

A1. ALGHE TOSSICHE E OSTREOPSIS CF. OVATA NELLE ACQUE DI BALNEAZIONE

Patrizia Ciminiello (a), Maura Manganelli (b), Antonella Penna (c)*,
Cecilia Totti (d), Adriana Zingone (e)*

(a) Dipartimento di Farmacia, Università di Napoli Federico II, Napoli

(b) Dipartimento di Ambiente e Connessa Prevenzione Primaria, Istituto Superiore Sanità, Roma

(c) Dipartimento di Scienze Biomolecolari, Università di Urbino, Urbino

(d) Dipartimento di Scienze della Vita e dell'Ambiente, Università Politecnica delle Marche, Ancona

(e) Dipartimento di ecologia ed evoluzione del plancton, Stazione Zoologica Anton Dohrn, Napoli

* antonella.penna@uniurb.it; adriana.zingone@szn.it

Le proliferazioni eccessive di microalghe (fioriture algali) in acque costiere, fino al raggiungimento di abbondanze elevate (valori nell'ordine di 10^4 cell/mL e oltre), sono un fenomeno noto da molto tempo. In relazione ai pigmenti presenti nelle microalghe, fioriture particolarmente intense possono causare colorazioni anomale di tratti di mare anche estesi, comunemente note come maree rosse (*red tides*) o più specificatamente maree brune, bianche o verdi. Questi fenomeni fanno parte dei cosiddetti *Harmful Algal Blooms* (HAB), termine che, più in generale, include tutti i casi in cui si riscontrano effetti nocivi per la salute dell'uomo, le attività economiche nella zona costiera e/o per l'ambiente, imputabili alla presenza di microalghe, indipendentemente dalla loro abbondanza, e molto spesso senza manifestazioni evidenti o colorazioni anomale (Zingone & Enevoldsen, 2000). Negli ultimi decenni gli HAB, sembrano essersi intensificati, sia in termini di frequenza temporale, sia per la maggiore diffusione geografica in gran parte delle aree del mondo (Anderson *et al.*, 2012; Zingone, 2010). Questo è stato spesso imputato all'aumento della pressione antropica nelle aree costiere in termini di apporti di nutrienti (sali di fosforo e azoto, silicati, vitamine) necessari per la crescita di questi organismi vegetali, anche se spesso questa relazione non è stata osservata (Anderson *et al.*, 2002; Zingone & Wyatt, 2005; Smayda, 2008). In altri casi, è stato evidenziato l'impatto di porti, moli e barriere che, ostacolando la circolazione costiera e il ricambio delle masse d'acqua, favoriscono l'accumulo di microalghe potenzialmente tossiche e non (Garcés *et al.*, 2000; Vila *et al.*, 2001). L'introduzione di specie aliene attraverso le acque di zavorra delle navi e l'importazione di molluschi destinati ad impianti di acquacoltura sono ulteriori fattori che possono contribuire all'espansione degli areali di distribuzione delle specie tossiche (Anderson *et al.*, 2012). Negli ultimi anni infine è stata messa in risalto anche una relazione delle proliferazioni algali con i fattori climatici, che possono determinare cambiamenti significativi nell'idrografia delle acque costiere nonché variazioni dell'areale geografico delle specie in questione (Hallegraeff, 2010). Inoltre, a causa delle interazioni sempre crescenti con le acque costiere e con le risorse che esse forniscono, soprattutto nei Paesi industrializzati, negli ultimi anni è molto aumentata l'attenzione sullo stato di salute dell'ambiente marino-costiero, attraverso piani di monitoraggio e controlli sistematici, che hanno portato ad evidenziare eventi di fioriture algali con frequenza maggiore rispetto al passato.

Le conseguenze delle fioriture algali possono essere di varia natura. In generale, le fioriture hanno un effetto benefico, dato che le alghe sono produttori primari e quindi producono ossigeno e sono alla base della catena alimentare. Tuttavia, in relazione alle caratteristiche chimico-fisiche e idrodinamiche del corpo idrico, fioriture massive possono indurre, in alcuni casi (es. in regime di stratificazione estiva), marcate alterazioni ambientali, quali ad esempio

ipossia, anossia e sviluppo di idrogeno solforato a seguito della decomposizione delle cellule a fine fioritura, che possono determinare morie di organismi bentonici. Morie di pesci (banchi naturali o di allevamento) possono verificarsi anche a causa di tossine algali specifiche (ittiotossine) o di danni fisici causati da occlusione o ferite alle branchie, come nel caso di specie con spine silicee o che producono muco.

Alcune fioriture algali hanno rilevanza dal punto di vista sanitario, data la capacità di alcune microalghe di produrre tossine (*paralytic shellfish poisoning toxins*, *amnesic shellfish poisoning toxins*, alcune tossine liposolubili, ecc.), che possono accumularsi in molluschi, crostacei, pesci e in altri animali marini abitualmente consumati dall'uomo. Il rischio potenziale per la salute umana, associato alla presenza nella dieta di alimenti di origine marina contaminati da queste tossine, impone un'attenta valutazione da parte delle autorità sanitarie, nonché la messa in atto di procedure di controllo volte ad assicurare la sicurezza degli alimenti di origine marina.

L'impatto delle tossine di origine algale ha influenza anche sull'uso ricreativo delle zone costiere. Infatti, alcune tossine algali possono agire per contatto diretto causando dermatiti e congiuntiviti. Soprattutto in acque tropicali, sono stati segnalati casi di dermatiti, anche severe, in bagnanti che avevano avuto contatti con acque interessate da fioriture di cianobatteri marini (Osborne *et al.*, 2001). Inoltre l'aerosol marino può veicolare microalghe marine e/o tossine da esse prodotte, causando disturbi alle vie respiratorie e sintomi vari. A questo proposito l'esempio più studiato è quello delle *red tides* associate alla proliferazione di *Karenia brevis*, una dinofitea produttrice di brevetossine, nel Golfo del Messico (Fleming *et al.*, 2005). In alcuni tratti delle coste italiane e di altri paesi mediterranei sono stati riportati episodi analoghi attribuiti a fioriture della dinofitea bentonica *Ostreopsis* cf. *ovata* (vedi capitoli successivi). Non sono invece disponibili evidenze di patologie sistemiche associate all'ingestione involontaria di acqua interessata dalla presenza di alghe tossiche marine durante le attività di balneazione.

L'intensificazione del fenomeno delle proliferazioni algali e i relativi risvolti sanitari hanno indotto anche l'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) ad occuparsi di questa problematica nell'ambito delle *Guidelines for safe recreational water environments* del 2003 (WHO, 2003). Secondo l'OMS i dati disponibili suggeriscono che il rischio per la salute umana associato alla presenza di alghe tossiche marine durante attività ricreative è limitato a poche specie e aree geografiche. L'OMS ha ritenuto pertanto inappropriato raccomandare valori guida di carattere generale, suggerendo piuttosto di condurre adeguati piani di monitoraggio e programmi di sorveglianza nelle aree potenzialmente interessate, insieme ad attività di valutazione e gestione del rischio e di comunicazione ai cittadini. Queste linee guida rappresentano la base scientifica sulla quale è stata elaborata la nuova Direttiva europea relativa alla gestione della qualità delle acque di balneazione (Europa, 2006). Tale direttiva individua soltanto due parametri microbiologici, *Escherichia coli* ed enterococchi intestinali, per la classificazione della qualità delle acque di balneazione, non includendo dunque le alghe tossiche marine. Tuttavia, non trascura tale parametro, al quale dedica l'articolo 9, che recita:

“Qualora il profilo delle acque di balneazione mostri una tendenza alla proliferazione di macroalghe e/o fitoplancton marino, vengono svolte indagini per determinarne il grado di accettabilità e i rischi per la salute e vengono adottate misure di gestione adeguate, che includono l'informazione al pubblico”.

La presenza di microalghe planctoniche d'interesse sanitario nell'ambiente marino costiero da anni è soggetta ad attività di sorveglianza. La presenza e/o la fioritura di specie potenzialmente tossiche (*Alexandrium* spp., *Dinophysis* spp., *Pseudo-nitzschia* spp., *Fibrocapsa japonica*, ecc.) sono state ripetutamente segnalate lungo le coste italiane. Solo recentemente è stata riservata attenzione anche alle microalghe bentoniche che possono produrre tossine, e in particolare a *O. cf. ovata*, oggetto specifico di queste linee guida, *Prorocentrum lima*, *P.*

emarginatum, *Amphidinium* spp. Tuttavia, ad eccezione del caso di *O. cf. ovata* non ci sono evidenze di associazione tra esposizione in attività di balneazione ed effetti sanitari.

A1.1. Cenni di ecologia di *Ostreopsis cf. ovata*

O. cf. ovata è una specie bentonica che cresce su diversi substrati quali macroalghe, angiosperme marine, rocce, gusci di invertebrati e sedimenti mobili, e anche in colonna d'acqua (Fukuyo, 1981; Totti *et al.*, 2010). Le cellule di *Ostreopsis* aderiscono al substrato attraverso la formazione di filamenti (tricocisti) e sostanze mucillaginose, che nelle fasi avanzate della fioritura possono formare una ricopertura o pellicola brunastra (*mat*) molto fibrosa e ricca in carboidrati (Totti *et al.*, 2010; Honsell *et al.*, 2013). La mucillagine e la *mat* possono essere facilmente risospesi in colonna d'acqua, in caso di moto ondoso, di azioni meccaniche o di un idrodinamismo elevato dando origine a flocculi e talvolta a schiume superficiali. La concentrazione delle cellule nella colonna è dunque direttamente correlata all'abbondanza delle cellule sui substrati bentonici (Mangialajo *et al.*, 2008; Mangialajo *et al.*, 2011) e a fenomeni di idrodinamismo (Shears & Ross, 2009; Totti *et al.*, 2010). La relazione con l'idrodinamismo è più evidente durante la fase di intensa proliferazione, quando si sviluppa una *mat* ben visibile (Accoroni *et al.*, 2011), mentre non si osserva in presenza di basse densità cellulari (Richlen & Lobel, 2011).

Fino a circa 15 anni fa, le specie del genere *Ostreopsis* erano normalmente rinvenute in aree tropicali e subtropicali; successivamente sono diventate sempre più frequenti segnalazioni di *O. cf. ovata* e *O. cf. siamensis* in aree temperate come la Nuova Zelanda, il Mar Mediterraneo e le coste giapponesi (Vila *et al.*, 2001, Shears & Ross, 2009, Sato *et al.*, 2011). *O. cf. ovata*, la specie più diffusa e abbondante in Mediterraneo (Battocchi *et al.*, 2010; Mangialajo *et al.*, 2011) produce delle potenti tossine ed è stata associata a importanti episodi di intossicazioni (vedi capitolo A6).

Diversi autori hanno riportato che le fioriture di *Ostreopsis* sarebbero favorite da elevati valori di temperatura, suggerendo che il riscaldamento globale potrebbe aver influenzato la recente espansione di questa microalga nel Mediterraneo (Hallegraeff, 2010; Granéli *et al.*, 2011). Tuttavia nelle diverse aree del Mediterraneo, il picco della fioritura si osserva in corrispondenza di valori di temperatura diversi, generalmente verso la fine di luglio nel Mediterraneo Nord-Occidentale, con temperatura dell'acqua intorno ai 26°C, in tarda estate nell'Adriatico settentrionale, con temperatura anche intorno ai 20-22°C (Mangialajo *et al.*, 2011).

Per quanto riguarda le relazioni con i nutrienti, benché l'aumento delle fioriture di alghe potenzialmente tossiche sia stato messo in relazione con l'eutrofizzazione delle acque costiere (Glibert *et al.*, 2010), tale relazione con le fioriture di *Ostreopsis* non è stata chiaramente provata. Infatti, tali fioriture si verificano in tutto il mondo anche in aree oligotrofiche, con una netta tendenza a non interessare le aree maggiormente eutrofizzate. Il comportamento trofico di queste microalghe non è stato del tutto chiarito, ma non è escluso che esse possano assumere nutrienti predando altri organismi (Burkholder *et al.*, 2008).

A1.2. Diversità genetica e problematica dell'identificazione morfologica di *Ostreopsis*

Il genere *Ostreopsis* (Gonyaulacales, Dinophyceae) include nove specie distribuite principalmente nelle zone tropicali e sub-tropicali, di cui almeno tre (*O. cf. ovata*, *O. cf.*

siamensis e *O. lenticularis*) sono anche molto diffuse in aree temperate (Rhodes, 2011). *O. cf. siamensis* di aree Pacifiche (Usami *et al.*, 1995; Ukena *et al.*, 2002), *O. cf. ovata*, *O. lenticularis*, *O. heptagona*, *O. mascarenensis* e *O. labens* sono tossiche, sulla base dei risultati di test biologici (test di tossicità acuta su topo, di citotossicità e di emolisi) e sulla base della loro capacità di produrre composti palitossina-simili, mentre, *O. cf. siamensis* in aree mediterranee e atlantiche risulta non tossica (Paz *et al.*, 2011; Ciminiello *et al.*, 2012). Tuttavia, oggi è ampiamente dibattuto il concetto di specie e non è stato ancora chiarito quante specie siano incluse nel genere *Ostreopsis*. Infatti, la tassonomia di *Ostreopsis* spp. basata sui parametri morfologici è debole perché risulta ancora alquanto difficoltosa, se non impossibile, l'identificazione su base morfologica delle specie di *Ostreopsis* soprattutto in campioni misti. Questo è dovuto alla grande variabilità morfologica e morfometrica delle cellule sia di campioni ambientali sia di coltura, e al fatto che il range dimensionale e le caratteristiche morfometriche delle differenti specie di *Ostreopsis* sono spesso sovrapponibili (Totti *et al.*, 2010; Accoroni *et al.*, 2012; Sato *et al.*, 2011). Ormai è evidente che alcuni criteri classici usati per la descrizione tassonomica non sono più validi perché discrepanti e non idonei per la descrizione delle specie (Parsons *et al.*, 2012). In base alle conoscenze ottenute finora, risulta necessario una revisione del genere *Ostreopsis* per chiarirne la classificazione tassonomica e migliorare quindi la capacità di identificare le specie. Pertanto, è utilizzato il suffisso cf. (confronta) per i ceppi di *O. ovata* e *O. siamensis* che vengono identificati. A questo proposito, risulta appropriato l'approccio di analisi filogenetica o molecolare diagnostico di PCR basato sulle sequenze dei geni ribosomiali (ITS-5.8S e LSU), per distinguere le specie di *Ostreopsis*, e all'interno della specie, i vari cladi con differente distribuzione geografica (Casabianca *et al.*, 2013; Berdalet *et al.*, 2012; Perini *et al.*, 2011).

Le specie di *Ostreopsis* sono spesso simpatriche e specie tossiche e non tossiche possono coesistere nello stesso habitat. Quindi, risulta importante eseguire una corretta identificazione tassonomica di *Ostreopsis* a livello di specie per la gestione delle fioriture tossiche di questa microalga nella fascia costiera.

In Mar Mediterraneo le fioriture sono prevalentemente sostenute da *O. cf. ovata* che produce ovatossine e solo in tracce palitossina putativa (Ciminiello *et al.*, 2006; Ciminiello *et al.*, 2008; Ciminiello *et al.*, 2010; ISPRA, 2011; ISPRA, 2012). Il termine putativa si riferisce al fatto che il composto, evidenziato mediante cromatografia liquida accoppiata alla spettrometria di massa (*Liquid Chromatography-Mass Spectrometry*, LC-MS) presenta lo stesso spettro di massa della palitossina standard; tuttavia, considerando la complessità della molecola, la possibilità che si tratti di un isomero strutturale non può essere esclusa. Al momento sono in corso ulteriori studi per acquisire informazioni strutturali più approfondite su tale tossina. In Italia, in base alle sequenze dei geni ribosomiali, *O. cf. ovata*, appartiene al clade Atlantico/Mediterraneo che è ben differenziato dal clade di *O. cf. ovata* dell'Indo-Pacifico (Penna *et al.*, 2005; 2010). In particolare, *O. cf. ovata* costituisce un complesso di specie o ribotipi di varia distribuzione geografica, da aree temperate e inter-tropicali, con variabilità della produzione di palitossine (Sato *et al.*, 2011; Ukida *et al.*, 2013).

L'origine di *Ostreopsis* in Mar Mediterraneo è controversa. La microalga può essere considerata endemica o introdotta da altre aree. Un'ipotesi è che *Ostreopsis*, già presente in Mediterraneo, potrebbe essere stata una specie rara, difficilmente campionata, e quindi non identificata fino al 1972 (Taylor, 1979). Solo recentemente dalla fine degli anni novanta del secolo scorso, *Ostreopsis* ha cominciato a produrre fioriture ad alta biomassa e invasive. Le ragioni di questo fenomeno sono ancora oggetto di studio (vedi sopra). Inoltre, nell'area Atlantica/Mediterranea, e in particolare in Mar Mediterraneo, *O. cf. ovata* costituisce una popolazione geneticamente ben rappresentata e omogenea (Penna *et al.*, 2005; 2010; Nascimento *et al.*, 2012). Queste evidenze supportano l'ipotesi di un'origine

atlantico/mediterranea della specie e del genere senza una chiara direzione di flusso genico (Penna *et al.*, 2010). Un'altra ipotesi recente sostiene che *O. cf. ovata* sia stata introdotta in Mar Mediterraneo dal Giappone per trasporto mediato in base al fatto che un numero, seppur basso, di isolati sono geneticamente identici ad isolati di *O. cf. ovata* del Mar Mediterraneo (Sato *et al.*, 2011). A oggi, l'origine geografica di *Ostreopsis* è soggetta a più interpretazioni, che in alcuni casi non sono ancora ben supportate e non sono conclusive. Pertanto, l'ipotesi che *Ostreopsis* sia stata introdotta va ulteriormente dimostrata da ricerche future.

O. cf. siamensis è un'altra specie presente nel Mar Mediterraneo, ma sembra non produrre fioriture tossiche ed è molto meno diffusa e abbondante. Infatti, dove è maggiormente presente, ad esempio lungo le coste spagnole, si ritrova a basse concentrazioni assieme ad *O. cf. ovata* (Battocchi *et al.*, 2010; Vila M. pers comm.). Inoltre, è stato recentemente dimostrato che ceppi mediterranei e atlantici di *O. cf. siamensis* non producono tossine, ad eccezione di tracce di palitossina putativa (nell'ordine di sub-fentogrammi) nel solo ceppo mediterraneo (Ciminiello *et al.*, 2013). Gli isolati di *O. cf. siamensis* del Mar Mediterraneo ed Est Atlantico raggruppano in un clade filogenetico ben distinto da quello che include *O. cf. ovata* (Penna *et al.*, 2010; Laza Martinez *et al.*, 2011). Sebbene sia evidente un chiaro differenziamento genetico delle due specie (*O. cf. ovata* e *O. cf. siamensis*), che si riflette anche nella produzione di palitossine (Ciminiello *et al.*, 2012), non è possibile distinguere le due specie su base morfologica.

In conclusione, nelle attività di monitoraggio si ritiene sufficiente la caratterizzazione morfologica assumendo che la specie nel Mediterraneo sia *O. cf. ovata*, previa conferma periodica dell'identificazione molecolare specie-specifica. Inoltre, per approfondimenti scientifici, data la complessità del genere *Ostreopsis*, è auspicabile l'utilizzo di un approccio combinato delle tecniche molecolari supportato da analisi morfologiche e chemotassonomiche per l'identificazione delle specie.

Bibliografia

- Accoroni S, Romagnoli T, Colombo F, Pennesi C, Di Camillo CG, Marini M, Battocchi C, Ciminiello P, Dell'Aversano C, Iacovo ED, Fattorusso E, Tartaglione L, Penna A, Totti C. *Ostreopsis cf. ovata* bloom in the northern Adriatic Sea during summer 2009: Ecology, molecular characterization and toxin profile. *Mar Pollut Bull* 2011;62:2512-9.
- Accoroni S, Colombo F, Pichierri S, Romagnoli T, Marini M, Battocchi C, Penna A, Totti C. Ecology of *Ostreopsis cf. ovata* blooms in the northwestern Adriatic Sea. *Cryptogamie, Algologie*, 2012;33:191-8.
- Anderson DM, Cembella AD, Hallegraeff GM. Progress in understanding harmful algal blooms: paradigm shifts and new technologies for research, monitoring, and management. *Ann Rev Mar Sci* 2012;4:143-76.
- Anderson DM, Glibert PM, Burkholder JM. Harmful algal blooms and eutrophication: nutrient sources, compositions, and consequences. *Estuaries* 2002;5:704-26.
- Battocchi C, Totti C, Vila M, Masò M, Capellacci S, Accoroni S, René A, Scardi M, Penna A. Monitoring toxic microalgae *Ostreopsis* (dinoflagellate) species in coastal waters of the Mediterranean Sea using molecular PCR-based assay combined with light microscopy. *Mar Pollut Bull* 60:1074-84.
- Berdalet E, Bravo I, Evans J, Fraga S, Kibler R, Kudela M, Larsen W, Penna A, Tester P, Vila M, Zingone A. Global ecology and oceanography of harmful algal blooms. In: Berdalet E, Tester P, Zingone A (Ed.). *GEOHAB core research project: HABs in benthic systems*. Paris and Newark: IOC-UNESCO, SCOR; 2012. (GEOHAB Report No. 9). p. 1-64

- Burkholder JM, Glibert PM, Skelton HM. Mixotrophy, a major mode of nutrition for harmful algal species in eutrophic waters. *Harmful Algae* 2008;8:77-93.
- Casabianca S, Casabianca A, Riobò P, Franco JM, Vila M, Penna A. Quantification of the Toxic Dinoflagellate *Ostreopsis* spp. by qPCR Assay in Marine Aerosol. *Environ Sci Technol* 2013;47:3788-95.
- Ciminiello P, Dell'Aversano C, Fattorusso E, Forino M, Magno GS, Tartaglione L, Grillo C, Melchiorre N. The Genoa 2005 outbreak. Determination of putative palytoxin in Mediterranean *Ostreopsis ovata* by a new liquid chromatography tandem mass spectrometry method. *Anal Chem* 2006;78:6153-9.
- Ciminiello P, Dell'Aversano C, Fattorusso E, Forino M, Tartaglione L, Grillo C, Melchiorre N. Putative palytoxin and its new analogue, ovatoxin-a, in *Ostreopsis ovata* collected along the Ligurian coasts during the 2006 toxic outbreak. *J Am Soc Mass Spectrom* 2008;19:111-20.
- Ciminiello P, Dell'Aversano C, Iacovo ED, Fattorusso E, Forino M, Grauso L, Tartaglione L, Guerrini F, Pistocchi R. Complex palytoxin-like profile of *Ostreopsis ovata*. Identification of four new ovatoxins by high-resolution liquid chromatography/mass spectrometry. *Rap Comm Mass Spectrom* 2010;24:2735-44.
- Ciminiello P, Dell'Aversano C, Iacovo ED, Fattorusso E, Forino M, Tartaglione L, Battocchi C, Crinelli R, Carloni E, Magnani M, Penna A. Unique toxin profile of a mediterranean *Ostreopsis* cf. *ovata* strain: HR LC-MSn characterization of ovatoxin-f, a new palytoxin congener. *Chem Res Toxicol* 2012;25:1243-52.
- Ciminiello P, Dell'Aversano C, Iacovo ED, Fattorusso E, Forino M, Tartaglione L, Yasumoto, T, Battocchi, C, Giacobbe MG, Amorim A, Penna A. Investigation of toxin profile of Mediterranean and Atlantic strains of *Ostreopsis* cf. *siamensis* (Dinophyceae) by liquid chromatography, and high resolution mass spectrometry. *Harmful Algae* 2013;23:9-27.
- Europa. Direttiva 2006/7/CE del Parlamento Europeo e del Consiglio del 15 febbraio 2006 relativa alla gestione della qualità delle acque di balneazione e che abroga la direttiva 76/160/CEE. Gazzetta Ufficiale dell'Unione Europea L 64/42, 4/3/2006.
- Fleming LE, Backer LC, Baden DG. Overview of aerosolized florida red tide toxins: exposures and effects. *Environ Health Persp* 2005;113(5):618-20.
- Fukuyo Y. Taxonomic study on benthic dinoflagellates collected in coral reefs. *Bull Jpn Soc Sci Fish* 1981;47:967-78.
- Garcés E, Masó M, Vila M, Camp J. Harmful algae events in the Mediterranean: are they increasing? *HAN* 2000;20:1-10.
- Glibert PM, Allen JI, Bouwman AF, Brown CW, Flynn KJ, Lewitus AJ, Madden CJ. Modeling of HABs and eutrophication status, advances, challenges. *J Mar Syst* 2010;83:262-75.
- Hallegraeff GM. Ocean climate change, phytoplankton community responses, and harmful algal blooms: a formidable predictive challenge. *J Phycol* 2010;46:220-35.
- Honsell G, Bonifacio A, De Bortoli M, Penna A, Battocchi C, Ciminiello P, Dell'Aversano C, Fattorusso E, Sosa S, Yasumoto T, Tubaro A. New insights on cytological and metabolic features of *Ostreopsis* cf. *ovata* Fukuyo (Dinophyceae): a multidisciplinary approach. *PLoS ONE* 2013;8(2):e57291.
- ISPRA. Giornata di studio. Fioriture algali di *Ostreopsis ovata* lungo le coste italiane. Atti. Sintesi e contributi. Roma, 23 marzo 2011. Roma: Istituto Superiore per la Protezione e la Ricerca Ambientale; 2011.
- ISPRA. Giornata di studio. Presenza di fioriture algali di *Ostreopsis ovata* ed altre microalghe potenzialmente tossiche lungo le coste italiane. Atti. Roma, 28 marzo 2012. Roma: Istituto Superiore per la Protezione e la Ricerca Ambientale; 2012.

- Laza-Martinez A, Orive E, Miguel I. Morphological and genetic characterization of benthic dinoflagellates of the genera *Coolia*, *Ostreopsis* and *Prorocentrum* from the south-eastern Bay of Biscay. *Eur J Phycol* 2011;46:45-65.
- Mangialajo L, Bertolotto R, Cattaneo-Vietti R, Chiantore M, Grillo C, Lemée R, Melchiorre N, Moretto P, Povero P, Ruggieri N. The toxic benthic dinoflagellate *Ostreopsis ovata*: quantification of proliferation along the coastline of Genoa, Italy. *Mar Pollut Bull* 2008;56:1209-14.
- Mangialajo L, Ganzin N, Accoroni S, Asnaghi V, Blanfuné A, Cabrini M, Cattaneo-Vietti R, Chavanon F, Chiantore M, Cohu S, Costa E, Fornasaro D, Grossel H, Marco-Miralles F, Masó M, Reñé A, Rossi AM, Sala MM, Thibaut T, Totti C, Vila M, Lemée R. Trends in *Ostreopsis* proliferation along the Northern Mediterranean coasts. *Toxicon* 2011;57:408-20.
- Nascimento SM, França JV, Gonçalves JEA, Ferreira CEL. *Ostreopsis* cf. *ovata* (Dinophyta) bloom in an equatorial island of the Atlantic Ocean. *Mar Pollut Bull* 2012;64:1074-8.
- Osborne NJT, Webb PM, Shaw GR. The toxins of *Lingbya majuscula* and their human and ecological health effects. *Environ Int* 2001;27:381-92.
- Parson M, Aligizaki K, Dechraoui Bottein MY, Fraga S, Morton SL, Penna A, Rhodes L. *Gambierdiscus* and *Ostreopsis*: reassessment of the state of knowledge of their taxonomy, geography, ecophysiology, and toxicology. *Harmful Algae* 2012;14:107-29.
- Paz B, Riobò P, Franco JM. Preliminary study for rapid determination of phycotoxins in microalgae whole cells using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rap Comm Mass Spectr* 2011;25:3627-39.
- Penna A, Vila M, Fraga S, Giacobbe MG, Andreoni F, Riobò P, Vernesi C. Characterization of *Ostreopsis* and *Coolia* (Dinophyceae) isolates in the Western Mediterranean Sea based on morphology, toxicity and internal transcribed spacer 5.8S rDNA sequences. *J Phycol* 2005;41:212-25.
- Penna A, Fraga S, Battocchi C, Casabianca S, Riobò P, Giacobbe MG, Vernesi C. A phylogeography study of the toxic benthic genus *Ostreopsis* Schmidt. *J Biogeogr* 2010;37:830-41.
- Perini F, Casabianca A, Battocchi C, Accoroni S, Totti C, Penna A. New approach using the real-time pcr method for estimation of the toxic marine Dinoflagellate *Ostreopsis* cf. *ovata* in marine environment. *PLoS ONE* 2011;6(3):e17699.
- Rhodes L. World-wide occurrence of the toxic dinoflagellate genus *Ostreopsis* Schmidt. *Toxicon* 2011;57:400-7.
- Richlen ML, Lobel PS. Effects of depth, habitat, and water motion on the abundance and distribution of ciguatera dinoflagellates at Johnston Atoll, Pacific Ocean. *Mar Ecol Prog Ser* 2011;421:51-66.
- Sato S, Nishimura T, Uehara K, Sakanari H, Tawong W, Hariganeya N, Smith K, Rhodes L, Yasumoto T, Taira Y, Suda S, Yamaguchi H, Adachi M. Phylogeography of *Ostreopsis* along west Pacific coast, with special reference to a novel clade from Japan. *PLoS ONE* 2011;6:e27983.
- Shears NT, Ross PM. Blooms of benthic dinoflagellates of the genus *Ostreopsis*; an increasing and ecologically important phenomenon on temperate reefs in New Zealand and worldwide. *Harmful Algae* 2009;8:916-25.
- Smayda TJ. Complexity in the eutrophication-harmful algal bloom relationship, with comment on the importance of grazing. *Harmful Algae* 2008;8:140-51.
- Taylor FJR. A description of the benthic dinoflagellate associated with maitotoxin and ciguatoxin, including observations on Hawaiian material. In: Taylor DL, Seliger HH (Ed.). *Toxic Dinoflagellate Blooms*. New York: Elsevier;1979. p. 71-6.
- Totti C, Accoroni S, Cerino F, Cucchiari E, Romagnoli T. *Ostreopsis ovata* bloom along the Conero Riviera (northern Adriatic Sea): Relationships with environmental conditions and substrata. *Harmful Algae* 2010;9:233-9.

- Uchida H, Taira Y, Yasumoto T. Structural elucidation of palytoxin analogs produced by the dinoflagellate *Ostreopsis ovata* IK2 strain by complementary use of positive and negative ion liquid chromatography/quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *Rap Comm Mass Spect* 2013;27:1999-2008.
- Ukena T, Satake M, Usami M, Oshima Y, Fujita T, Naoki H, Yasumoto T. Structural confirmation of ostreocin-D by application of negative-ion fast-atom bombardment collision-induced dissociation tandem mass spectrometric methods. *Rap Comm Mass Spectr* 2002;16:2387-93.
- Usami M, Satake M, Ishida S, Inoue A, Kan Y, Yasumoto T. Palytoxin analogs from the dinoflagellate *Ostreopsis siamensis*. *J Am Chem Soc* 1995;117:5389-90.
- Vidyarathna NK, Granéli E. Physiological responses of *Ostreopsis ovata* to changes in N and P availability and temperature increase. *Harmful Algae* 2013;21:54-63.
- Vila M, Camp J, Garcés E, Masó M, Delgado M. High resolution spatio-temporal detection of potentially harmful dinoflagellates in confined waters of the NW Mediterranean. *J Plank Res* 2001;23:497-514.
- WHO. *Guidelines for safe recreational water environments. Volume 1, Coastal and freshwaters*. Geneva: World Health Organization; 2003.
- Zingone A, Enevoldsen HO. The diversity of harmful algal blooms: a challenge for science and management. *Ocean Coast Manag* 2000;43:725-48.
- Zingone A, Wyatt T. Harmful algal blooms: keys to the understanding of the phytoplankton ecology. In: Robinson AR, Brink KH (Ed.). *The sea*. Harvard: Harvard University Press; 2005. p. 867-926.
- Zingone A. Harmful algal blooms in the Mediterranean Sea: a historical overview. In: Briand F (Ed.) *Phytoplankton responses to Mediterranean environmental changes*. Monaco: CIESM, 2010. p. 19-24.