

C1. CAMPIONAMENTO E ANALISI DELLA DENSITÀ CELLULARE DI *OSTREOPSIS* CF. *OVATA*

Gioia Benedettini (a), Patrizia Borrello (b), Patrizia Ciminiello (c), Enzo Funari (d), Erika Magaletti (b), Maura Manganelli (d)*, Antonella Penna (e), Emanuela Spada (b), Cecilia Totti (f)*, Nicola Ungaro (g)

(a) *Area Vasta Costa, Agenzia Regionale per la Protezione Ambientale della Toscana, Livorno*

(b) *Dipartimento Tutela Acque Interne e Marine, Istituto Superiore per la Protezione e la Ricerca Ambientale, Roma*

(c) *Dipartimento di Farmacia, Università di Napoli Federico II, Napoli*

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

(e) *Dipartimento di Scienze Biomolecolari, Università di Urbino, Urbino*

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

(g) *Direzione Scientifica, Agenzia Regionale per la Prevenzione e Protezione Ambientale Puglia, Bari*

*maura.manganelli@iss.it; c.totti@univpm.it

Il presente capitolo aggiorna l'Allegato C del DM 30 marzo 2010 (Ministero della Salute, 2010) e fornisce indicazioni tecniche per il campionamento delle acque di balneazione interessate da fioriture di *Ostreopsis* cf. *ovata*.

Le attività di monitoraggio sono finalizzate a individuare le situazioni che possono dar luogo ad esposizioni potenzialmente rischiose per la salute di bagnanti e frequentatori delle spiagge alle tossine prodotte da *O. cf. ovata*, che come è noto possono verificarsi per via cutanea, inalatoria e orale. Per questa ragione, nelle fasi di routine e di allerta il monitoraggio deve essere basato su campioni prelevati nella colonna d'acqua (rappresentativi del rischio di esposizione cutanea e orale). Nella fase di emergenza sarebbe auspicabile anche il campionamento e l'analisi dell'aerosol.

Il campionamento del substrato bentonico viene effettuato contestualmente a quello della colonna d'acqua in acque di balneazione con fondale poco profondo dove è possibile il contatto diretto. Dove questo non è possibile (oltre 2 metri di profondità), il campionamento è discrezionale. Il campionamento dei substrati bentonici, dove queste microalghe primariamente vivono, fornisce informazioni sulla consistenza della fioritura e quindi sullo stock di cellule che potenzialmente possono passare in colonna d'acqua e nell'aerosol in seguito ad idrodinamismo e all'azione dei bagnanti. Queste informazioni insieme alle altre disponibili (vedi paragrafo B2.1) possono essere utilizzate per valutare l'estensione della fioritura e il tratto di litorale interessato.

Le attività di campionamento dovrebbero essere effettuate da giugno a settembre, con cadenza quindicinale, eventualmente ampliando o riducendo la durata sulla base dell'andamento della fioritura nelle rispettive regioni (es. nell'Adriatico settentrionale è opportuno campionare da luglio a ottobre). La frequenza andrebbe intensificata fino a 5-7 giorni durante la fioritura.

C1.1. Matrice acqua

I siti di campionamento corrispondono in generale a quelli della rete di monitoraggio delle acque di balneazione e sono selezionati sulla base dei criteri riportati nel paragrafo B2.1.

C1.1.1. Campionamento e conservazione dei campioni

Prelevare un campione di acqua di 250-500 mL per effettuare l'analisi dell'abbondanza cellulare in colonna d'acqua. Prelevare volumi maggiori se si intendono effettuare anche analisi chimiche per misurare la concentrazione di tossine o isolamenti di cellule.

Il prelievo dei campioni di acqua per l'identificazione e la conta di *Ostreopsis* può essere effettuato per immersione del recipiente, che viene aperto alla profondità desiderata, riempito e richiuso. Fino ad 1 m di profondità del sito di campionamento, è sufficiente un prelievo a circa 50 cm dalla superficie; per profondità maggiori aggiungere anche un prelievo a circa 1 m dalla superficie (facendo attenzione di essere sempre ad almeno 20 cm dal fondo). I due campioni saranno miscelati in un unico contenitore per ottenere un campione rappresentativo della colonna d'acqua, dal quale prelevare subcampioni per le varie analisi.

Il prelievo va effettuato prima del campionamento dei substrati bentonici per evitare una sovrastima della densità in acqua causata da rilascio accidentale delle cellule dal substrato.

Nel caso di osservazione di materiale in superficie (fiocchi, schiume superficiali), tale materiale dovrà essere campionato per verificare l'eventuale presenza di cellule di *O. cf. ovata*. Il tipo di prelievo effettuato (colonna d'acqua o materiale in superficie) va indicato nella scheda allegata al capitolo B3.

I campioni destinati all'analisi delle microalghe vanno fissati con soluzione di Lugol (0,5-1 mL di soluzione ogni 250 mL di campione). In alternativa, nel caso si intendano effettuare analisi in epifluorescenza e/o al microscopio elettronico a scansione (*Scanning Electron Microscope*, SEM), può essere usata formaldeide neutralizzata a una concentrazione finale assoluta dello 0,8% (far riferimento alle prescrizioni previste nel DL.vo 81/2008, Titolo IX, Capo II "Protezione da agenti cancerogeni e mutageni") (Italia, 2008).

Tutti i campioni raccolti vanno conservati al buio e a temperatura ambiente fino al trasferimento in laboratorio.

I campioni destinati alle analisi chimiche dovranno essere conservati a -20°C senza aggiungere fissativo.

I campioni destinati all'isolamento di microalghe per l'allestimento di colture dovranno essere conservati a temperatura ambiente (per 2-3 giorni al massimo) senza aggiunta di fissativo.

C1.1.2. Analisi della densità cellulare

I campioni d'acqua non richiedono ulteriori trattamenti e possono essere analizzati direttamente al microscopio. Per una corretta identificazione delle *Ostreopsidaceae* occorre effettuare la determinazione delle misure cellulari e l'analisi morfologica delle placche tecali, in microscopia ad epifluorescenza previa colorazione con fluorocromo (*Calcofluor White/Fluorescent brightener*) e/o in SEM (Steidinger & Tangen, 1997).

L'analisi dei campioni può essere eseguita seguendo il metodo Utermöhl (Zingone *et al.*, 2010) comunemente utilizzato per le analisi del fitoplancton che prevede la sedimentazione di un volume noto di campione in un sistema cilindro/camera di sedimentazione. Il conteggio va effettuato ad almeno 200 ingrandimenti sull'intera camera di sedimentazione, o su mezza camera o, in caso di elevate abbondanze cellulari, su 2-4 transetti o su n campi casuali.

La scelta del volume di campione da sedimentare (1-100 mL) e della porzione di camera da osservare variano con le abbondanze cellulari e/o con la quantità di materiale risospeso presenti nel campione, al fine di contare un numero di cellule significativo (*nota*: nel caso di fioritura il conteggio può considerarsi significativo se si contano almeno 150-200 cellule). Nel periodo pre-comparsa, può anche accadere che si contino da zero a poche cellule sull'intera camera. L'abbondanza cellulare di *O. cf. ovata* va espressa in cell/L.

C1.2. Matrice aerosol

Si fa presente che non si richiede lo svolgimento di routine di questa attività. I metodi di seguito descritti possono tuttavia rappresentare un utile riferimento per coloro che intendono approfondire questi aspetti (Ciminiello *et al.*, 2014).

C1.2.1. Campionamento di aerosol per analisi chimica

Per il campionamento di aerosol marino da sottoporre ad analisi chimica utilizzare il campionatore SAS PCR (*Surface Air System - PCR: pathogenic micro-organisms air sampler*) (PBI International). Si tratta di un campionatore portatile (alimentato a batteria), con sistema di cattura in fluido mediante impatto ricircolante. L'aria aspirata dallo strumento e il fluido di raccolta (acqua di mare sintetica) confluiscono congiuntamente attraverso un condotto a spirale e sono convogliati in un recipiente di raccolta, dove il liquido è mantenuto in costante ricircolazione per prolungare il contatto liquido/bioaerosol favorendo così il trasferimento delle tossine e/o frammenti algali dall'aerosol al fluido di raccolta. Il set di campionamento (costituito dal recipiente di raccolta, spirale di cattura, testata di campionamento e fluido) è sterile ed è a "circuito chiuso". Per ottenere la massima possibilità di cattura, effettuare il campionamento alla velocità di aspirazione di 30 L/min localizzando il campionatore liquido alla distanza di 10 m dalla riva orientato verso il mare. Il periodo di campionamento deve essere compreso tra 1,5-6 ore. I dettagli per la conduzione dell'analisi chimica sono descritti nel capitolo C3.

C1.2.2. Campionamento di Aerosol per analisi molecolare

Per il campionamento del bioaerosol da sottoporre ad analisi molecolari per la ricerca di *Ostreopsis cf. ovata* utilizzare il campionatore portatile AirCube COM2 della Analitica Instrument. Il campionatore ha un orifizio di aspirazione collegato ad un tubo al silicone lungo 15 cm alla cui estremità è inserito un apposito porta filtri. Utilizzare filtri in fibra di vetro e di quarzo di porosità 0,45 µm. Per ottenere la massima possibilità di cattura, effettuare il campionamento alla velocità di aspirazione di 30 L/min localizzando il campionatore liquido alla distanza di 10 m dalla riva orientato verso il mare. Il periodo di campionamento deve essere compreso tra 1,5-6 ore. I dettagli per la conduzione dell'analisi molecolare sono descritti nel capitolo C4.

C1.3. Matrice substrati bentonici

Nei Quaderni ISPRA "Monitoraggio di *Ostreopsis ovata* e *Ostreopsis* spp.: protocolli operativi" (ISPRA, 2012), consultabili sul sito www.isprambiente.gov.it, sono riportate le modalità per il campionamento e l'analisi secondo tre protocolli differenti. In questa sede viene riportato il metodo classico e una breve sintesi degli altri metodi. Per tutto quanto non specificato si rimanda al sopracitato documento in ottemperanza all'art. 3 del DM 30 marzo 2010 (Ministero della Salute, 2010).

C1.3.1. Metodo classico

Il metodo classico per lo studio delle dinofitiche bentoniche (Andersen & Throndsen, 2004; Totti *et al.*, 2004) è utilizzato dalla maggior parte dei ricercatori in tutto il mondo e si basa sul prelievo del substrato (es. macroalghe, angiosperme marine, sabbia, rocce, ecc.) per la quantificazione delle abbondanze delle microalghe su una porzione nota di substrato (in termini di peso e/o di superficie).

C1.3.1.1. Campionamento

Macroalghe

Prelevare possibilmente 3 repliche (distribuite entro 10 m di distanza) della stessa specie macroalgale. Ricoprire la macroalga con un sacchetto di plastica, tagliare una porzione di tallo mediante un bisturi o una spatola e chiudere prontamente il sacchetto sott'acqua per ridurre la perdita di cellule. Sarà sufficiente raccogliere una piccola porzione di tallo (circa 5-10 g). In alternativa tagliare una porzione di tallo riponendola in un barattolo con aggiunta di acqua di mare filtrata (0,22-0,45 µm) o con acqua raccolta nello stesso sito del campionamento.

Altri substrati

Raccogliere organismi bentonici che possano fungere da substrato (es. mitili) o piccole parti rocciose avvolgendoli delicatamente con un sacchetto che va prontamente richiuso. Durante il campionamento è importante evitare di toccare la superficie del substrato al fine di evitare la perdita di cellule.

C1.3.1.2. Conservazione dei campioni

Appena possibile trasferire i campioni di substrato (macroalghe, organismi bentonici, rocce) in barattoli assieme all'acqua di raccolta e/o ad acqua di mare filtrata. Tutti i campioni raccolti vanno conservati al buio e a temperatura ambiente fino al trasferimento in laboratorio. Il fissativo andrebbe aggiunto al campione d'acqua finale ottenuto dopo il trattamento per il distacco delle microalghe, che andrebbe effettuato entro le 6-8 ore dal campionamento. Se non è possibile rispettare tali tempi, è opportuno fissare il campione con formaldeide neutralizzata a una concentrazione finale assoluta del 2%. Si consiglia tuttavia di effettuare tutte le operazioni in giornata, al fine di evitare di manipolare campioni fissati con formalina, per l'utilizzo della quale occorre far riferimento alle prescrizioni previste nel DL.vo 81/2008, Titolo IX, Capo II "Protezione da agenti cancerogeni e mutageni" (Italia, 2008).

C.1.3.1.3. Trattamento dei campioni

Macroalghe

Agitare accuratamente per almeno 2 min i barattoli contenenti le macroalghe nella loro acqua di raccolta per favorire il distacco delle dinofitiche epifite. Trasferire l'acqua di raccolta in un contenitore. Risciacquare il tallo aggiungendo al barattolo acqua di mare filtrata e agitare nuovamente per altri 2 min, sempre raccogliendo l'acqua del lavaggio. Ripetere le operazioni di risciacquo per almeno tre volte, al fine di rimuovere completamente le epifite. Controllare la superficie del tallo mediante osservazione al binoculare per assicurarsi che la rimozione delle cellule sia completa. Eventualmente ripetere il trattamento con risciacqui aggiuntivi.

Annotare il volume del campione finale (acqua di raccolta del campione e acqua utilizzata per i risciacqui).

Fissare con soluzione di Lugol (0,5-1 mL di soluzione ogni 250 mL di campione) o nel caso si intendesse effettuare analisi in epifluorescenza e/o al SEM, parte del campione può essere

fissata con formaldeide neutralizzata ad una concentrazione finale assoluta dello 0,8% (v. sopra). Conservare il campione al buio e meglio se in frigorifero fino al momento del conteggio al microscopio.

Conservare una parte di campione non addizionato di fissativo a -20°C per le analisi chimiche.

Conservare una parte di campione non addizionato di fissativo a temperatura ambiente (per 2-3 giorni al massimo) per l'eventuale isolamento di microalghe e allestimento di colture.

Le macroalghe campionate vanno opportunamente identificate possibilmente a livello di specie. Dopo i trattamenti di risciacquo, determinare il peso fresco pesando la macroalga, previo sgocciolamento su carta assorbente per rimuovere l'acqua in eccesso. Si consiglia di appoggiare il tallo tra due fogli di carta assorbente senza fare pressioni per un paio di minuti (va eliminata solo l'acqua esterna). Se sono presenti più specie macroalgali insieme, queste ove possibile vanno pesate separatamente. Se possibile, determinare anche la superficie del tallo secondo Accoroni *et al.* (2011).

Altri substrati

Togliere delicatamente dal barattolo il substrato da analizzare, senza toccarne la superficie, avendo cura di conservare l'acqua di raccolta, dato che potrebbe contenere cellule distaccate.

Rimuovere le cellule raschiando la superficie del substrato tramite un raschietto o una lametta e sciacquando accuratamente con acqua di mare filtrata. Il grattato e l'acqua usata per i risciacqui vanno trasferiti in un barattolo assieme all'acqua di raccolta.

Annotare il volume di campione finale. Aggiungere il fissativo e conservare il campione come per i campioni di macroalghe.

Quindi misurare il più accuratamente possibile l'area del substrato sottoposta a grattaggio mediante l'uso di un comune metro da sarta, riferendola alla forma geometrica più opportuna.

C.1.3.1.4 Analisi e conteggio

L'identificazione e il conteggio delle dinofitofite potenzialmente tossiche vengono eseguiti al microscopio ottico rovesciato secondo il metodo Utermöhl (Zingone *et al.*, 2010) (vedi paragrafo C.1.1.2.).

I risultati vengono infine espressi come segue:

– *Substrato duro*

numero di cellule per unità di superficie (cell/cm²)

$$\text{cell/cm}^2 = \left(\frac{c_{\text{cont}} * \text{fattore} * \text{vol}_{\text{fin}}}{\text{vol}_{\text{sed}}} \right) / \text{area}$$

– *Macroalghe*

numero di cellule per grammo di peso fresco (cell/g fw)

$$\text{cell/g fw} = \left(\frac{c_{\text{cont}} * \text{fattore} * \text{vol}_{\text{fin}}}{\text{vol}_{\text{sed}}} \right) / \text{fw}$$

o numero di cellule per unità di superficie (cell/cm²);

$$\text{cell/cm}^2 = \left(\frac{c_{\text{cont}} * \text{fattore} * \text{vol}_{\text{fin}}}{\text{vol}_{\text{sed}}} \right) / \text{area}$$

dove: c_{cont} = cellule contate

fattore = rapporto tra area della camera e area esplorata (1 o 2 transetti, n campi casuali, 1/2 camera, 1 camera); se si osserva tutta la camera il fattore è = 1

vol_{fin} = volume finale del campione (mL)

vol_{sed} = volume di campione sedimentato (mL)
 fw = peso fresco del tallo (g)
 $area$ = area del substrato (cm²)

Esempio: se da un campione di acqua dal volume di 500 mL (ottenuto da una macroalga avente peso fresco di 5 g), si sedimentano 10 mL e si contano 300 cellule di *Ostreopsis* su mezza camera (fattore = 2), l'abbondanza cellulare sarà 6.000 cell/g fw.

Per le macroalghe, solitamente si usa esprimere le abbondanze delle epifite come numero di cellule per grammo di peso (fresco o secco). Tuttavia, considerando che le macroalghe hanno talli molto diversificati (per forma, consistenza, grado di ramificazione ecc.), esprimere le abbondanze delle epifite in tal modo non consente di fare dei corretti paragoni tra specie diverse di macroalghe. L'espressione delle abbondanze per unità di superficie di substrato è sicuramente preferibile, anche perché consentirebbe di paragonare le abbondanze sulle macroalghe con quelle su substrato duro (es. substrati rocciosi, gusci di molluschi, ecc.).

C1.3.2. Metodo della siringa

Il metodo della siringa si basa sull'aspirazione, tramite siringa, delle cellule adese al substrato direttamente dallo stesso. Rappresenta un metodo semiquantitativo in quanto i valori di abbondanza cellulare che si ottengono non sono riferibili né ad un unità di peso né di superficie del substrato campionato. Questo metodo presenta tuttavia numerosi vantaggi in termini di praticità, in quanto non prevede la raccolta e il successivo trattamento dei substrati, abbreviando notevolmente i tempi di analisi. Inoltre permette di campionare substrati diversi utilizzando un metodo non distruttivo. Da una comparazione con i risultati ottenuti tramite il metodo classico è stata ottenuta una buona correlazione, con pattern spaziali e temporali altamente sovrapponibili (Abbate *et al.*, 2012). Per i dettagli del metodo si rimanda al protocollo ISPRA (2012).

C1.3.3. Metodo della Falcon

Il metodo della provetta Falcon (proposto da Zingone A., Regione Campania) rappresenta una semplificazione del metodo classico, presentando delle innovazioni sia per le modalità di raccolta del materiale, sia per il metodo di conteggio e interpretazione dei risultati. Tale metodo si basa sulla raccolta di frammenti di substrato macroalgale in un contenitore standard (un tubo Falcon). I vantaggi di questo metodo sono di poter osservare rapidamente, eventualmente anche con microscopi da campo, un numero elevato di campioni, permettendo di individuare prontamente tratti di costa che richiedono attenzione. La correlazione con i risultati ottenuti con il campionamento classico è buona, e i pattern spaziali e temporali che risultano da entrambi i metodi sono del tutto paragonabili. Per i dettagli del metodo si rimanda al protocollo ISPRA (2012).

Bibliografia

- Abbate M, Bordone A, Cerrati G, Di Festa T, Melchiorre N, Pastorelli AM, Peirano A, Petruzzelli R, Ungaro N. A new method for sampling potentially toxic benthic dinoflagellates. *Cryptogamie, Algologie* 2012;33(2):165-70.
- Accoroni S, Romagnoli T, Colombo F, Pennesi C, Di Camillo CG, Marini M, Battocchi C, Ciminiello P, Dell'Aversano C, Dello Iacovo E, 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.
- Andersen P, Throndsen J. Estimating cell numbers. In: Hallegraeff GM, Anderson DM, Cembella AD (Ed.). *Manual on harmful marine microalgae*. Paris, France: United Nations Educational, Scientific and Cultural Organization, 2004. (UNESCO, Monographs on oceanographic methodology). p. 99-129.
- Ciminiello P, Dell'Aversano C, Dello Iacovo E, Fattorusso E, Forino M, Tartaglione L, Benedettini G, Onorari M, Serena F, Battocchi C, Casabianca S, Penna A. First finding of *Ostreopsis* cf. *ovata* toxins in marine aerosols. *Environ Sci Tecnol* 2014 (in corso di stampa).
- ISPRA. *Monitoraggio di Ostreopsis ovata e Ostreopsis spp.: protocolli operativi*. Roma: Istituto Superiore per la Protezione e la Ricerca Ambientale; 2012. (ISPRA, Quaderni – Ricerca marina 5/2012).
- Italia. Decreto legislativo 9 aprile 2008, n. 81. Attuazione dell'articolo 1 della legge 3 agosto 2007, n. 123, in materia di tutela della salute e della sicurezza nei luoghi di lavoro. *Gazzetta Ufficiale* n.101 del 30 aprile 2008 - Suppl. Ordinario n. 108.
- Ministero della Salute. Decreto 30 marzo 2010. Definizione dei criteri per determinare il divieto di balneazione, nonché modalità e specifiche tecniche per l'attuazione del decreto legislativo 30 maggio 2008, n. 116, di recepimento della direttiva 2006/7/CE, relativa alla gestione della qualità delle acque di balneazione. *Gazzetta Ufficiale - Serie Generale* n. 119, del 24 maggio 2010.
- Steidinger KA, Tangen K. Dinoflagellates. In: Tomas CR (Ed.). *Identifying marine phytoplankton*. San Diego: Academic Press; 1997. p. 387-584.
- Totti C, De Stefano M, Facca C, Ghirardelli LA. Microphytobenthos. *Biol Mar Mediterr* 2004;11(s1):247-66.
- Zingone A, Totti C, Sarno D, Cabrini M, Caroppo C, Giacobbe MG, Lugliè A, Nuccio C, Socal G. Fitoplancton: metodiche di analisi quali-quantitativa. In: Socal G, Buttino I, Cabrini M, Mangoni O, Penna A, Totti C (Ed.). *Metodologie di campionamento e di studio del plancton marino*. Roma: Istituto Superiore per la Protezione e la Ricerca Ambientale; 2010 (ISPRA, Manuali e linee guida 56/2010) p. 213-37.