. (2020). Climate change and harmful benthic microalgae. *Harmful Algae*, 91(July 2019), 101655. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2019.101655>

Tibiriçá, C. E. J. A., Leite, I. P., Batista, T. V. V., Fernandes, L. F., Chomérat, N., Hervé, F., Hess, P. & Mafra, L. L. (2019). *Ostreopsis* cf. *ovata* bloom in currais, Brazil: Phylogeny, toxin profile and contamination of mussels and marine plastic litter. *Toxins*, 11(8). <https://doi.org/10.3390/toxins11080446>

Tognetto, L., Bellato, S., Moro, I., Andreoli, C., 1995. Occurrence of *Ostreopsis ovata* (Dinophyceae) in the Tyrrhenian Sea during summer 1994. *Bot. Mar.* 38, 291– 295.

Tosteson, T. R., Ballantine, D. L., Tosteson, C. G., Hensley, V. & Bardales, A. T. (1989). Associated bacterial flora, growth, and toxicity of cultured benthic dinoflagellates *Ostreopsis lenticularis* and *Gambierdiscus toxicus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 55(1), 137–141. <https://doi.org/10.1128/aem.55.1.137-141.1989>

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(2), 233–239. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2009.10.006>

Usami, M., Satake, M., Ishida, S., Yasumoto, T., Oue, A. & Kan, Y. (1995). Palytoxin Analogs from the Dinoflagellate *Ostreopsis siamensis*. *Journal of the American Chemical Society*, 117(19), 5389–5390. <https://doi.org/10.1021/ja00124a034>

Vanucci, S., Pezzolesi, L., Pistocchi, R., Ciminiello, P., Dell'Aversano, C., Dello Iacovo, E., Fattorusso, E., Tartaglione, L. & Guerrini, F. (2012). Nitrogen and phosphorus limitation effects on cell growth, biovolume, and toxin production in *Ostreopsis* cf. *ovata*. *Harmful Algae*, 15, 78–90. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2011.12.003>

Verma, A., Hoppenrath, M., Dorantes-Aranda, J. J., Harwood, D. T., and Murray, S. A. (2016). Molecular and phylogenetic characterization of *Ostreopsis* (Dinophyceae) and the description of a new species, *Ostreopsis rhodesae* sp. nov., from a subtropical Australian lagoon. *Harmful Algae* 60, 116–130. doi: 10.1016/j.hal.2016.11.004.

Vila M, Garcés E, Masó M, 2001. Potentially toxic epiphytic dinoflagellate assemblages on macroalgae in the NW Mediterranean. *Aquat. Microb. Ecol.* 26(1):51-60.

Yamaguchi, H., Tomori, Y., Tanimoto, Y., Oku, O. & Adachi, M. (2014). Evaluation of the effects of light intensity on growth of the benthic dinoflagellate *Ostreopsis* sp. 1 using a newly developed photoirradiation-culture system and a novel regression analytical method. *Harmful Algae*, 39, 48–54. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2014.06.011>

Yasumoto T, 1998. Fish poisoning due to toxins of microalgal origins in the Pacific. *Toxicon* 36:1515-1518.

Yasumoto, T., Yasumura, D., Ohizumi, Y., Takahashi, M., Alcalá, A. C. & Alcalá, L. C. (1986). Palytoxin in two species of xanthid crab from the Philippines. *Agricultural and Biological Chemistry*, 50(1), 163–167. <https://doi.org/10.1080/00021369.1986.10867344>