

X Convegno Nazionale SIRAM

Società Italiana di Ricerca Applicata alla Molluschicoltura
«Molluschicoltura fra tradizione e innovazione»

Atti del Convegno



Foto Valentina Piras

siram
società italiana
ricerca applicata
molluschicoltura



Cagliari, 13-14 ottobre 2023

**Sede congresso: ex Manifattura Tabacchi
Viale Regina Margherita, 33**



Foto Cristina Isola

ATTI

X Convegno Nazionale SIRAM Società Italiana di Ricerca Applicata alla Molluschicoltura

«Molluschicoltura fra tradizione e innovazione»

Cagliari, 13-14 ottobre 2023

Sede congresso: ex Manifattura Tabacchi, viale Regina Margherita, 33

Segreteria Scientifica Convegno:

Giuseppe Prioli – AMA

Tommaso Petochi – ISPRA

Laura Bille – IZSVe

Stefano Carboni – IMC

Manuela Dalla Pozza – IZSVe

Domenico Meloni – UNISS

Daniela Mandas – IZS Sardegna-Cagliari

Segreteria Organizzativa Convegno:

Manuela Dalla Pozza – IZSVe

Alessandra Silvagni – IZSVe

Direttivo SIRAM

Giuseppe Prioli (Presidente)
Tommaso Petoichi (Vice-presidente)
Laura Bille (Segretario-tesoriere)
Francesca Barchiesi
Fabio Borghesan
Piergiorgio Fumelli
Domenico Meloni
Paola Venier
Alessia Vetri

Collegio Sindacale

Cesare Ciccarelli (Presidente)
Eleonora Franzago

Supplenti:

Alessandro Gorla

Collegio dei Probiviri

Manuela Dalla Pozza
Andrea Fabris
Otello Giovanardi (Presidente)

PATROCINI



SPONSOR



PROGRAMMA

**Programma Convegno
Venerdì 13 ottobre 2023**

- 13.30 - 14.00 **Registrazione dei partecipanti**
14.00 - 14.30 **Saluto del Presidente SIRAM e delle Autorità**

"Interazione salute e ambiente in molluschicoltura"

Chairman: Tommaso Petochi

- 14.30 - 14.50 Le attività WOAAH: panoramica sulle interazioni con la molluschicoltura (**Mario Latini** - WOAAH Sub Regional Office for Central Asian)
14.50 - 15.10 Monitoraggio del fitoplancton potenzialmente tossico e accumulo di biotossine marine in molluschi bivalvi vivi allevati e commercializzati in Sardegna" (**Pina Lorenzoni** - IZS SARDEGNA)
15.10 - 15.30 Molluschi bivalvi sentinelle di antibiotico resistenza (**Francesca Leoni** - IZSUM)

15.30 - 16.00 Coffee break

Chairman: Laura Bille - Manuela Dalla Pozza

- 16.00 - 17.00 **Relazione orale di 5 poster** selezionati dal comitato scientifico

Chairman: Giuseppe Prioli

- 17.00 - 17.20 L'allevamento della vongola verace 'mediterranea' (*Ruditapes decussatus*) in ambiente controllato, un esempio di sinergia tra ricerca e aziende (**Sonia Murgia** - AGRIS SARDEGNA)
17.20 - 17.35 Implementazione dell'art. 111 del D.lgs. 152/2006 sui criteri relativi al contenimento degli impatti sull'ambiente dell'acquacoltura e risvolti per la molluschicoltura (**Tommaso Petochi** - ISPRA)
17.35 - 17.50 Emergenza granchio blu: indagini ISPRA-ARPAV in aree di venericoltura del Polesine (**Stefania Chiesa** - ISPRA)
17.50 - 18.20 Discussione generale sulle relazioni del pomeriggio

18.20 Chiusura lavori

18.20 - 19.30 Direttivo SIRAM, Assemblea dei soci

20.45 Cena sociale

Sabato 14 ottobre 2023
"Nuove ricerche in molluschicoltura"

Chairman: Paola Venier

- 09.00 - 09.20 Ricerca Applicata al servizio del territorio: i progetti 'Cluster' per il potenziamento e la diversificazione dell'ostricoltura in Sardegna (**Philip Graham** - IMC)
- 09.20 - 09.40 Presenza/assenza di geni (PAV) nella risposta adattativa di bivalvi di acquacoltura (**Marco Gerdol** - UNITS)
- 09.40 - 10.00 Modello predittivo per il bioaccumulo di Acido Okadaico in *Mytilus galloprovincialis* allevati nel nord Adriatico: uno strumento per ridurre le perdite di produzione e migliorare la gestione dell'allevamento in caso di bloom algali (**Domitilla Pulcini** - CREA)

Chairman: Tommaso Petochi

10.00 - 11.00 **Relazione orale di 5 poster** selezionati dal comitato scientifico

11.00 - 11.30 Coffee break

Chairman: Domenico Meloni

- 11.30 - 11.50 Risposta antivirale e ruolo delle proteine ADAR in molluschi bivalvi (**Paola Venier** - UNIPD DIBIO)
- 11.50 - 12.10 Presente e futuro del miglioramento genetico applicato all'allevamento dei bivalvi: quali specie, quali caratteri, quali schemi di selezione? (**Massimo Milan** - UNIPD BCA)
- 12.10 - 12.40 Discussione generale sulle relazioni del mattino
- 12.40 - 13.00 Premiazione miglior poster
- 13.00 Chiusura convegno

POSTER PRESENTATI

- 1. Associazione di *Vibrio aestuarianus* a lesioni tissutali in ostriche (*Crassostrea gigas*) allevate in Sardegna mediante tecniche molecolari e di ibridazione *in situ***
G. Asara, D. Mandas, F. Salati, C. Murgia, M. Polinas, R. Zobba, G.P. Burrai, A. Alberti, A. Ruiu, E. Antuofermo
- 2. Studio sulla correlazione tra parametri chimico-fisici e presenza di alghe potenzialmente tossiche**
B. Bertasi, M. Cangini, L. Ragni, S. Arnaboldi, D. Ippoliti, G. Dell'Orfano, P. Rizzi, F. Barsi, S. Rubini
- 3. Campionamento ufficiale di molluschi bivalvi vivi da parte dell'OSA e consegna all'Autorità competente al punto di sbarco: proposta di una procedura con documentazione delle attività di prelievo mediante video georiferito o videochiamata**
L. Bille, C. Casarotto, M. Bassan, M. Corazza, D. Marchesan, A. Ristori, G. Fornasiero, C. Ceolin, P. Fumelli, A. Crepaldi, A.L. Amorena, E. Franzago, G. Lunardelli, M. Dalla Pozza, N. Ferré, G. Manca, G. Arcangeli
- 4. Analisi e significato antivirale dell'RNA editing mediato dalla proteina ADAR1 e utilità della spettroscopia ¹H-NMR in molluschi bivalvi**
E. Bortoletto, R. Frizzo, U. Rosani, P. Venier
- 5. AMBITI-BIVALVI-VENETO**
Integrazione del portale regionale sullo stato sanitario delle zone di produzione dei molluschi bivalvi
C. Casarotto, M. Bassan, L. Bille, E. Franzago, M. Toson, G. Lunardelli, N. Ferrè, M. Trolese, M. Mazzucato, M. Ruzza, S. Rizzo, G. Manca, M. Dalla Pozza, G. Arcangeli
- 6. Sistema di Early Warning del rischio biotossicologico nel monitoraggio delle aree di produzione di molluschi bivalvi vivi adottato dalla AST Ascoli Piceno**
C. Ciccarelli, A.M. Semeraro, V. Di Trani, A. Antonini, E. Ciccarelli
- 7. Verifica e validazione di punti di campionamento rappresentativi per il monitoraggio delle zone di produzione della Regione Friuli Venezia Giulia mediante valutazione di dati analitici di tre anni con utilizzo di mappe in formato pdf a livelli**
M.T. Colasanto, F. Costanzo, L. Bille, C. Casarotto, M. Toson, L. Pelagatti, M. Ricci
- 8. Confronto di diverse tecnologie per il pre-ingrasso di seme di vongola verace**
A. De Marco, L. Aguiari, E. Scarpa, R. Urbini, S. Natale, A. Bonaldo
- 9. Interazioni tra le Tartarughe Marine e le attività di Mitilicoltura: prima ricerca Italiana**
L. Di Renzo, G. Mariani, M. Matiddi, C. Silvestri, E. Nerone, S. Recchi, G. Mascilongo, F. Pizzurro, C. Profico, C. Giansante, G. Di Francesco, F. Di Giacinto, N. Ferri, G. Prioli, G. Gioacchini
- 10. Attività di monitoraggio delle aree classificate per molluschi bivalvi nel medio Adriatico nel periodo 2020 – 2022**
P. Di Taranto, G. Torzi, W. Di Nardo, F. Di Fonzo, F. Pagano, M. Genovesi, F. Barbone, Q. Rossi, L. Di Renzo, E. Nerone, R. Nardella, G. Normanno, A. Parisi

- 11. Molluschicoltura Multitrofica Sostenibile-Gargano (Mol.Mul.SOS-Gargano)**
M. Francavilla, P. Marasco, D. Racca, M. Marone, F. Contillo, G. Paziienza, D.P. Debernardis, G. Normanno
- 12. Valutazione dei risultati del monitoraggio igienico sanitario per la ricerca di metalli pesanti in molluschi bivalvi prodotti in Veneto dal 2014 al 2022**
E. Franzago, M. Toson, G. Binato, A. Gallina, M. Corazza, G. Fornasiero, A. Ristori, P. Fumelli, A.L. Amorena, G. Lunardelli, M. Dalla Pozza, G. Arcangeli, L. Bille
- 13. Valorizzazione dei bivalvi prodotti in Puglia: indagine sullo stato sanitario ed influenza di fattori climatico-ambientali sullo sviluppo di patogeni. Implicazione sulla salute degli allevamenti e sulla salute pubblica**
L. Guarino, G. Arcangeli, G. La Salandra, F.C. Basile, A.M. Iacono, A. Vetri
- 14. Identificazione di serpulidi in molluschi bivalvi allevati**
L. Iacobucci, F. Tosi, G. Arcangeli
- 15. Impiego della valvometria non invasiva per la valutazione dell'effetto della refrigerazione in condizioni ipossiche sul movimento di *gaping* valvare di mitili di allevamento**
L. Lanci, F. Mosca¹, T. Bouma, P.G. Tiscar
- 16. Il progetto cozza selvaggia**
L. Lanci, F. Mosca, C.J. Di Pasquale, G. Sacchetti, A. Papa, R. Morselli, P. Besutti, E. G. Rosafio, A. Ciccarelli, M. Di Domizio, S. Busetti, C. Di Pietro, P. G. Tiscar
- 17. Equilibri in laguna: sfruttare i resoconti etnografici relativi alla molluschicoltura nell'implementazione di politiche veterinarie tenendo conto del significato culturale del lavoro**
S. Latini
- 18. Obiettivi e finalità della Ricerca Finalizzata: Risk mitigation Strategies and Tools for an Ongoing Problem. Tetrodotoxins (TTXs), a group of emerging toxins in live bivalve mollusks intended for human consumption (STOPTTXs)**
Progetto finanziato dal Ministero della Salute – bando 2021- Direzione Generale della ricerca e dell'innovazione in sanità – project code RF-2021-12373885
C. Losasso, P. Antonelli, L. Iacobucci, F. Tosi, A. Vetri, B. Salerno, A. Peruzzo, A. Tubaro, S. Sosa, M. Pelin, S. Dall'Ara, M. Cangini, E. Testai, M. Manganeli, S. Scardala, G. Arcangeli
- 19. Ricerca di microplastiche in telline (*Donax trunculus*) raccolte lungo il litorale toscano nel contesto delle attività di monitoraggio ufficiale**
*C. Malloggi, M. Guidi, S. Bartalena, A. Giusti, L. Nalbone, F. Giarratana, F. Susini, A. Armani**
- 20. Sicurezza alimentare dei molluschi bivalvi prodotti nel Golfo della Spezia: patogeni virali classici ed emergenti**
C. Masotti, R. Battistini, L. Serracca, E. Costa, M. Orlandi, E. Suffredin, C. Ercolini
- 21. Esposizione di *Mytilus galloprovincialis* alle microplastiche: Accumulo, Depurazione e Valutazione dei livelli di espressione di una selezione di biomarcatori molecolari**
F. Pizzurro, E. Nerone, M. Ancora, M. Di Domenico, L.F. Mincarelli, R. Salini, L. Di Renzo, F. Di Giacinto, C. Corbau, S. Recchi

- 22. Trend temporali e geografici di acido Okadaico e Yessotossine nei mitili della costa marchigiana: il ruolo delle piogge come possibile strumento di previsione**
M. Siracusa, S. Bacchiocchi, M. E. Giuliani, E. Calandri, L. Ferroni, M. Ciriaci, T. Tivoloni, S. Gorbi, C. Maresca, F. Barchiesi, A. Piersanti
- 23. Presenza di tossine lipofile in molluschi bivalvi allevati e commercializzati nella Regione Sardegna dal 2016 al 2022**
B. Soro, B. Vodret, G. Lorenzoni, A.G. Mudadu, R. Melillo, G. Piras, S. Salza, G. Chessa, S. Virgilio, S. Cau
- 24. Fitoplancton potenzialmente tossico nelle mitilocolture del Golfo di Trieste: analisi preliminari della serie temporale in rapporto al contesto ambientale e climatico**
L. Tondelli, O. Blasutto, N. Bettoso, A. Acquavita, C. Orlandi
- 25. Piano di rilancio dell'ostricoltura nazionale: verifica dello stato di salute delle ostriche in diversi ambienti produttivi**
F. Tosi, A. Vetri, L. Iacobucci, G. Arcangeli
- 26. *Perkinsus olseni* associato a mortalità in mitili (*M. galloprovincialis*) allevati in Nord-Adriatico**
A. Vetri, E. Scrima, E. Agostini, L. Cortinovis, G. Arcangeli, T. Pretto

**ABSTRACT
POSTER**

Associazione di *Vibrio aestuarianus* a lesioni tissutali in ostriche (*Crassostrea gigas*) allevate in Sardegna mediante tecniche molecolari e di ibridazione *in situ*

G. Asara^{1,2}, D. Mandas^{1,3}, F. Salati¹, C. Murgia², M. Polinas², R. Zobba², G.P. Burrai², A. Alberti², A. Ruiu¹, E. Antuofermo²

¹) Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sardegna, Sezione di Oristano

²) Università degli Studi di Sassari, Dipartimento di Medicina Veterinaria

³) Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sardegna, Sezione di Cagliari

Keywords: ostrica concava, vibriosi, ibridazione *in situ*, istologia, acquacoltura

Introduzione

L'ostrica concava (*Crassostrea gigas*) è la specie maggiormente allevata con una produzione mondiale annua di circa 4.7 milioni di tonnellate [1, 2]. Questo settore è spesso interessato da episodi di mortalità talvolta associate a batteri del genere *Vibrio* [3, 4, 5] e responsabili di ingenti perdite economiche in allevamento. In particolare, *Vibrio aestuarianus* subsp. *francensis* è stato identificato come agente patogeno in grado di causare mortalità ricorrente nelle ostriche adulte a partire dal 2001 in Francia e, ad oggi, riportato in tutti i paesi europei [6, 7]. Tuttavia, differenti studi attribuiscono queste morie all'interazione sinergica di fattori ambientali e di agenti patogeni non solo batterici ma anche virali [8; 9]. Il ruolo emergente del *V. aestuarianus* negli episodi di mortalità massive in allevamento, e le evidenze molecolari e istopatologiche riscontrate prevalentemente a carico del mantello e delle branchie, caratterizzate da un infiltrato infiammatorio emocitario, rappresentano attualmente le poche informazioni che la letteratura fornisce sulla localizzazione del patogeno [7, 10], rendendo evidente la necessità di chiarire i meccanismi di azione di questo patogeno nelle ostriche *Crassostrea gigas* [7, 11]. Sebbene la patogenesi sia poco nota [12], *V. aestuarianus* sembrerebbe colonizzare la branchia e i tessuti del mantello e, attraverso le vie emolinfatice, determinare setticemia [7, 10, 12, 13].

Lo sviluppo di tecniche *in situ* per identificare e localizzare i patogeni del genere *Vibrio*, appare necessario per una migliore comprensione dell'eziologia e della malattia nell'ostrica e per lo sviluppo di sistemi diagnostici tempestivi e affidabili [14, 15].

Gli obiettivi di questo studio sono stati quelli di utilizzare un sistema colorimetrico di ibridazione *in situ* (ISH) per identificare la presenza di *Vibrio* spp. in *C. gigas*, evidenziare la localizzazione tissutale del patogeno e associare il segnale al grado di flogosi emocitaria.

Summary

Annually, there are reports of oyster mortality incidents on farms worldwide attributed to shifts in environmental conditions and the impact of various pathogens. This research investigates a significant mass mortality event that occurred among Pacific oysters being farmed in Sardinia. We assess the potential involvement of *Vibrio aestuarianus* within gill and mantle tissues by employing a combination of biomolecular techniques, histopathological examination, and *in situ* hybridization methods. These approaches help us gain insight into the increased potential involvement of *V. aestuarianus* in oyster mortality.

Materiali e metodi

Sono stati presi in considerazione 28 campioni di ostriche (*Crassostrea gigas*), giovanili ed adulte, prelevati a seguito di un episodio di moria verificatosi tra ottobre 2016 e giugno 2018 con temperature dell'acqua comprese tra i 13 e i 14°C, nella laguna di San Teodoro, una delle aree più dedicate all'allevamento di ostriche in Sardegna. I campioni sono stati suddivisi in due aliquote utilizzate per le indagini biomolecolari, istopatologiche e di ISH. In particolare, il DNA estratto da porzioni di branchie e mantello è stato utilizzato per la ricerca molecolare e la quantificazione di *Vibrio aestuarianus* e *V. splendidus* mediante PCR. I campioni in cui è stata evidenziata la presenza di *V. aestuarianus* sono stati quantificati mediante PCR real time (qPCR), utilizzando una curva standard con campioni a concentrazione nota. Sezioni trasversali di ciascun campione sono state fissate in formalina tamponata al 10%, incluse in paraffina, sezionate a 3 µm e, successivamente, colorate con Ematossilina-Eosina per le analisi istologiche. In particolare, è stato utilizzato un grading semiquantitativo basato sulla distribuzione (nodulare, multifocale e diffusa) e la quantificazione (lieve, moderato, grave) dell'infiltrato infiammatorio emocitario. Su 15 di 28 (54%) campioni risultati positivi in qPCR al *V. aestuarianus* è stata applicata la tecnica di ibridazione *in situ* (ISH) chiamata RNAscope® per il rilevamento colorimetrico su sezioni istologiche del genoma di *Vibrio* spp., utilizzando una sonda specificatamente disegnata per legarsi alla sequenza compresa tra 1233–1316 nucleotidi del gene 16S ribosomal RNA (GenBank: NR_029254).

Risultati e discussione

L'analisi istologica ha consentito di evidenziare una risposta infiammatoria nel mantello degli esemplari con una positività in qPCR al *Vibrio aestuarianus*. In particolare, nel 29% (8/28) dei soggetti il mantello era espanso da un moderato a grave, da nodulare a multifocale infiltrato infiammatorio prevalentemente emocitario. Inoltre, tutti i campioni con risposta infiammatoria di intensità moderata o grave, all'analisi quantitativa in PCR real time presentavano una concentrazione di *V. aestuarianus* uguale o superiore a 10^4 copie/ μ l. L'ibridazione *in situ* ha evidenziato la presenza di *Vibrio* spp. associato al processo infiammatorio nel mantello e nelle branchie in 5/15 (33%) soggetti, con una intensità più marcata nelle ostriche con flogosi da moderata a grave. Inoltre, negli stessi campioni si è osservata una diffusa positività nel connettivo perighiandolare della ghiandola digestiva. La presenza di patogeni del genere *Vibrio* nel mantello e nelle branchie rilevata in ISH in associazione ai risultati di qPCR che identificano *V. aestuarianus* nei campioni esaminati, consentono di associare questo patogeno al grave processo infiammatorio. In conclusione, la metodica *in situ* ha consentito di associare la vibriosi esclusivamente al patogeno *V. aestuarianus*, rinforzando l'ipotesi infettiva quale causa primaria e, eventualmente, sinergica ai fattori ambientali nella moria delle ostriche oggetto di studio.

Bibliografia

- [1] Edwards E. (2005). World shellfish production keeps growing. Fish Farming International, Vol. 32 (1): p 38.
- [2] Mesnil A, Jacquot M, Garcia C, Tourbiez D, Canier L, Bidois A, Dégremont L, Cheslett D, Geary M, Vetri A, Roque A, Furones D, Garden A, Orozova P, Arzul I, Sicard M, Charrière G, Destoumieux-Garzón D, Travers MA (2022). Emergence and clonal expansion of *Vibrio aestuarianus* lineages pathogenic for oysters in Europe. bioRxiv 2022.04.04.486953; doi: <https://doi.org/10.1101/2022.04.04.486953>.
- [3] Bruto M, James A, Petton B, Labreuche Y, Chenivresse S, Alunno-Bruscia M, Polz MF, Le Roux F (2017). *Vibrio crassostreae*, a benign oyster colonizer turned into a pathogen after plasmid acquisition. The ISME Journal 11:1043-1052.
- [4] Petton B, Bruto M, James A, Labreuche Y, Alunno-Bruscia M, Le Roux F (2015). *Crassostrea gigas* mortality in France: the usual suspect, a herpes virus, may not be the killer in this polymicrobial opportunistic disease. Frontiers in microbiology 6:686.
- [5] Kett G, Culloty S, Jansen M, Lynch S (2022). Development of a sensitive polymerase chain reaction (PCR) and digoxigenin (DIG)-labeled in situ hybridization (ISH) for the detection of *Vibrio* bacteria in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*, Aquaculture Reports, Volume 22, 2022, 100961, ISSN 2352-5134, <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2021.100961>.
- [6] Lasa A, di Cesare A, Tassistro G, Borello A, Gualdi S, Furones D, Carrasco N, Cheslett D, Brechon A, Paillard C, Bidault A, Pernet F, Canesi L, Edomi P, Pallavicini A, Pruzzo C, Vezzulli L (2019). Dynamics of the Pacific oyster pathobiota during mortality episodes in Europe assessed by 16S rRNA gene profiling and a new target enrichment next-generation sequencing strategy. Environ Microbiol 21:4548-4562.
- [7] Mandas D, Salati F, Polinas M, Sanna MA, Zobba R, Burrai GP, Alberti A, Antuofermo E (2020). Histopathological and Molecular Study of Pacific Oyster Tissues Provides Insights into *V. aestuarianus* Infection Related to Oyster Mortality. Pathogens 9, 492; doi:10.3390/pathogens9060492.
- [8] Barbosa Solomieu V, Renault T, Travers M.A. (2015). Mass mortality in bivalves and the intricate case of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. Journal of Invertebrate Pathology 131, 2–10.
- [9] Wang H, Yang B, Li X, Li Q, Liu S. (2021). Screening of bacterial pathogens associated with mass summer mortality of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, in China. Aquaculture Reports, Volume 20, 100672, ISSN 2352-5134.
- [10] Parizadeh L, Tourbiez D, Garcia C, Haffner P, Dégremont L, Le Roux F, Travers M.A. (2018). Ecologically realistic model of infection for exploring the host damage caused by *Vibrio aestuarianus*. Environmental Microbiology 00(00), 1–9.
- [11] McCleary S, Henshilwood K, (2015). Novel quantitative TaqMan® MGB real-time PCR for sensitive detection of *Vibrio aestuarianus* in *Crassostrea gigas*. Dis. Aquat. Organ. 114, 239–248.
- [12] Lupo C, Travers M.A, Tourbiez D, Barthélemy C.F, Beaunée G, Ezanno, P. (2019). Modeling the transmission of *vibrio aestuarianus* in pacific oysters using experimental infection data. Front. Vet. Sci. 6, 142.
- [13] Romalde J.L, Barja J.L. (2010). Bacteria in molluscs: good and bad guys. pp. 136–147.
- [14] EFSA, (2010). Scientific opinion on the increased mortality events in Pacific oysters. Eur. Food Saf. Auth. J. 8, 1–60.
- [15] EFSA, (2015). EFSA AHAW panel (EFSA Panel on Animal Health and Welfare), 2015. Scientific opinion on oyster mortality. EFSA J. 2015 13 (6), 59.

Studio sulla correlazione tra parametri chimico-fisici e presenza di alghe potenzialmente tossiche

B. Bertasi¹, M. Cangini², L. Ragni¹, S. Arnaboldi¹, D. Ippoliti², G. Dell'Orfano³, P. Rizzi³, F. Barsi⁴, S. Rubini⁴

¹ Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna – Brescia

² Fondazione Centro Ricerche Marine – Cesenatico (FC)

³ Azienda USL Ferrara – U.O.C. Igiene Alimenti di Origine Animale

⁴ Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna – Ferrara

Keywords: fitoplancton, *Dinophysis*, temperatura, parametri chimico-fisici

Introduzione

Lo studio di come avvengono i cambiamenti dei vari fattori che condizionano l'ambiente marino è divenuto sempre più importante negli ultimi anni, dato l'avanzare dei cambiamenti climatici, a cui consegue uno sviluppo anomalo di alcune specie autoctone e l'insediarsi di specie alloctone. Le attività antropiche ovviamente contribuiscono anch'esse in maniera pesante alle variazioni dei parametri chimico-fisici e biologici che caratterizzano l'ecosistema marino. Dal punto di vista della salute pubblica diventa fondamentale cercare di correlare alcuni dei fattori sopramenzionati con lo sviluppo e la diffusione delle microalghe potenzialmente in grado di produrre tossine, alcune di esse storicamente e ciclicamente presenti nei mari nazionali. Può però diventare molto difficoltoso procedere a questo tipo di correlazione in quanto, oltre a parametri convenzionali e più facilmente misurabili quali la temperatura dell'acqua, il pH ecc., possono intervenire fattori e condizioni "occulte" o più difficilmente verificabili. Fra i generi di microalghe maggiormente implicati in episodi di intossicazione ricordiamo in particolare le Dinophyceae le quali, a differenza di altri organismi fitoplantici che nell'ultimo triennio sono stati rilevati raramente, continuano in certi periodi ad essere presenti, nonostante anch'esse manifestino un calo rispetto al passato. Scopo del presente lavoro è stato quello di valutare la presenza di *Dinophysis* spp. nel triennio 2020-2022 attraverso i dati ottenuti nell'ambito dei monitoraggi annuali effettuati presso le aree di allevamento dei molluschi bivalvi nella regione Emilia-Romagna, e di verificarne la correlazione con i parametri chimico-fisici rilevati in concomitanza dei prelievi, esplorando la possibilità dell'utilizzo di modelli per lo studio delle interazioni fra ambiente e fitoplancton.

Summary

The study of chemical-physicals parameters in the marine environment has become increasingly important in recent years, due to the advance of climate change resulting in anomalous development of some native species and the establishment of alien species. For the protection of public health, it becomes essential to try to correlate some of the chemical-physicals factors with the development and diffusion of microalgae potentially capable of producing toxins, some of which are historically and cyclically present in Italian seas. During the period 2020-2022, 606 water samples were collected from different sampling areas in the coastal areas of Emilia-Romagna region (northern Italy) dedicated to the harvesting of bivalve mollusks. The chemical-physical parameters collected during sampling were represented by salinity, dissolved oxygen, pH, water temperature and air temperature. Data processing was conducted using the open source R program (version 4.2.0) on data relating to the presence/absence of *Dinophysis* spp., one of the microorganisms that presented positivity in numbers compatible with the sample size necessary for the application of a model logistics. The model applied and Fisher test suggested a correlation between water temperature and *Dinophysis* presence, confirming the possibility of using these models to study the influence of environmental factors on the spread of potentially dangerous algae.

Materiali e metodi

Durante il triennio 2020-2022 sono stati raccolti 606 campioni di acqua da differenti aree di prelievo delle zone costiere dell'Emilia-Romagna dedicate all'allevamento o alla raccolta di molluschi bivalvi. Tali campioni sono stati prelevati mediante tecnica del campione integrato e analizzati mediante microscopia ottica per verificare la presenza dei microalghe il cui controllo è previsto dalla vigente legislazione. I campioni sono stati raccolti in quantità paragonabili nei differenti periodi stagionali, in numero leggermente inferiore in autunno in quanto le aree di allevamento avevano esaurito il prodotto di taglia commerciale e, di conseguenza, anche i campionamenti sono stati sospesi. Fra questi in particolare sono state ricercate specie appartenenti ai generi *Alexandrium*, *Dinophysis*, *Gonyaulax*, *Prorocentrum*, *Pseudo-nitzschia*, oltre a *Lingulodinium polyedra* e *Protoceratium reticulatum*. I parametri chimico-fisici raccolti durante il campionamento erano rappresentati da salinità, ossigeno disciolto, pH, temperatura dell'acqua e temperatura dell'aria. L'elaborazione dati è stata condotta mediante programma R *open source* (versione 4.2.0) sui dati relativi alla presenza/assenza di *Dinophysis* spp., una delle microalghe rilevate in numero compatibile con la dimensione campionaria necessaria all'applicazione di un modello logistico. I modelli prodotti sono stati implementati mediante verifica

preliminare degli assunti ed inserimento consequenziale delle variabili indipendenti chimico-fisiche, e confrontati fra loro mediante Wald test e AIC (Akaike's Information Criterion) score, per la selezione del modello finale.

Risultati e discussione

Nel triennio considerato sono state rilevate 60 (9,9%) positività per *Dinophysis* spp., di cui 32 (5,3%) ascrivibili a *D. caudata*, 36 (6%) campioni positivi per *Lingulodinium polyedra* e 22 (3,6%) per *Alexandrium* spp. Fra le variazioni dei parametri chimico-fisici, più o meno attese in relazione alla stagione, è da tenere in considerazione che la variazione del pH è stata piuttosto contenuta, con valori distribuiti fra il 7 e l'8,62; sulla variabilità del pH intervengono fattori quali l'immissione di acque dolci a livello costiero, la presenza di precipitazioni ecc., ma è altresì nota la capacità tampone dell'acqua marina. I valori di salinità variavano fra 1,23 e 114,5; l'ossigeno disciolto comprendeva valori fra 26 e 251 ppm; le temperature di acqua ed aria variavano rispettivamente da 4 a 29°C e da -3 a 32°C. Tutte le variabili sono state inserite nei modelli logistici; a seguito della valutazione dei vari modelli il migliore è sembrato essere un modello con 4 variabili indipendenti quantitative in cui è stata esclusa la temperatura dell'aria perché risultata collineare a quella dell'acqua. Questo modello ha risposto positivamente al test di *goodness of fit* (Hosmer and Lemeshow goodness of fit (GOF)) ma i relativi coefficienti non sono risultati significativi. Il valore più prossimo alla significatività statistica è risultato essere quello della temperatura dell'acqua. Il *p-value* associato alla temperatura dell'acqua, nonostante non significativo, potrebbe indicare che, fra i vari fattori considerati, questo sia quello maggiormente influente sulla presenza/assenza del genere *Dinophysis*. In Tabella 1 vengono riportate le significatività dei coefficienti associate alle variabili indipendenti quantitative, oltre al *p-value* associato al Wald test ed il valore AIC:

Parametro	<i>p-value</i>
salinità	0,5665
ossigeno	0,2748
pH	0,2496
Temperatura acqua	0,0601

Tabella 1. Wald test *p-value*: 0,2033; AIC score: 104,61

Inoltre, a seguito di valutazione della correlazione (test di Fisher) fra la variabile indipendente temperatura (trasformata in categorica secondo questi range: < 10; ≥ 10 e < 20; ≥ 20) e quella di risposta, il *p-value* è risultato essere sulla soglia della significatività ($p = 0,05456$), in conformità a quanto ottenuto nel modello logistico. Tale risultato è indicativo della maggiore presenza di *Dinophysis* spp. a temperature più alte (superiori a 11°C ma al di sotto di 26°C).

Il tipo di modello utilizzato rappresenta evidentemente una semplificazione rispetto a modelli o elaborazioni che potrebbero comprendere più variabili, poiché molto più numerosi sono i fattori che potrebbero influire sulla crescita e diffusione delle microalghe e sulle variabili chimico-fisiche prese finora in considerazione. Tali fattori potrebbero essere responsabili ad esempio delle variazioni di temperatura nonché di pH, contrastando il ben noto potere tampone dell'acqua marina. Argomenti molto attuali infatti sono l'aumento delle temperature dovute ai cambiamenti climatici e l'acidificazione dell'acqua marina a causa delle attività antropiche, che può determinare a lungo andare cambiamenti nei valori di pH. Le attività antropiche hanno sicuramente, a livello delle zone costiere, un peso maggiore sulle variazioni delle caratteristiche dell'ambiente acquatico, coadiuvate anche da fenomeni meteorologici di vasta scala, immissione di acque dolci agli estuari e di vari tipi di nutrienti che favoriscono l'eutrofizzazione. La variabilità del pH nelle zone di prelievo e durante i periodi oggetto dello studio è rimasta limitata; la temperatura dell'acqua mostra segni di innalzamento rispetto al passato. I risultati ottenuti in termini di significatività delle variabili chimico-fisiche considerate nel modello logistico non escludono tale applicazione per lo studio dei fattori che influiscono sulla crescita e diffusione del fitoplancton potenzialmente tossico; elemento limitante nel presente lavoro potrebbe essere stato lo scarso numero di positività di *Dinophysis* rilevate nell'ultimo triennio. La valutazione delle correlazioni fra fattori ambientali e presenza di *Dinophysis*, pone l'attenzione sui cambiamenti in atto, che potrebbero generare degli *shift* anche in termini di sviluppo di determinate specie potenzialmente pericolose. Anche lo sviluppo di microalghe non tossiche può contribuire a cambiamenti nell'ecosistema costiero, limitando o coadiuvando lo sviluppo di quelle di interesse per la sanità pubblica; alcune di essi già sono utilizzate, anche in Italia, come *early warning*. In questo panorama molto complesso potrebbe diventare comunque difficile l'attribuzione della crescita e diffusione delle microalghe a fattori ambientali singoli e ben definiti. Quello che è certo è che, accompagnando le determinazioni analitiche con la raccolta di più informazioni possibili legate all'ambiente di campionamento, potrebbe favorire l'elaborazione di modelli più completi, che tengano conto delle numerose fonti di variabilità e che possano essere utilizzati a supporto delle decisioni dell'autorità competente nell'ottica della prevenzione.

Campionamento ufficiale di molluschi bivalvi vivi da parte dell'OSA e consegna all'Autorità competente al punto di sbarco: proposta di una procedura con documentazione delle attività di prelievo mediante video georiferito o videochiamata

L. Bille¹, C. Casarotto¹, M. Bassan¹, M. Corazza², D. Marchesan², A. Ristori³, G. Fornasiero³, C. Ceolin⁴, P. Fumelli⁵, A. Crepaldi⁵, A.L. Amorena⁶, E. Franzago¹, G. Lunardelli¹, M. Dalla Pozza¹, N. Ferré¹, G. Manca¹, G. Arcangeli¹

¹) Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie - Legnaro (PD), Italia

²) Azienda ULSS 4 Veneto Orientale - San Donà di Piave (VE), Italia

³) Azienda ULSS 3 Serenissima - Mestre (VE), Italia

⁴) Azienda ULSS 6 Euganea - Padova, Italia

⁵) Azienda ULSS 5 Polesana - Rovigo (RO), Italia

⁶) Regione Veneto U.O. Sicurezza Alimentare - Venezia (VE), Italia

Keywords: Campionamento ufficiale, Operatore del settore alimentare, video georiferito

Introduzione

Nel 2020, durante la pandemia da Covid-19 e in accordo con il Reg. (UE) 466/2020, in Veneto era stata ufficializzata una procedura emergenziale per la raccolta di campioni di molluschi (MBV) da parte dell'operatore del settore alimentare (OSA) opportunamente formato e la loro consegna al punto di sbarco alle Autorità Competenti Locali (ACL), che li ricevevano e trattavano come campioni ufficiali a tutti gli effetti. Ciò ha permesso di poter mantenere la classificazione delle zone di produzione e, soprattutto, continuare a garantire la sicurezza dei consumatori. La fine dello stato emergenziale ha posto la necessità di rivedere le modalità di campionamento, in considerazione del fatto che, secondo normativa, il veterinario ufficiale non può certificare fatti non di diretta conoscenza, non preventivamente verificati o che non sia possibile verificare (Reg. UE 625/2017). Il campionamento così come svolto in fase emergenziale, non dava in effetti modo di verificare quanto svolto dall'OSA, ma si basava necessariamente sull'autodichiarazione fornita da quest'ultimo riguardo le modalità di raccolta e gestione del campione e l'origine geografica del prodotto.

Tuttavia, questa forma di collaborazione tra OSA e ACL, già utilizzata in altre regioni italiane e stati europei (Pinn *et al.*, 2021) sin da prima dell'evento pandemico, presenta diversi vantaggi. Essa consente di risparmiare tempo, risorse e, in parte, di ridurre l'impatto ambientale ottimizzando le attività connesse alla raccolta del campione. Infatti gli OSA, opportunamente formati dalle ACL e dotati della strumentazione necessaria alla raccolta, conservazione e trasporto del campione, possono svolgere le proprie attività lavorative secondo orari e tempistiche a loro confacenti ed in qualunque condizione meteo, senza bisogno di dover riportare a terra il personale dell'ACL a campionamento concluso. Raggiungere i luoghi dove vengono raccolti o allevati i molluschi spesso richiede molto tempo e, soprattutto in realtà come quella veneta, che vede la presenza di 67 zone classificate con una varietà di specie molto ampia, la collaborazione con l'OSA permette alle ACL di organizzare e garantire al meglio la frequenza delle attività di monitoraggio e arginare le problematiche connesse alla cronica carenza di personale che affligge la sanità pubblica.

In tale contesto, nell'ambito del progetto FEAMP n. 04/INP/20/VE, Priorità 1 Misura 1.26 "Innovazione", dal titolo "Proposta di un Sistema Informativo Integrato per la gestione delle aree di raccolta dei molluschi ed applicazione di nuovi sistemi per il controllo delle fioriture algali tossiche in Regione Veneto" è stata studiata una procedura che permettesse di fornire alle ACL le necessarie informazioni su modalità di prelievo, origine, tracciabilità ed identità del campione raccolto dall'OSA, in modo da garantire con un ragionevole margine di sicurezza la validità legale dello stesso. Lo studio preliminare ha riguardato la specie di *C. gallina*.

Summary

During the Covid-19 pandemic event, in the Veneto Region (North Eastern Italy) the monitoring activities of live bivalve mollusc (LBM) production areas were properly maintained thanks to an emergency sampling procedure enhanced by regional authorities. It was based on the collaboration between Local Veterinary Authorities (LVA) and food business operators (FBO) that, once properly trained, collected LBM then received by the veterinarian Authorities at the landing point and considered as official samples. After the end of the emergency the procedure was withdrawn with consequent issues for the maintenance of the frequencies of monitoring activities. The present work describes the procedure implemented in the frame of a project funded by the European Maritime and Fisheries Fund (EMFF), which aims to provide the LVA the necessary guarantee regarding the method of collection, the origin and identity of the samples provided by FBO by a geotagged video or a video call. The regional Veterinary authority recently officialised the procedure whose test is in progress.

Metodi

Per raggiungere gli obiettivi prefissati e rendere la procedura effettivamente applicabile nella pratica lavorativa degli OSA, si è costituito un gruppo di lavoro composto da esperti dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie (IZSVe) sulla gestione sanitaria delle zone di produzione di molluschi e di sistemi informativi geografici, unitamente alle ACL e ad esponenti del mondo produttivo (Consorzio per la Gestione della Pesca dei Molluschi Bivalvi nel Compartimento Marittimo di Venezia, CO.GE.VO.). Sono state quindi studiate in campo le modalità operative di pesca e le caratteristiche delle imbarcazioni di tipo turbosoffianti, nonché le strumentazioni in dotazione per determinare la posizione geografica. A tal proposito, sono state effettuate anche prove di congruenza tra le coordinate rilevate con le strumentazioni di bordo, cellulari e tablet. A seguito di richiesta congiunta da parte di OSA, ACL, 'Direzione Prevenzione, Sicurezza alimentare, Veterinaria' e 'Direzione Agroambiente, programmazione e gestione ittica e faunistico venatoria' di Regione Veneto, la procedura che si stava mettendo a punto per le *C. gallina* è stata estesa al prelievo di tutte le specie classificate e dell'acqua per la ricerca del fitoplancton tossico. A tale scopo, si è provveduto a valutare in dettaglio con le ACL responsabili del monitoraggio delle zone di produzione di MBV, le modalità di pesca/raccolta per le diverse specie e relative tipologie di imbarcazioni utilizzate.

Risultati e discussione

Per permettere all'ACL di verificare le corrette modalità di raccolta del campione senza essere presente, la procedura prevede che l'OSA registri un video che documenti le diverse fasi di raccolta e manipolazione del campione. Considerando che la normativa richiede che il campione sia raccolto entro una certa distanza dal punto di campionamento individuato dall'ACL come rappresentativo della zona di produzione, il video registrato deve essere anche georiferito, ossia corredato di coordinate GPS, data e ora. Per far ciò è sufficiente scaricare sul *device* in uso un'applicazione gratuita reperibile su Google Play store che sfrutti la tecnologia *geotagging*. Per garantire l'identità e la tracciabilità del prodotto raccolto, il sacco in rete contenente i molluschi campionati deve essere chiuso con un sigillo antimanomissione precedentemente fornito dall'ACL e il momento della chiusura deve essere documentato nel video, avendo cura che il numero del sigillo sia chiaramente leggibile. Il video viene poi trasmesso all'ACL che, verificati i contenuti e la congruità delle informazioni relative alle coordinate geografiche del punto di prelievo, può ricevere al punto di sbarco il prodotto raccolto e perfezionare il campionamento con compilazione del relativo verbale ed invio al laboratorio per le analisi necessarie. Laddove le condizioni lo consentano, in alternativa al video è possibile svolgere le attività di campionamento in video chiamata, inviando contestualmente all'ACL anche una foto georiferita per fornire le informazioni necessarie sul punto di prelievo.

Dopo essere stata sottoposta al vaglio regionale, la "procedura per il campionamento ufficiale di MBV e acqua da parte dell'OSA e la consegna del campione all'ACL al punto di sbarco con documentazione delle attività di prelievo mediante svolgimento di video georiferito o videochiamata sincrona" è stata presentata ai rappresentanti del settore molluscolico veneto ed è stata successivamente recepita con Nota regionale Prot. n. 343771 del 27 giugno 2023. Il documento, oltre a descrivere i momenti che il video o la videochiamata devono necessariamente documentare, illustra come devono essere svolte le attività di campionamento per le diverse specie di molluschi/tipologia di pesca, le attrezzature e il materiale necessari, le quantità minime di MBV da prelevare per le diverse indagini di laboratorio, il facsimile di scheda raccolta dati da compilare da parte dell'OSA, nonché le modalità di condivisione dei file con l'ACL e le verifiche in capo ad essa.

La procedura è attualmente in fase di test e pertanto passibile di revisioni e perfezionamento. Essa non sostituisce bensì affianca le attività di campionamento svolto in presenza dal personale dell'ACL con l'obiettivo di garantire il mantenimento della classificazione delle zone di produzione, elemento imprescindibile sia alla salvaguardia di un settore trainante come quello molluscolico, ma anche e soprattutto a garantire la sicurezza del consumatore.

Bibliografia

Pinn, E., Fernandez, C., Malham, S., Le Vay, L., 2021. Review of the application of the Official Control Regulations for shellfish production as they relate to microbial contamination. Report edited by Shellfish Stakeholder Working Group (SSWG).

Analisi e significato antivirale dell'RNA editing mediato dalla proteina ADAR1 e utilità della spettroscopia ¹H-NMR in molluschi bivalvi

E. Bortoletto¹, R. Frizzo¹, U. Rosani¹, P. Venier¹

¹Università degli studi di Padova, Padova (PD)

Keywords: Ostreid Herpes Virus 1, *Crassostrea gigas*, ¹H-NMR, RNA editing

Introduzione

La ricerca scientifica nel settore dell'acquacoltura ha sempre rappresentato una solida base per lo sviluppo sostenibile del settore. Il 30 aprile 2021 l'Italia ha presentato alla Commissione europea il Piano Nazionale di Ripresa e Resilienza (PNRR) il quale ha permesso anche alle Università italiane di accedere a finanziamenti per realizzare ricerche scientifiche di ampio respiro, rispettando criteri di sostenibilità, tenendo conto delle peculiarità del territorio e favorendo la connessione tra ricerca e produzione. La ricerca scientifica può rivelarsi utilissima anche in aree costiere votate all'acquacoltura e a tal fine esemplifichiamo qui sotto due linee di ricerca e i loro possibili risvolti applicativi.

Summary

Scientific research in the field of aquaculture has always been a solid basis for the sustainable development of the sector. On 30 April 2021, Italy presented to the European Commission the National Recovery and Resilience Plan (PNRR), which has allowed several Italian universities to access funding to proceed with extensive scientific research which must fulfil sustainability criteria, take account of the peculiarities of the territory and favoring the connection between research and production. Scientific studies can be very useful also in the field of coastal aquaculture and, here, we exemplify two lines of research that leave room for possible applications.

Materiali e metodi

Per ciascun obiettivo sono stati utilizzati strumenti e strategie d'indagine ben dettagliati negli articoli pubblicati [1]–[4].

Per tracciare il *dsRNA editing* mediato da enzimi *Adenosine Deaminase Acting on dsRNA* (ADAR) dell'ostrica *Crassostrea gigas* a scala genomica e su numerosi campioni, abbiamo utilizzato un *cluster* di calcolo UNIPD (infrastruttura CAPRI) e stringhe di codice opportune.

Per le analisi della composizione lipidica e dei metaboliti di campioni di tessuto di *Mytilus galloprovincialis* è stato utilizzata spettroscopia ¹H-NMR, in collaborazione con il Laboratorio di scienze degli alimenti (Prof. S. Mammi, Dipartimento di Scienze Chimiche Università degli studi di Padova), un approccio analitico che permette di processare campioni in maniera efficiente e a costo contenuto.

Risultati e discussione

Negli anni 2008-2010, la variante microdeleta dell'*Ostreid Herpes Virus 1* (OsHV-1 μ Var) ha causato mortalità massive nelle ostricoltura francesi, con gravi ripercussioni economiche nel settore produttivo, diffondendosi poi in varie regioni geografiche del mondo. Qui, richiamiamo l'attenzione sulle proteine *Adenosine Deaminase Acting on dsRNA* (ADAR) di molluschi bivalvi, in particolare ADAR1 la cui espressione viene indotta nel corso della risposta antivirale in ostrica con meccanismi simili a quella di geni umani inducibili da interferone. In collaborazione con l'Università di Montpellier e con l'istituto francese di ricerca per lo sfruttamento del mare (IFREMER) abbiamo analizzato i livelli di espressione e l'attività enzimatica della proteina ADAR in famiglie di ostriche resistenti e suscettibili all'infezione virale [1], [2]. I risultati hanno evidenziato come una maggiore espressione e una maggiore attività della proteina ADAR siano associate ad una maggior resistenza delle ostriche al virus. Grazie ad un esperimento di infezione della vongola a sangue rosso *Scapharca broughtonii* con OsHV-1 abbiamo ulteriormente approfondito le interazioni molecolari tra OsHV-1 e la proteina ADAR osservando che gli RNA di OsHV-1 vengono modificati in maniera massiva dalla proteina ADAR1 ma le modifiche si concentrano su alcuni trascritti ben specifici non essenziali nel ciclo replicativo del virus [3].

Benché gli *stock* di *Crassostrea gigas* possano esser empiricamente selezionati mantenendoli in zone costiere dove il virus è endemico, nell'idea che le ostriche che non subiscono mortalità possano essere geneticamente meno suscettibili all'infezione da OsHV-1, la produzione di seme di ostrica concava potrebbe giovare di un programma di selezione genetica che includa tra i marcatori di resistenza una buona espressione del gene ADAR1.

Per quanto riguarda l'analisi dei metaboliti nel mitilo mediterraneo *Mytilus galloprovincialis*, l'analisi di più di 800 campioni di tessuto hanno consentito la fase di messa a punto della procedura su mitili provenienti dalla Laguna di Venezia e lo studio dei profili di metaboliti risultanti in diverse condizioni sperimentali, valutando in

particolare l'effetto del trasporto a fresco dei mitili in laboratorio e variazioni indotte dall'infezione sperimentale con 10^7 UFC di *Vibrio splendidus*. I risultati ottenuti suggeriscono l'importanza di zuccheri, osmoliti e amino acidi liberi nelle variazioni osservate e, nel caso del trattamento con batteri infettanti, le variazioni indotte sono state interpretate anche alla luce dei dati di espressione genica già disponibili [4]. Sempre utilizzando il mitilo mediterraneo e l' $^1\text{H-NMR}$ abbiamo recentemente sviluppato un protocollo che ci permette di misurare in modo semplice e rapido la concentrazione di Omega3 e Omega6 e la composizione in grassi saturi e insaturi nei mitili destinati al mercato.

Bibliografia

- [1] U. Rosani *et al.*, "A-to-I editing of Malacoherpesviridae RNAs supports the antiviral role of ADAR1 in mollusks," *BMC Evolutionary Biology*, vol. 19, no. 1, p. 149, Jul. 2019, doi: 10.1186/s12862-019-1472-6.
- [2] U. Rosani, E. Bortoletto, C. Montagnani, and P. Venier, "ADAR-Editing during Ostreid Herpesvirus 1 Infection in *Crassostrea gigas*: Facts and Limitations," *mSphere*, vol. 7, no. 2, pp. e00011-22, Apr. 2022, doi: 10.1128/msphere.00011-22.
- [3] C.-M. Bai *et al.*, "Viral Decoys: The Only Two Herpesviruses Infecting Invertebrates Evolved Different Transcriptional Strategies to Deflect Post-Transcriptional Editing," *Viruses*, vol. 13, no. 10, p. 1971, Sep. 2021, doi: 10.3390/v13101971.
- [4] R. Frizzo *et al.*, "NMR Metabolite Profiles of the Bivalve Mollusc *Mytilus galloprovincialis* Before and After Immune Stimulation With *Vibrio splendidus*," *Frontiers in Molecular Biosciences*, vol. 8, 2021, Accessed: Sep. 14, 2023. [Online]. Available: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmolb.2021.686770>

AMBITI-BIVALVI-VENETO

Integrazione del portale regionale sullo stato sanitario delle zone di produzione dei molluschi bivalvi

C. Casarotto¹, M. Bassan¹, L. Bille¹, E. Franzago¹, M. Toson¹, G. Lunardelli¹, N. Ferrè¹, M. Trolese¹, M. Mazzucato¹, M. Ruzza¹, S. Rizzo¹, G. Manca¹, M. Dalla Pozza¹, G. Arcangeli¹

¹Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Legnaro (PD)

Keywords: Classificazione, Zone di produzione, Molluschi, Sistema informativo integrato

Introduzione

I molluschi bivalvi destinati al consumo umano possono essere immessi sul mercato solo se provenienti da zone di produzione e stabulazione classificate ai sensi del Regolamento (UE) 2019/627. In base ai livelli di contaminazione fecale rilevati nei molluschi, le zone di produzione vengono classificate come A (il prodotto non viene sottoposto a nessun trattamento post-raccolta - limite di 230 *E. coli*/100 g), B (il prodotto viene sottoposto a depurazione, stabulazione o trasformazione - limite compreso tra 230 e 4.600 *E. coli*/100 g) o C (il prodotto viene sottoposto a stabulazione o trasformazione - limite compreso tra 4.600 e 46.000 *E. coli*/100 g). Gli eventuali trattamenti si rendono necessari al fine di garantire la salubrità dell'alimento prima dell'immissione in commercio.

Una volta classificate, le zone di produzione sono sistematicamente monitorate dai Servizi Veterinari delle Aziende ULSS di competenza per verificare la conformità del prodotto rispetto ai limiti previsti per i parametri microbiologici, chimici e biotossicologici. Dalla revisione dei dati derivanti dal monitoraggio, periodicamente si procede all'aggiornamento della classificazione delle zone, processo che in Regione Veneto avviene ogni tre anni. In ogni zona possono essere classificate più specie, che, date le loro diverse caratteristiche ecologiche e fisiologiche, possono avere classificazione differente. Durante il triennio, tuttavia, laddove i campionamenti facciano rilevare una non conformità ai parametri stabiliti dalla normativa, le Autorità Competenti provvedono ad emettere provvedimenti che, in caso di superamento dei limiti per *E. coli*, modificano temporaneamente la classificazione della zona interessata o, in ogni caso, pongono limitazioni alle attività di pesca/raccolta.

Grazie al progetto finanziato dal Fondo europeo per gli affari marittimi e la pesca (FEAMP) n. 22/SSL/2017, azione 4 - "Valorizzazione delle produzioni marine per la riqualificazione del settore", subazione 4, dal titolo "Messa a punto di un sistema di autocontrollo sanitario", è stato possibile creare un portale web dove tutti i portatori di interesse possono consultare le informazioni relative allo stato sanitario delle zone di produzione, attraverso la pubblicazione di mappe dinamiche relative alla presenza di provvedimenti di limitazione alla pesca/raccolta di molluschi bivalvi per motivi di carattere sanitario (<https://ambiti-bivalvi-veneto.izsvenezie.it/>). Con un secondo progetto finanziato dal FEAMP recentemente concluso (n. 04/INP/20/VE, Priorità 1 Misura 1.26 "Innovazione" (PO FEAMP 2014/2020), si è provveduto ad integrare nel sito anche le informazioni relative alla classificazione stabile delle zone di produzione dei molluschi, creando così un'ambiente di totale trasparenza riguardo la gestione sanitaria delle zone di produzione venete.

Summary

Regulation (EU) 2019/627 establishes specific microbiological parameters (*E. Coli* per 100 g of flesh and intravalvular liquid) in order to classify live bivalve molluscs (LBM) production areas into Class A, B, C. The local competent Veterinary Authority monitors each classified zone to verify the compliance to microbiological, chemical and biotoxicological parameters. In the Veneto Region (North Eastern Italy), the classification is updated every three years by the revision of monitoring programme results. However, if the established microbiological, chemical or biotoxicological limits are exceeded during the three-years, classified areas may be temporarily closed or reclassified. Thanks to a project funded by the European Maritime and Fisheries Fund (EMFF), through the web portal "AMBITI BIVALVI VENETO" people can access information about the sanitary status of LBM production areas, such as the classification and temporarily restriction measures in force, according to the principle of transparency that contributes to enhancing the Veneto region production.

Materiali e metodi

Per permettere la pubblicazione delle informazioni inerenti la classificazione delle zone di produzione nel portale web "AMBITI BIVALVI VENETO", è stato realizzato un sistema informativo integrato di tipo *web-oriented*. Tale sistema, permette di ottenere dall'Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Abruzzo e del Molise (IZSAM) i dati relativi alla classificazione delle zone di produzione così come validate annualmente dalle Autorità regionali e integrarle nel *Data Warehouse* dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie (IZSve) (infrastruttura che aggrega dati da diverse origini in un unico archivio di dati centralizzato e coerente, che supporta le analisi statistico/epidemiologiche). Lo scambio di dati avviene attraverso processi ETL (*Extract*

Transform Load), che consentono di raccogliere i dati da più fonti, elaborarli e riunirli in modo da poterli poi riutilizzare in specifici *dataset*, impiegati nei *software* di visualizzazione e nelle mappe. Sulla base dei *dataset* ottenuti, sono state poi create una serie di viste logiche, ossia tabelle virtuali necessarie all'integrazione delle informazioni per la creazione di cruscotti di business intelligence e la loro successiva pubblicazione nel portale.

Risultati e discussione

All'interno del portale preesistente è stata realizzata una nuova pagina denominata "Classificazione delle zone". In questa pagina, attraverso una mappa interattiva, è possibile visualizzare le zone di produzione colorate in modo differente a seconda del tipo di classificazione attribuita alle specie pescate/raccolte. In particolare, è possibile visualizzare zone di produzione dove tutte le specie oggetto di raccolta o allevamento sono classificate come A, zone dove sono presenti più specie a cui è stata attribuita una classificazione diversa, nello specifico una o più come A e una o più come B, zone di produzione dove tutte le specie oggetto di raccolta o allevamento sono classificate come B, zone non classificate e zone vietate.

Inoltre, è possibile effettuare una ricerca in mappa attraverso dei filtri che identificano il codice ed il nome della zona, le specie classificate, l'Az-ULSS di appartenenza, il tipo di habitat (laguna o mare) ed il tipo di classificazione della zona (A, A-B, B, Non classificato o Vietato).

La piattaforma quindi ora permette a chiunque, sia al consumatore sia al potenziale acquirente internazionale, di avere accesso alle informazioni generate dalle attività di controllo sul prodotto pescato ed allevato, in favore di una trasparenza che valorizza ulteriormente la produzione veneta di molluschi bivalvi.

Sistema di Early Warning del rischio biotossicologico nel monitoraggio delle aree di produzione di molluschi bivalvi vivi adottato dalla AST Ascoli Piceno

C. Ciccarelli¹, A.M. Semeraro¹, V. Di Trani¹, A. Antonini¹, E. Ciccarelli²

¹) Azienda Sanitaria Territoriale Ascoli Piceno

²) Biologo – Reading (UK)

Keywords: Biotossine, Monitoraggio, Early Warning, Bayes Factor, mitili

Introduzione

Il Regolamento UE/2019/627[5], all'art. 61 par. 4 ha stabilito che, nell'ambito dei piani di campionamento per il monitoraggio delle aree di produzione dei molluschi bivalvi vivi, la frequenza del campionamento per l'analisi delle biotossine nei molluschi deve essere settimanale; tuttavia, nel successivo punto a), precisa che tale frequenza può essere ridotta se la valutazione del rischio relativa alla presenza di tossine o fitoplancton indica un rischio molto basso di episodi tossici.

Infatti i processi di crescita del fitoplancton tossico, e di accumulo delle biotossine nei molluschi, pur se relativamente ben conosciuti, dipendono dall'interazione di numerosi fattori che non è possibile conoscere esattamente in tempo reale: questo fa sì che, non sia possibile disporre di modelli in grado di predire con sufficiente precisione i livelli di accumulo e, pertanto, sia necessario ricorrere ad una frequenza di campionamento almeno settimanale [1] [10].

A questo scopo il Laboratorio Nazionale di Riferimento (LNR) per le Biotossine, cioè il Centro Ricerche Marine di Cesenatico, ha predisposto una Procedura Operativa per la Valutazione del Rischio che tiene conto della robustezza ed affidabilità del piano di monitoraggio implementato e dell'adozione di un sistema di Early Warning per le biotossine [2]. Tale sistema rappresenta un elemento cardine per ottenere un piano di monitoraggio robusto ed affidabile poiché permette di determinare, con un rischio di errore sufficientemente basso, la probabilità che i livelli di biotossine nei molluschi bivalvi raccolti non siano tali da causare episodi tossici nell'uomo, e consentire così una riduzione della frequenza di campionamento.

Sulla base di tali considerazioni è stata definito un modello di Early Warning biotossicologico riferito agli allevamenti di mitili di competenza dell'AST Ascoli Piceno basato sui seguenti principi:

- prendere in considerazione un ampio ventaglio di elementi anamnestici ed analitici,
- adottare un approccio scientifico di tipo probabilistico basato sul Teorema di Bayes,
- prevedere l'applicazione di misure di igiene decisionale volte a ridurre la variabilità del giudizio clinico.

Summary

Many factors, impossible to know in real time, are strictly related to the growth of toxic phytoplankton and to the accumulation of biotoxins in bivalve molluscs; for this reason the Regulation EU /2019/627 stated a bio-toxicological monitoring with a weekly sampling frequency. However, if a risk assessment also based on Early Warning systems allows it, it is possible to follow a fortnightly monitoring frequency. Based on these considerations, the Local Health Agency of Ascoli Piceno has defined a bio-toxicological Early Warning model for farmed mussels, based on a wide range of anamnestic and analytical elements, following a scientific approach based on conditional probability of Bayes Theorem and providing for decision hygiene, to reduce the variability of clinical judgment. The system determines the probability that a compliant bio-toxicological result, for a given biotoxin, will be followed by another compliant result, within the second week. The related process is divided into successive steps through the determination of the *a priori* probability, which takes into account the available analytical and anamnestic data, its processing with the Bayes Factor, to obtain the *a posteriori* probability, and the comparison of the obtained value with the reference value to decide whether to take the next sample, in the first or second week.

Materiali e metodi

Un sistema di Early Warning biotossicologico rappresenta un processo di valutazione complesso che, a partire da una serie di dati epidemiologici, di tipo analitico e anamnestic, esita in un giudizio clinico. Tale giudizio, per la sua natura, può essere soggetto ad un livello di "rumore" tale da determinare un grado di variabilità non accettabile [8]. Per garantire la corretta e completa interpretazione dei dati epidemiologici e per ridurre il livello di rumore del giudizio clinico, e quindi la sua variabilità, è necessario che siano definiti esattamente alcuni elementi del sistema:

1. le fasi del processo ed il relativo algoritmo delle decisioni,
2. le informazioni che alimentano il processo e le relative fonti,
3. i criteri di valutazione delle informazioni,

4. i parametri di riferimento predefiniti,
5. le modalità di calcolo del fattore di Bayes.

A questi possono essere aggiunti altri elementi, necessari ad una trasparente gestione operativa: le responsabilità, la frequenza del processo, le modalità di registrazione dei dati e dei giudizi, le modalità di revisione ed aggiornamento della procedura.

Risultati e discussione

Il sistema di Early Warning predisposto definisce la frequenza (settimanale o quindicinale) con la quale viene eseguito il monitoraggio in una determinata stazione di campionamento per ciascuno dei cinque gruppi di biotossine per i quali la normativa prevede i limiti. Con un approccio probabilistico basato sul Teorema di Bayes, viene determinata la probabilità che, un campione del monitoraggio biotossicologico con risultato conforme, sia seguito nella seconda settimana successiva da un ulteriore risultato conforme. Se tale probabilità raggiunge un livello minimo ritenuto accettabile, il monitoraggio può essere posticipato alla seconda settimana successiva (frequenza quindicinale), altrimenti viene eseguito nella prima settimana successiva (frequenza settimanale).

Il processo di valutazione è articolato in diverse fasi e prevede, inizialmente, la determinazione della probabilità *a priori* $O_{(\leq Lma)}$, espressa come Odds, che il risultato, del campione prelevato nella seconda settimana successiva, sarà conforme, cioè non superiore al limite massimo ammissibile (**Lma**) fissato dalla norma.

Per determinare $O_{(\leq Lma)}$ vengono utilizzati dati anamnestici ed analitici, il cui elemento cardine è rappresentato dall'ultimo risultato del monitoraggio biotossicologico, e vengono seguiti criteri di valutazione dei dati rigidamente predefiniti, al fine di ridurre l'impatto di quegli elementi di variabilità che determinano il "rumore" nell'ambito dei processi decisionali [8].

Successivamente, da questa probabilità *a priori* ed utilizzando il *Fattore di Bayes (BF)* [7], può essere determinata la probabilità *a posteriori* che è alla base del giudizio clinico che verrà espresso [6]. In questo caso il *Fattore di Bayes* $BF_{(\leq Lma | < VPR)}$ rappresenta il rapporto tra la probabilità che, dopo un risultato inferiore ad un predefinito valore di riferimento (**VPR**), il risultato successivo sia $\leq Lma$, e la probabilità che dopo lo stesso risultato $< VPR$, si ottengano valori $> Lma$; tale valore, che corrisponde al rapporto di verosimiglianza, può essere espresso con la formula: $BF_{(\leq Lma | < VPR)} = P_{(\leq Lma | < VPR)} / P_{(\leq Lma | > VPR)}$ [9]. Il valore **BF** rappresenta quindi, per una determinata biotossina, una *caratteristica* propria di quell'area e, considerata la variabilità e complessità dei fattori che influenzano i processi di crescita ed accumulo del fitoplancton tossico, necessita di una periodica rivalutazione e revisione.

Infine, la probabilità *a posteriori* $O_{(\leq Lma | < VPR)}$ che un risultato $< VPR$ sia seguito, nella seconda settimana successiva, da un risultato $\leq Lma$, viene così determinata: $O_{(\leq Lma | < VPR)} = BF_{(\leq Lma | < VPR)} \times O_{(\leq Lma)}$ e può essere espressa in forma di probabilità con $P = O / (1 + O)$ [3].

Se la probabilità *a posteriori* $P_{(\leq Lma | < VPR)}$ sarà uguale o superiore al valore definito come probabilità minima accettabile (**Pma**), allora il giudizio clinico consentirà di posticipare alla seconda settimana successiva il controllo.

Le fasi del processo di valutazione, con gli input, i processi e gli output di ciascun livello, sono riportati nella Tabella 1 mentre il relativo algoritmo delle decisioni è raffigurato nella Figura 1.

I dati analitici che alimentano il sistema, le relative fonti e i criteri di interpretazione per determinare i valori di Odds, sono rappresentati nella Tabella 2 e analogamente, nella Tabella 3, sono elencati i dati anamnestici che alimentano il sistema, con le relative fonti e i criteri di interpretazione.

Nella Tabella 4 sono stati riassunti i parametri di riferimento utilizzati dal sistema; con un approccio conservativo, poiché per l'acido Okadaico i valori di **BF** nell'ipotesi di $VPR = Lma/2$ non sono stati giudicati sufficientemente protettivi, è stato utilizzato il valore $VPR = LoQ$ ed il collegato valore BF_{LoQ} .

Nella Tabella 5 sono state descritte le modalità di calcolo del citato valore BF_{LoQ} , secondo modalità già descritte e come riportato in un precedente lavoro [4].

Il sistema di Early Warning predisposto nella AST di Ascoli Piceno per i mitili allevati si basa sulla determinazione della probabilità che, tenendo conto dei dati analitici ed anamnestici disponibili, un risultato del monitoraggio biotossicologico, conforme per una determinata biotossina, sia seguito nella seconda settimana successiva da un altro risultato conforme: per tale determinazione è stato adottato un approccio probabilistico basato sulla probabilità condizionata secondo il Teorema di Bayes.

Bibliografia

- [1] AAVV, 2019. Monitoring of Toxins-producing Phytoplankton in Bivalve Mollusc Harvesting Areas. Guide to Good Practices: Technical Application. EU-RL-MB. Issue 1. URL: https://www.aesan.gob.es/en/CRLMB/web/public_documents/seccion/EURLMB_Guides.htm
- [2] AAVV, 2023. Procedura Operativa per la Valutazione del Rischio (rev. del 19/06/2023). Cesenatico, Centro Ricerche marine. URL: https://www.centroricerchemarine.it/public/upl_images/epweb3/P.O.-%20VdR_rev.19-06-2023.pdf
- [3] Besozzi M, 2013. 8. Teorema di Bayes e decisioni mediche. in Errori cognitivi, probabilità e decisioni mediche. URL: <https://www.bayes.it/ebook/ECPEM.pdf>

- [4] Ciccarelli C, Barchiesi F, D'Aurizio G, Semeraro AM, Di Trani V, Massi A, 2022. Biotossine algali nei molluschi bivalvi prodotti nelle Marche: analisi dei risultati del monitoraggio condotto a partire dal 2016. Atti del XI Convegno SIRAM, Trieste. pp 20-24. URL: <https://siram-molluschi.it/documenti/atti-convegni/atti-convegno-SIRAM-2022.pdf>
- [5] Commission Implementing Regulation (EU) 2019/627 of 15 March 2019 laying down uniform practical arrangements for the performance of official controls on products of animal origin intended for human consumption in accordance with Regulation (EU) 2017/625 of the European Parliament and of the Council and amending Commission Regulation (EC) No 2074/2005 as regards official controls. Official Journal of the European Union, Series, L 131, 17.5.2019, p. 51–100.
- [6] Gill CG, Sabin L, Schmid CH, 2005. Why Clinicians are natural Bayesians. BMJ. 330:1880. URL: <https://www.bmj.com/content/330/7499/1080>
- [7] Kaas RE, Raftery AE, 1995. Bayes Factors, J Am Statistical Association. 90(430):773-795 URL: <https://sites.stat.washington.edu/raftery/Research/PDF/kass1995.pdf>
- [8] Kahneman D, Sibony O, Sunstein CR, 2021. Noise. A flaw in human judgment. HarperCollins Publishers, London, UK. URL: https://ia904606.us.archive.org/11/items/ar_20211024/BOOKS.YOSSR.COM-Noise-A-Flaw-in-Human-Judgment.pdf
- [9] Jeffreys H. (1961) Theory of Probability. Oxford University Press
- [10] Poletti R (2014). Biotossine marine: origine diffusione e controllo. Cesenatico, Centro Ricerche marine. URL: https://www.alimenti-salute.it/sites/default/files/biotossine-marine_0.pdf

Tabella 1: fasi del processo

fase	input	processo	output
1	Dati storici anamnestici ed analitici	Verifica con gli standard predefiniti e calcolo degli Odds a priori	Odds a priori $O_{(<Lma)}$
2	Odds a priori	Elabora con LR+ $BF_{(\leq Lma < VPR)} \times O_{(<Lma)}$	Odds a posteriori $O_{(\leq Lma < VPR)}$
3	Odds a posteriori	Trasforma in probabilità $P = O / (1 + O)$	Probabilità a posteriori
4	Probabilità a posteriori	Confronta con il valore Pma	Se $< Pma$: monitoraggio nella prima settimana Se $\geq Pma$: monitoraggio nella seconda settimana

Tabella 2: dati analitici, fonti e valori utilizzati per determinare Odds a priori $O_{(<Lma)}$

dato	fonte	definizione	Valore Odds
Precedente risultato degli esami biotossicologici	database dei risultati del monitoraggio	L'ultimo risultato disponibile è antecedente alla settimana precedente alla valutazione	0
		L'ultimo risultato disponibile risale alla settimana precedente e il suo valore è $\geq VPR$	0
		L'ultimo risultato disponibile risale alla settimana precedente e il suo valore è $< VPR$	1
Precedente risultato del fitoplancton tossico	database dei risultati del monitoraggio	Assenza di specie di fitoplancton associabili alla produzione della biotossina	5
		Presenza di specie di fitoplancton associabili alla produzione della biotossina	0.5
		Specie di fitoplancton associabili alla produzione della biotossina in quantità > 100 cellule/l	0.01
		Rapporto di prova non disponibile	1
Trend della Clorofilla	https://data.marine.copernicus.eu/ (dato ricavabile dalla <i>Mediterranean Sea Ocean Colour Plankton and Transparency L4 NRT daily and monthly observations</i> , determinando nell'area il parametro <i>Mass concentration of chlorophyll a in sea water (CHL)</i> , nella settimana precedente	Trend della Clorofilla in diminuzione: nell'ultima settimana la differenza in negativo è > 0.1 mg/m ³	5
		Trend della Clorofilla stazionario: nell'ultima settimana la differenza è ≤ 0.1 mg/m ³	1
		Trend della Clorofilla in aumento: nell'ultima settimana la differenza in positivo è > 0.1 mg/m ³	0.5

Tabella 3 dati anamnestici, fonti e valori utilizzati per determinare Odds a priori $O(<Lma)$

dato	fonte	definizione	Valore Odds
Precedenti non conformità	database dei risultati del monitoraggio	Mai verificatisi	10
		L'ultimo episodio risale a più di tre anni prima	5
		L'ultimo episodio si è verificato nei tre anni precedenti	1
Provvedimenti di chiusura di aree vicine	provvedimenti trasmessi da altre Autorità Competenti	Non sono stati adottati provvedimenti nella regione ed in quelle limitrofe	5
		Sono stati adottati provvedimenti nelle regioni limitrofe	0.75
		Sono stati adottati provvedimenti nella regione	0.4
		Sono stati adottati provvedimenti nelle provincie limitrofe	0.1
		Sono stati adottati provvedimenti nella stessa provincia	0.01
Trend stagionale	database dei risultati del monitoraggio	Nello stesso mese non si sono mai verificati episodi	2
		Nello stesso mese si è verificato almeno un episodio	0.75
Casi clinici verificatisi tra i consumatori	Sistema Informativo iRASFF Notifiche di malattie a trasmissione alimentare (MTA)	Non sono stati segnalati episodi	1
		Sono stati segnalati episodi	0

Tabella 4: parametri di riferimento utilizzati

biotossina	UM	Lma	LoQ	VPR	BF (mitili)	BF (altre specie)	Pma
Saxitossina (STX)	µg eq STX diclor/kg	800	600	600	1	1	0.90
Ac. Domoico (DA)	mg/kg	20	0.2	0.2	1	1	0.90
Ac. Okadaico (OA)	µg/kg	160	40	40	2.810	1	0.90
Azaspiracid (AZA)	µg/kg	160	30	30	1	1	0.90
Yessotossina (YTX)	mg/kg	3.75	0.2	0.2	1	1	0.90

Tabella 5: modalità di calcolo del fattore di Bayes (BF)

Il valore $BF_{(<Lma, <VPR)}$ – viene calcolato sulla serie di dati storici di tutte le coppie di risultati separati da un intervallo ≤ 17 giorni (che rappresenta l'intervallo che intercorre tra il primo giorno di campionamento della prima settimana e l'ultimo giorno di campionamento della seconda settimana successiva). La valutazione di ciascuna coppia di risultati viene riportata su una tabella 2x2 secondo il seguente schema:

		secondo risultato	
		$\leq Lma$	$> Lma$
primo risultato	$< VPR$	a	b
	$\geq VPR$	c	d

Successivamente vengono calcolati sensibilità, specificità e Fattore di Bayes

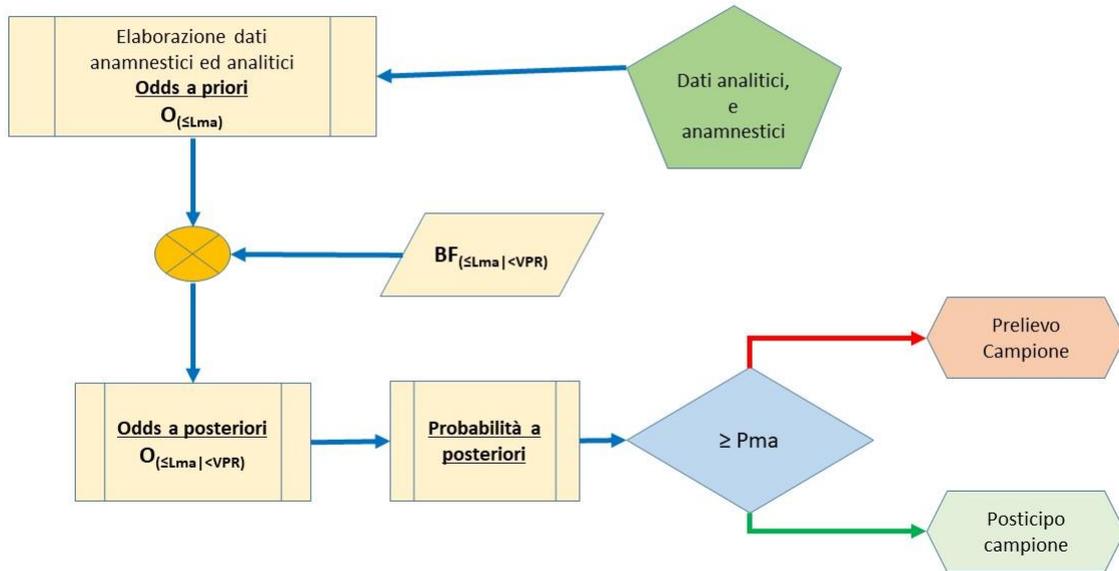
sensibilità	$a/(a+c)$
specificità	$d/(d+b)$
BF	$sensibilità/(1-specificità)$

Valori calcolati per i mitili allevati nella AST Ascoli Piceno nel periodo 2016-2022

	a	b	c	d	sensibilità	specificità	BF
VPR= LoQ	192	1	13	2	0,937	0,667	2,810
VPR= Lma/2	199	2	6	1	0,971	0,333	1,456

Il valore BF = 1 viene assunto di default, con approccio conservativo, quando BF non è determinabile.

Figura 1: algoritmo delle decisioni del sistema di Early Warning



Verifica e validazione di punti di campionamento rappresentativi per il monitoraggio delle zone di produzione della Regione Friuli Venezia Giulia mediante valutazione di dati analitici di tre anni con utilizzo di mappe in formato pdf a livelli

M.T. Colasanto¹, F. Costanzo², L. Bille³, C. Casarotto³, M. Toson³, L. Pelagatti¹, M. Ricci⁴

¹) A.S.U.G.I- Trieste

²) A.S.U.F.C.- Udine

³) Istituto zooprofilattico Sperimentale delle Venezie - Legnaro (PD)

⁴) Regione Friuli Venezia Giulia - Direzione Centrale Salute, Politiche Sociali e Disabilità Servizio di Prevenzione, Sicurezza Alimentare e Sanità Pubblica Veterinaria

Keywords: riclassificazione, georeferenziazione, punti di campionamento, validazione

Introduzione

La filiera produttiva dei molluschi bivalvi rappresenta una componente significativa del tessuto economico della Regione Friuli Venezia Giulia. In accordo con il Reg. (EU) 2017/625, le autorità regionali provvedono alla classificazione delle zone adibite alla molluschicoltura sulla base delle indagini sanitarie (*sanitary survey* art. 56 del Reg. UE 2019/627). Le indagini sono effettuate dalla *task force*, ossia un gruppo di lavoro formalmente riconosciuto (Decreto Regionale n.1996 del 20 ottobre 2020) composto da personale specializzato afferente alle Aziende sanitarie (AS) responsabili per le aree adibite alla molluschicoltura. In occasione dell'ultima riclassificazione triennale delle zone di produzione è emersa la necessità di effettuare anche il riesame dei punti di campionamento rappresentativi di ciascuna zona. Nel triennio 2019-2021 sono infatti intervenuti numerosi cambiamenti tra cui variazioni in termini di quantità e localizzazione della risorsa biologica, l'abbandono di alcune aree di allevamento da parte degli operatori, il rilievo di alcune non conformità microbiologiche e la rinuncia di ARPA FVG, ente individuato dalla DGR 923/2019, ad effettuare i prelievi di monitoraggio.

I Servizi Veterinari delle AS del FVG operano, a garanzia della sicurezza del consumatore, su un territorio che dal punto di vista della produzione molluscolica è abbastanza variegato. Nel Golfo di Trieste troviamo quasi esclusivamente allevamenti *longline* di *Mytilus galloprovincialis* e, in una minima parte, di *Crassostrea gigas*. Le zone di produzione di mare aperto sostengono le marinerie attraverso la raccolta di *Callista chione*. Le zone lagunari vocate alla raccolta e all'allevamento della Vongola verace, hanno registrato una riduzione della risorsa biologica e un conseguente interesse del comparto della produzione anche verso la raccolta del *Cerastoderma glaucum*. Le aree costiere, storicamente adibite alla pesca gestita di *Chamelea gallina* e *Ensis spp*, sono state soggette ad un pesante impoverimento della risorsa biologica, che ha portato al mantenimento in attività di poche zone sfruttate per la raccolta di *C. gallina* da parte dei sub professionisti, quindi con una metodica di raccolta meno invasiva rispetto alle draghe idrauliche. Alcune zone, per un'azione di sostegno del territorio, sono state oggetto di progettualità di *restocking*.

La collaborazione con l'IZS delle Venezie, ha permesso di implementare degli strumenti di semplice utilizzo per consentire agli esperti della *Task force* una rapida analisi visuale dei dati relativi ai risultati del monitoraggio microbiologico, allo scopo di facilitare il processo di aggiornamento e validazione dei punti di campionamento rappresentativi precedentemente individuati con il *desk study*.

Summary

Bivalve mollusc's production is a significant element of the Friuli Venezia Giulia (FVG) Region economy. The regional competent Authority classify production areas in accordance to Article 18(6) of Regulation (EU) 2017/625. An officially recognized task force is in charge to carry out sanitary surveys (art. 56 of Reg.UE 2019/627) before classifying production areas and the classification is updated every three years by the revision of monitoring programme results. The 2019-2021 period presented several changes related to decreasing of biological resources, detection of some microbiological non-compliances and in the monitoring programme organization. In this contest, the FVG task force was assisted by the IZS Venezie operators to carry out the revision and validation of the representative sampling point by means of thematic maps produced with ArcMap and exported in PDF Layers files.

Materiali e Metodi

Come previsto da normativa, i Servizi Veterinari delle AS del FVG individuano i punti di campionamento nelle zone di produzione e di stabulazione in funzione dei potenziali rischi identificati, al fine di un monitoraggio basato sul rischio di contaminazione microbiologica. Ne origina un piano di campionamento calato nella realtà produttiva che tiene conto dell'interesse commerciale e delle caratteristiche biologiche della specie nonché della disponibilità della risorsa biologica. La collaborazione costante con il personale IZSve, aveva già permesso, in passato, l'utilizzo del GIS per la visualizzazione e valutazione delle informazioni del *Corine Land*

Cover, indispensabili nella fase di studio per la *sanitary survey*. L'esperienza pregressa ha portato la *task force* ad una nuova richiesta di collaborazione allo scopo di ottenere uno strumento che rendesse dinamica e rapida la valutazione complessiva dell'elevato numero di dati derivanti dalle attività di monitoraggio microbiologico delle zone di produzione, con l'obiettivo di individuare i punti in cui erano stati rilevati gli esiti più sfavorevoli. Sono quindi stati estratti da IZSve i dati relativi a data, specie campionata, numero di *E. coli* per 100 g (MPN) e coordinate del punto di prelievo dei campioni svolti nel periodo 2019-2021. Dopo opportuna validazione da parte del personale della *task force*, i dati sono stati utilizzati per creare con il programma ArcMap 10.8 delle mappe tematiche che permettessero di visualizzare i valori di *E. coli* associati a tutti i punti di prelievo in relazione ai punti di campionamento rappresentativi precedentemente individuati. Le mappe sono quindi state esportate in file PDF a livelli (PDF Layers), che di fatto hanno consentito ai componenti della *task force* di poter avere accesso in modo rapido, con un semplice click sui diversi punti, a tutte le informazioni relative a quel campionamento grazie alle tabelle associate.

Risultati e discussione

Le mappe in formato pdf a livelli, grazie ad una rappresentazione colorimetrica degli esiti analitici (verde: *E. coli* <18; giallo *E. coli* <230 per zone di classe A e < 4600 per zone di classe B, rosso per valori non conformi secondo la classificazione della zona) si sono rivelate uno strumento semplice e versatile, che in poco tempo ha permesso di mettere in relazione alti livelli di contaminazione fecale con i relativi punti di prelievo e una rapida individuazione dei siti che subiscono maggiormente l'influenza di eventuali fonti inquinanti. Inoltre, l'utente ha potuto associare il punto di campionamento al campione con tutti i relativi dati registrati nel verbale di prelievo, evidenziando così la necessità di scegliere o meno nuovi punti da considerare come rappresentativi delle zone e compiendo tale scelta non solo sulla base dei risultati del monitoraggio, ma anche sulle conoscenze relative alla presenza effettive della risorsa biologica da campionare e la presenza di nuove fonti di inquinamento impattanti individuate con la *sanitary survey*. Il PDF a livelli ha inoltre consentito di migliorare la valutazione dei dati relativi alle zone di libera raccolta, in cui la rosa delle coordinate di campionamento può essere geograficamente molto più ampia rispetto a quelle di un allevamento di mitili, con relative maggiori difficoltà nell'individuare un punto di campionamento rappresentativo.

L'uso dello strumento descritto nel presente lavoro costituisce un importante tassello nel percorso di standardizzazione della verifica e della validazione dei punti di campionamento. Soprattutto in considerazione dell'importante impoverimento della risorsa biologica verificatosi negli anni recenti e del probabile spostamento dei banchi naturali rispetto ai siti conosciuti, la visualizzazione dei punti di prelievo permette una più agevole individuazione delle aree in cui sono effettivamente presenti i molluschi. L'uso di uno strumento offline e di facile condivisione, inoltre, consente un rapido aggiornamento e adeguamento alle esigenze eventualmente diverse manifestate dalla *task force*.

In conclusione, l'utilizzo delle mappe in formato pdf a livelli per la visualizzazione puntuale dei punti di campionamento reali e dei relativi esiti, nel prossimo futuro potrà essere applicato anche ai fini di un monitoraggio basato sul rischio per contaminati chimici, biotossine e fitoplancton.

Bibliografia

- [1] EU Council. (2004). Regulation (EC) No 853/2004 of the European parliament and of the council of 29 April 2004 laying down specific hygiene rules for food of animal origin. Official Journal of the European Communities, Series L, 139, 55e205.
- [2] http://europa.eu.int/eurlex/pri/de/oj/dat/2004/l_139/l_13920040430de00550205.pdf, 30.4.04.
- [3] EU Commission. (2019) Commission Implementing Regulation (EU) No 627/2019 of 15 March 2019 laying down uniform practical arrangements for the performance of official controls on products of animal origin intended for human consumption in accordance with Regulation (EU) 2017/625 of the European Parliament and of the Council and amending Commission Regulation (EC) No 2074/2005 as regards official controls. Official Journal of the European Union. Series L, 11, 51
- [4] Community Guide to the Principles of Good Practice for the Microbiological Classification and Monitoring of Bivalve Mollusc Production and Relaying Areas with regard to Implementing Regulation 2019/627. Issue 4, September 2021
- [5] Conferenza permanente per i rapporti tra lo Stato. Le Regioni e le Province Autonome di Trento e Bolzano. INTESA 08 luglio 2010 – Intesa, ai sensi dell'articolo 8, comma 6, della Legge 5 giugno 2003, n.131 tra il Governo, le Regioni e le Province autonome di Trento e Bolzano concernente linee guida per l'applicazione del Regolamento (CE) 854/2004 e del Regolamento /CE) 853/2004 nel settore dei molluschi bivalvi. GU Serie Generale n.176 del 30.07.2010 – Suppl. Ordinario n.175.
- [6] Regione Autonoma Friuli Venezia Giulia. Delibera n.1925 /2022 Linee guida per l'applicazione del Regolamento (UE) 2017/625 e del Regolamento 853/2003 nel settore dei molluschi bivalvi nelle zone di produzione, raccolta e stabulazione dell'arco costiero del Friuli Venezia Giulia. Riclassificazione Triennale delle zone. Testo integrale della Delibera, Allegato 1, 2 e 3. Bollettino Ufficiale della Regione n.52 del 28.12.2022, 649
- [7] Regione Autonoma Friuli Venezia Giulia. Decreto del Direttore del Servizio prevenzione, sicurezza alimentare e sanità pubblica veterinaria 20 ottobre, n.1996. Modifica della task-force regionale per la conduzione, valutazione e redazione della "sanitary survey" su tutte le zone classificate di produzione e stabulazione dei molluschi bivalvi dell'arco costiero della Regione FVG. Bollettino Ufficiale della Regione FVG n.45 del 4 novembre 2020, 235

Confronto di diverse tecnologie per il pre-ingrasso di seme di vongola verace

A. De Marco¹, L. Aguiari³, E. Scarpa³, R. Urbini², S. Natale¹, A. Bonaldo¹

¹) Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie, Università di Bologna, Italia

²) Dipartimento di Scienze e Tecnologie Agroalimentari, Università di Bologna, Italia

³) NaturEdulis s.r.l., Goro, Italia

Keywords: Pre-ingrasso, seme, vongole, crescita

Introduzione

Nel sistema italiano di produzione della vongola verace, non ci sono linee guida di gestione standard. È essenziale definire quale sistema sia più efficiente e produttivo, in particolar modo per la fase di pre-ingrasso del seme di vongola. Per questo scopo, sono stati testati tre diversi supporti, valutando quale tra essi permettesse una migliore crescita.

Materiali e Metodi

Tre diversi sistemi di pre-ingrasso per il seme di vongole verace (*R. philippinarum*) sono stati testati presso lo schiuditoio Naturedulis tra Aprile e Luglio 2023. Il seme (4.68 ± 0.53 mm lunghezza) è stato posizionato in: 1) lanterne di rete sospese in mare nella laguna di Goro, con una maglia di 1.5mm; 2) *poches* sospese in mare in una gabbia posizionata sul fondale, con una maglia di 1.9mm; 3) *upwelling tanks* a terra nell'azienda schiuditoio. Durante i 4 campionamenti, uno per mese, sono stati monitorati parametri di crescita/performance. 30 vongole sono state sacrificate nel laboratorio di acquacoltura dell'Università di Bologna, per valutarne la lunghezza, il peso totale, il peso umido e secco delle valve e del corpo molle, l'indice di condizione (CI), il tasso di crescita specifica (SGR) e l'incremento giornaliero delle valve (DSI). All'inizio e fine della prova è stato valutato anche il tasso di filtrazione da vongole di ciascun supporto (CR). Infine, 3L di acqua dai diversi siti di collocazione dei supporti sono stati campionati al fine di analizzarne la concentrazione di clorofilla A (Chl).

Risultati e Discussione

I risultati più interessanti sono stati riscontrati nei dati di lunghezza e peso. Infatti, le vongole sono cresciute in lunghezza significativamente durante la prova in tutti i supporti, seguendo il trend di incremento della clorofilla (Fig. 1A). Anche se nei mesi di maggio e giugno, la clorofilla A non ha mostrato differenza significativa tra i supporti, tuttavia, è possibile riscontrare un incremento significativo nel tempo, durante i mesi per ciascun sito. L'alto valore finale di Chl nelle lanterne può aver contribuito alla miglior performance di crescita delle vongole in questo supporto, al contrario invece il discorso vale per il sistema *upwelling*. Nonostante il tasso di filtrazione non si sia mostrato differente tra le vongole dei diversi supporti (Fig. 1B), è significativa la differenza nella crescita. Facendo un paragone tra i supporti ad uno stesso tempo, nel secondo campionamento le vongole delle *poches* avevano la lunghezza minore e al terzo campionamento questa situazione si presentava per le vongole negli *upwelling*. Al termine del test, *poches* e *upwelling* hanno mostrato la stessa lunghezza, differente dalle più lunghe vongole presenti nelle lanterne (Fig. 1C). Non è stata rilevato un simile trend significativo per i valori di peso. Mettendo a confronto i supporti, al termine della prova, le vongole nelle lanterne avevano raggiunto il peso maggiore (differente dall'*upwelling* e dal più basso peso registrato per le *poches*) (Fig. 1D). L'indice di condizione indica che le vongole nelle poche non hanno aumentato il CI nei mesi. Al termine del test, questo è risultato essere il minore tra i supporti, mentre il CI tra lanterne e *upwelling* non è risultato significativamente differente. (Fig. 1E).

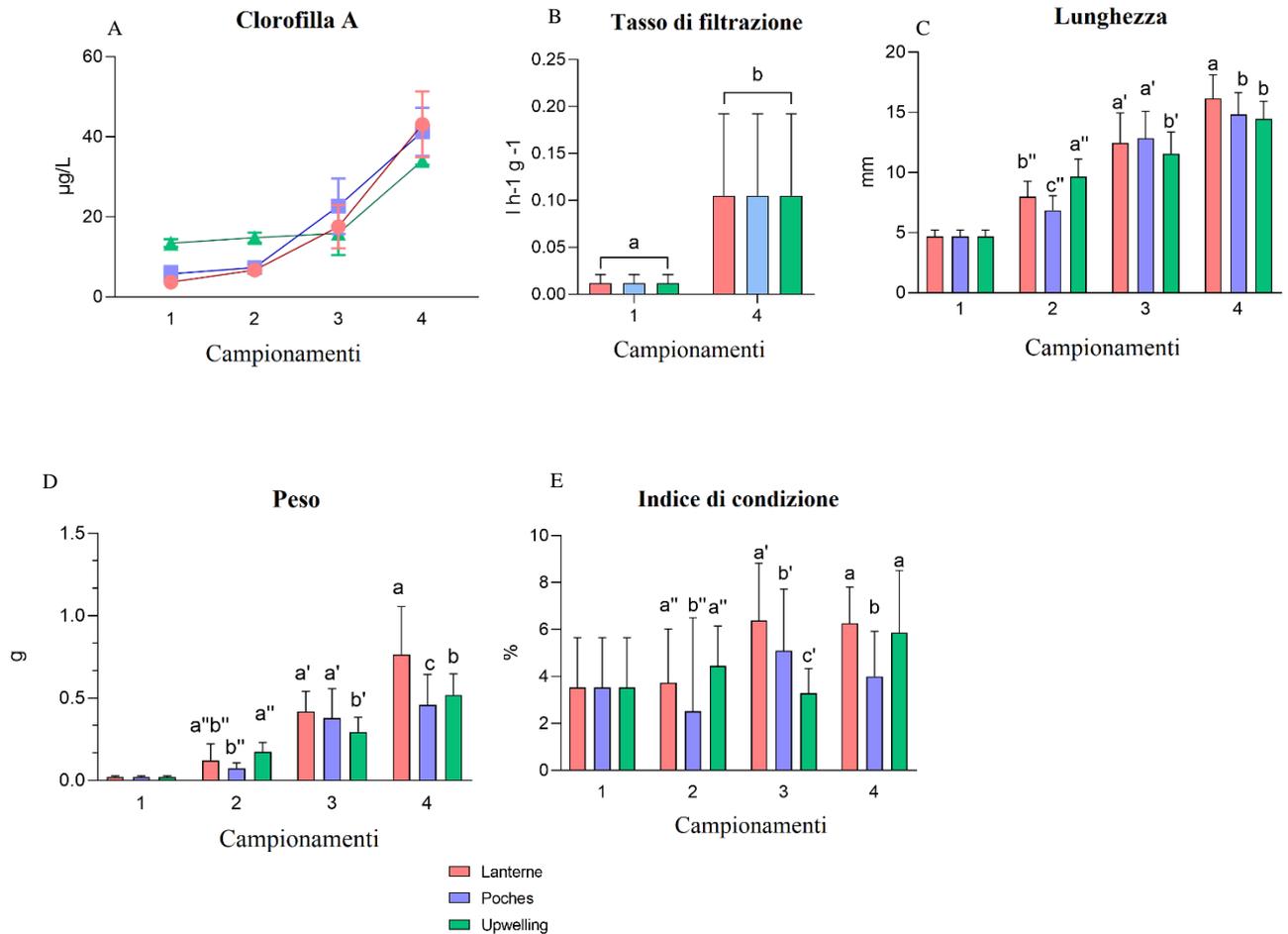


Fig. 1: A Chl (A), CR (B) lunghezza (C), peso (D), CI (E). Le lettere minuscole (a, b, c; a', b', c'; a'', b'', c'') rappresentano la differenza significativa in two-way ANOVA ($P < 0.05$).

Conclusioni

Osservando i molteplici parametri di crescita, le lanterne sembrano essere il supporto migliore per il seme di vongole verace, consentendo una più rapida crescita e migliore performance. Al contrario, le *poches* si sono dimostrate un sistema non efficiente, probabilmente dovuto al biofilm che si creava intorno alla maglia durante la prova, impedendo un sufficiente passaggio dell'acqua.

Finanziamento

Questa ricerca rientra nel Progetto BIVALVI (ERA-NET BlueBio: Advancing European bivalve production systems), che ha ricevuto fondi dall' European Union's Horizon2020 Research and Innovation programme under grant agreement no. 817992 (<https://bluebioeconomy.eu/advancing-european-bivalve-production-systems/>)

Bibliografia

- [1] Bertolini C., Brigolin D., Porporato E., Hattab J., Pastres R., Tiscar P. (2021) Testing a Model of Pacific Oysters' (*Crassostrea gigas*) Growth in the Adriatic Sea: Implications for Aquaculture Spatial Planning. Sustainability 13, 3309.
- [2] Roncarati A., Felici A., Dees A., Forlini L., Melotti P. (2010) Trials on Pacific oyster (*Crassostrea gigas* Thunberg) rearing in the middle Adriatic Sea by means of different Trays. Aquacult Int 18:35–43.

Interazioni tra le Tartarughe Marine e le attività di Mitilicoltura: prima ricerca Italiana

L. Di Renzo^{1,2}, G. Mariani¹, M. Matiddi³, C. Silvestri³, E. Nerone¹, S. Recchi¹, G. Mascilongo¹, F. Pizzurro¹, C. Profico^{1,2}, C. Giansante¹, G. Di Francesco¹, F. Di Giacinto¹, N. Ferri¹, G. Prioli⁴, G. Gioacchini⁵

¹ Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Abruzzo e del Molise –Teramo, (TE)

² Centro studi Cetacei Onlus –Pescara (PE)

³ ISPRA, Istituto Nazionale per la Protezione e la Ricerca Ambientale - Roma, (RM)

⁴ Associazione Mediterranea Acquacoltori

⁵ Dipartimento di Scienze della Vita e dell'Ambiente, Università Politecnica delle Marche, Ancona (AN)

Keywords: Mitili, tartarughe marine, bioturbazione

Introduzione

L'acquacoltura marina è stato uno dei settori alimentari in più rapida crescita su scala mondiale negli ultimi 20 anni [1-3]. In particolare la molluschicoltura rappresenta una risorsa rilevante nella quale la mitilicoltura – anche praticata offshore - gioca un ruolo importante. Gli allevamenti marini attraggono una elevata biodiversità in termini di megafauna, tra cui foche (*Phoca vitulina*), foche grigie (*Halichoerus grypus*), tursiopi (*Tursiops truncatus*), cormorani (*Phalacrocorax carbo*), orate (*Sparus aurata*), aironi cenerini (*Ardea cinerea*), gabbiani (*Larus spp.*), pellicani (*Pelecanus spp.*), svassi (*Podiceps spp.*) [4-10]. In tutti i casi, l'aumento di biodiversità negli allevamenti a mare è principalmente legata alla disponibilità di risorse trofiche, in termini di residui d'allevamento e fauna aggregata [11-13]. Questi gruppi faunistici possono interagire tra loro, generando un ecosistema artificiale [11,12,13]. Le relazioni ecologiche (predazione, competizione), le interazioni con le attività umane (allevamento, raccolta) e le condizioni ambientali, determinano l'entità degli effetti complessivi [20]. L'analisi trofica mista (MTI) [19] suggerisce che le attività di acquacoltura hanno un piccolo impatto positivo su pesci zooplanctonici, cormorani, tursiopi e cefali comuni, nonché sulla riduzione delle emissioni di gas serra favorita soprattutto dagli allevamenti di mitili [21]. Tuttavia, queste interazioni spesso portano ad effetti negativi sia in termini di produzione agricola che di fauna selvatica. La perdita di produzione è stata osservata in diversi modi a seconda delle specie di predatori coinvolte. Nel complesso, l'impatto dei predatori marini in questo settore è stato stimato in una perdita del 2-10 % della produzione lorda a causa dei mammiferi, in particolare delle foche [22]. La predazione diretta dalle gabbie è stata evidente per gli uccelli marini, mentre è più difficile da osservare con altra fauna marina, come i tursiopi [23]. Inoltre, le operazioni di prevenzione della predazione da parte di specie marine protette comportano acquacoltura marina per le specie marine protette comportano impatti potenziali, tra cui l'esclusione dell'habitat, l'intrappolamento, le collisioni e le modifiche comportamentali. In generale, la letteratura si è concentrata sui mammiferi marini, pesci e uccelli marini [9-18] mentre mancano informazioni sulle tartarughe. I sempre più frequenti e repentini cambiamenti ambientali e climatici portano a nuovi fenomeni che incidono sulle produzioni. Uno dei fenomeni emergenti è la sempre più frequente interazione con le tartarughe marine, mai investigata prima. Questa specie, a causa di molteplici fattori, quali ad esempio la riduzione degli stock ittici e l'aumento delle temperature nell'ambiente marino mediterraneo, stanno cambiando gli areali di distribuzione e foraggiamento [4] e sono segnalate sempre con maggiore frequenza in prossimità degli impianti off-shore di mitili. Controllare e comprendere gli *shift* ecologici nelle di allevamento, permette non solo il monitoraggio dell'ambiente marino ma anche un maggiore controllo delle fasi del ciclo vitale delle specie allevate aprendo le porte alla messa a punto di strategie atte a migliorarne la produzione.

Summary

Sea turtles are an increasing source of disturbance in mussel farms. Although it is now well known among aquaculture operators that the bioturbation of mussel farms by sea turtles causes several damages and a significant economic loss that is not estimated yet, currently there are no data available on this matter to support this evidence. This represents an ecological and biological knowledge gap and also for information to consider the possibility of economic compensation. In the present study, the frequency of *Mytilus galloprovincialis* ingestion was inspected from the digestive tract content of *Caretta caretta*, and an assessment questionnaire was designed and submitted to 32 aquaculture operators involved in mussel farming in Italy. The data were processed to verify the incidence of the phenomenon, trying to understand possible common factors present in the plants concerned. The results clearly show that mussels are a frequent food for the species and that the interaction of sea turtles is increasingly causing damage to ecological balance and, also to the economic aspect of Italian mussel farmers.

Materiali e metodi

Al fine di valutare l'ingestione di mitili da parte delle tartarughe marine, sono stati raccolti i dati archiviati di uno studio eseguito per la valutazione dell'alimentazione degli esemplari di *C. caretta* - specie principale nel Mar Mediterraneo - [4] relativi agli anni 2018, 2019, 2020 e 2021 svolto su campioni prelevati da carcasse rinvenute lungo le coste. È stato inoltre formulato un sondaggio online, inviato tramite l'applicativo *WhatsApp*, destinato ai mitilicoltori presenti sul territorio Nazionale. Il sondaggio è composto da 4 sezioni: (1) una sezione destinata ai dati dell'azienda; (2) una sezione, composta da 13 domande, per la segnalazione della presenza e le caratteristiche di altre specie presenti nella zona di allevamento, comprese le tartarughe marine; (3) una sezione di 10 domande destinata alla raccolta dati relativi all'interazione specifica, ove rilevata la presenza delle tartarughe; (4) Inoltre il sondaggio si compone di una sezione note per permettere di argomentare le problematiche e di allegare immagini a supporto del riconoscimento di specie, e per la valutazione di gradimento del test.

Risultati e discussione

Sono stati valutati i dati relativi all'ingestione di 89 carcasse di *C. caretta* esaminate nel periodo 2018-2021. I phyla più frequenti registrati sono stati Arthropoda (94,4%), Mollusca (62,9%) e Chordata, questi ultimi rappresentati principalmente da pesci (34,7%). Tra il 62,9 % di individui che si sono alimentati di mollusca il 62,5% ha preferito i Bivalvi rappresentati per il 37,14% da *M. galloprovincialis*. Rappresentando questa specie l'unico alimento per due femmine adulte (peso secco totale 384,2 g e 215,2 g rispettivamente). Sono stati sottoposti al sondaggio n. 32 mitilicoltori con impianti a mare nell'area marina italiana così suddivisi nelle regioni: n. 8 Veneto, n. 8 Emilia Romagna, n.1 Marche, n. 5 Abruzzo, n.3 Molise, n. 3 Puglia, n. 1 Liguria, n. 2 Campania e n.1 Sicilia. Il 100% dei mitilicoltori dichiara la presenza nell'area dell'impianto di altre specie marine tra le quali troviamo tartarughe marine (90%), delfini (53,3%) e orate (30%). La specie di tartaruga marina maggiormente segnalata è la *C. caretta* (43,3%) in un solo caso la *C. mydas*. Nel 71,9% degli impianti è possibile osservare più di un esemplare per volta da un minimo di due, fino a 10 come segnalato da un impianto Pugliese (TA) arrivando ad un massimo da 30 a 100 esemplari contemporaneamente segnalati in Emilia Romagna. Raramente (19%) è presente un solo esemplare. Le tartarughe osservate hanno dimensioni che variano da 40 a 100 cm (media 75,7 cm). Il periodo dell'anno durante il quale si osservano le tartarughe marine negli impianti è l'estate, con frequenza maggiore nei mesi di giugno, luglio ed agosto, ed in maggior modo durante la mattina. Mentre il 26,7% dei mitilicoltori dichiara di osservare tartarughe marine da sempre, il 68,8% riferisce il fenomeno agli ultimi anni (con una media di 5 anni). In generale il 90 % dei mitilicoltori dichiarano che negli ultimi anni ci sono dei cambiamenti nell'impianto, non per scelte aziendali, ma ambientali. Infatti, sia chi ha segnalato la presenza del fenomeno sia chi non lo abbia riportato, riferisce un aumento della temperatura dell'acqua nella zona di competenza. Proprio l'aumento della temperatura è la principale spiegazione che formulano la maggior parte dei mitilicoltori che osservano tartarughe nell'allevamento. Questa, è seguita da un'altra ipotesi: una diminuzione di alimento in mare per queste specie. Il 92% dei mitilicoltori riscontra danni relativi alla presenza di questa specie nel proprio vivaio. Solo in due allevamenti, seppur rilevata la presenza della specie, l'acquacoltore non riscontra danni. I danni apportati si riferiscono per l'81,5% alla rottura delle reti (calze, retine, reste o trecce) provocate nel tentativo di mangiare le cozze contenute, il cui contenuto viene poi disperso (o mangiato). Nell'11% dei casi è riferito al deterioramento dei pergolati che vengono morsi. Questi danni interessano maggiormente (76,9%) tutto l'allevamento e nello specifico l'intera colonna, mentre in alcuni casi (23,2%) interessa solo una parte dell'allevamento e nello specifico la porzione superficiale. Principalmente le tartarughe apportano i danni sopra descritti nella fase di semina del prodotto (40,9%) o nelle ultime fasi (ingrasso-27,27%; prevendita- 22,73%). Il 77% dei mitilicoltori ritiene che il danno si aggira tra i 1000 e i 500000 kg (media 91210,53 kg) di prodotto perso per anno. Tra questi il 50% stima il danno economico per un valore che va dai 15000 ai 300000 euro (media 78230,77). La principale specie segnalata è la *C. caretta*, come atteso essendo la specie più comune nel mar Mediterraneo. Considerate anche le preferenze alimentari della specie, c'è una correlazione positiva negli anni del numero di esemplari che ingeriscono *M. galloprovincialis*. I dati mostrano come è solito osservare più esemplari, di dimensioni medio grandi, in prossimità degli allevamenti nelle mattine d'estate. Questo fenomeno, sempre più frequente, è possibile attribuirlo all'aumento delle temperature, che inevitabilmente stanno modificando le abitudini della specie, e alla sempre più scarsa risorsa ittica, fonte di cibo per la specie. La presenza di *C. caretta* è, nella maggior parte dei casi, associata a danni a carico dell'allevatore, con ingenti perdite produttive che interessano le fasi iniziali e finali della produzione. Al momento non sono previsti indennizzi per i mitilicoltori e questi dati potrebbero rappresentare un primo passo in questa direzione. Questo studio, il primo attualmente presente a livello mondiale, è importante per una migliore comprensione dell'ecologia della *C. caretta* alla luce della progressiva espansione dei settori dell'acquacoltura. Ulteriori approfondimenti e una maggiore coinvolgimento dei mitilicoltori sono necessari per riuscire a comprendere nello specifico alcuni aspetti relativi al fenomeno e per riuscire a progettare una strategia di mitigazione. Parallelamente, a partire dai dati raccolti, sarà possibile sensibilizzare il ministero formulando una comunicazione ai fini di un possibile indennizzo a favore dei mitilicoltori.

Bibliografía

- [1] FAO The State of World Fisheries and Aquaculture 2020. Retrieved October 7 2021 from: <http://www.fao.org/state-of-fisheries-aquaculture>; NAYLOR, Rosamond L., et al. A 20-year retrospective review of global aquaculture. *Nature*, 2021, 591.7851: 551-563.
- [2] Bostock J., McAndrew B., Richards R., Jauncey K., Telfer T., Lorenzen K., Little D., Ross L., Handisyde N., Gatward I., Corner R. 2010. "Aquaculture: global status and trends. *Philosophical Transactions of the Royal Society*". *Biological Sciences* 365: 2897–2912.
- [3] Naylor R.L., Hardy R.W., Buschmann A.H. et al. 2021. "A 20-year retrospective review of global aquaculture". *Nature* 591, 551–563. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03308-6>.
- [4] Rueggeberg H., Booth J. 1989. "Interactions between wildlife and salmon farms in British Columbia". Canadian Wildlife Service.
- [5] Pemberton D., Shaughnessy P. D. 1993. "Interaction between seals and marine fish-farms in Tasmania, and management of the 81 problem". *Aquatic Conservation: marine and freshwater ecosystems* 3.2: 149-158.
- [6] Morris D.S. 1996. "Seal predation at salmon farms in Maine, an overview of the problem and potential solutions". *Marine Technology Society Journal*, 30.2: 39-43.
- [7] Kemper C.M., Pemberton D., Cawthorn M., Heinrich S., Mann J., Würsig B., Shaughnessy P. & Gales R. 2003. "Aquaculture and marine mammals: co-existence or conflict?" in N Gales, M Hindell & R Kirkwood (eds), *Marine mammals: fisheries, tourism, and management issues*. CSIRO Publishing, pp. 208-22512.
- [8] Díaz Lopez B., Marini L., Polo F.2005. "The impact of a fish farm on a bottlenose dolphin population in the Mediterranean Sea". *Thalassas*,21.2: 65-70.
- [9] Díaz Lopez B. 2012. "Bottlenose dolphins and aquaculture: interaction and site fidelity on the north-eastern coast of Sardinia (Italy)". *Marine biology*, 159.10: 2161-2172.
- [10] Bath G.E., Price C.A., Riley K.L., Morris J.A. 2023. "A global review of protected species interactions with marine aquaculture". *Reviews in Aquaculture*, 1- 34. doi:10.1111/raq.12811
- [11] Díaz Lopez B. 2006. "Bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*) predation on a marine fin fish farm: some underwater observations". *Aquatic Mammals*, 32.3: 305.
- [12] Ballester-Moltó M., Sanchez-Jerez P., García-García B., & Aguado-Giménez F. (2015). "Husbandry and environmental conditions explain temporal variability of wild fish assemblages aggregated around a Mediterranean fish farm". *Aquaculture Environment Interactions*, 7, 193-203..
- [13] Gonzalez-Silvera D., Izquierdo-Gomez D., Fernandez-Gonzalez V., Martínez-López F.J., López-Jiménez J.A., Sanchez-Jerez P. 2015. "Mediterranean fouling communities assimilate the organic matter derived from coastal fish farms as a new trophic resource". *Marine Pollution Bulletin.*, 91(1):45-53. doi: 10.1016/j.marpolbul.2014.12.029. Epub 2015 Jan 7. PMID: 25577476.
- [14] Díaz Lopez B., Bunke M., Shirai J.A.B. 2008. "Marine aquaculture off Sardinia Island (Italy): ecosystem effects evaluated through a trophic mass-balance model". *Ecological modelling*, 2008, 212.3-4: 292-303.
- [15] Aguado-Giménez F., Eguía-Martínez S., Cerezo-Valverde J., García-García B. 2018. "Spatio-temporal variability of ichthyophagous bird assemblage around western Mediterranean open-sea cage fish farms". *Mar Environ Res*, 140:126-134. doi: 10.1016/j.marenvres.2018.06.008. Epub 2018 Jun 15. PMID: 29910028.
- [16] Martini A., Cali M., Capoccioni F., Martinoli M., Pulcini D., Buttazzoni L., Moranduzzo T., Pirlo G. 2022. "Environmental performance and shell formation-related carbon flows for mussel farming systems". *Science of The Total Environment*, Volume 831, 154891, ISSN 0048-9697, <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.154891>.
- [17] Nash C.E., Iwamoto R.N., Mahnken C.VW. 2000. "Aquaculture risk management and marine mammal interactions in the Pacific Northwest". *Aquaculture*, 183.3-4: 307-323.
- [18] Díaz Lopez B. 2017. "Temporal variability in predator presence around a fin fish farm in the Northwestern Mediterranean Sea. *Marine Ecology*", 38.1: e12378.
- [19] Mariani G., Bellucci F., Cocumelli C., Raso C., Hochscheid S., Roncari C., Nerone E., Recchi S., Di Giacinto F., Olivieri V., Pulsoni S., Matiddi M., Silvestri C., Ferri N., Di Renzo L. 2023. "Dietary Preferences of Loggerhead Sea Turtles (*Caretta caretta*) in Two Mediterranean Feeding Grounds: Does Prey Selection Change with Habitat Use throughout Their Life Cycle?" *Animals*, 13(4):654. <https://doi.org/10.3390/ani13040654>.

Attività di monitoraggio delle aree classificate per molluschi bivalvi nel medio Adriatico nel periodo 2020 – 2022

P. Di Taranto¹, G. Torzi², W. Di Nardo², F. Di Fonzo², F. Pagano², M. Genovesi², F. Barbone², Q. Rossi², L. Di Renzo³, E. Nerone⁴, R. Nardella⁴, G. Normanno⁵, A. Parisi¹

¹ Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Puglia e della Basilicata – Foggia

² Servizio Igiene degli allevamenti e delle produzioni zootecniche - Azienda Sanitaria Locale 02 Abruzzo Lanciano-Vasto-Chieti

³ Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell’Abruzzo e del Molise – Teramo

⁴ Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell’Abruzzo e del Molise – Termoli

⁵ Dipartimento di scienze agrarie, alimenti, risorse naturali e ingegneria – Università degli Studi di Foggia

Keywords: molluschi bivalvi, monitoraggio, *Escherichia coli*, *Salmonella*, Mare Adriatico

Introduzione

L’area marina antistante la costa chietina presenta zone classificate per la produzione di molluschi bivalvi nelle quali esiste una fiorente attività di mitilicoltura e di raccolta da banchi naturali. Il monitoraggio delle zone classificate di produzione è esercitato dall’Autorità competente che, ai sensi dell’art. 59 del Reg. (UE) 2019/627 [1], ha il compito di controllare: che non siano commesse infrazioni circa l’origine, la provenienza e la destinazione dei molluschi bivalvi vivi; la qualità microbiologica dei molluschi bivalvi vivi relativamente alle zone classificate di produzione; la presenza di plancton tossico nelle acque di produzione e di biotossine marine nei molluschi bivalvi vivi; la presenza di contaminanti chimici nei molluschi bivalvi vivi. Lo scopo del presente lavoro è stato di verificare il mantenimento dei requisiti sanitari di zone di mare classificate, di effettuare un controllo sanitario dei molluschi bivalvi al fine di tutelare la salute del consumatore finale e di implementare i dati relativi al monitoraggio delle aree classificate per i molluschi bivalvi raccolti nelle acque del medio Adriatico.

Summary

According to Regulation (EU) n. 2019/617, the monitoring of classified production areas for live bivalve molluscs is carried out by the component authorities in order to check: that there is no malpractice with regard to the origin, provenance and destination of live bivalve molluscs; the microbiological quality of live bivalve molluscs in relation to the classified production and relaying areas; for the presence of toxin-producing plankton in production and relaying waters and marine biotoxins in live bivalve molluscs; for the presence of chemical contaminants in live bivalve molluscs. In order to verify compliance with Union legislation, during a three-years period (2020-2022) 1332 mollusc and water samples were harvested from Mid Adriatic Sea by Local Health Authority of Chieti (ASL 02 Abruzzo) and analysed in the laboratories of the Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell’Abruzzo e del Molise “G. Caporale”.

The aim of this work was to monitor the sanitary status of classified production areas and to control contaminant levels in order to ensure that live bivalve molluscs placed on the market were fit for human consumption.

Materiali e metodi

Durante il triennio 2020-2022, nell’ambito delle attività di monitoraggio delle aree classificate per molluschi bivalvi, sono stati prelevati 1332 campioni di mitili (*Mytilus galloprovincialis*), vongole (*Venus gallina*) e acqua di mare dal personale del Servizio Veterinario Igiene degli allevamenti e delle produzioni zootecniche della ASL02 Abruzzo Lanciano-Vasto-Chieti nei tratti marino costieri di competenza della Provincia di Chieti. I campionamenti sono stati effettuati presso aree di mare già classificate, e più precisamente su n. 4 allevamenti di mitili (*Mytilus galloprovincialis*) e presso n. 9 banchi naturali adibiti alla raccolta di vongole (*Venus gallina*). In merito alla frequenza di campionamento e agli analiti da determinare si è provveduto a rispettare quanto riportato nel Piano pluriennale regionale integrato dei controlli della Sanità Pubblica veterinaria e Sicurezza Alimentare della Regione Abruzzo (PPRIC) 2020-2022 [2]. I campioni sono stati analizzati presso i laboratori dell’Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell’Abruzzo e del Molise “G. Caporale” secondo le ISO di riferimento. I risultati analitici ottenuti sono stati confrontati con i limiti fissati dalla normativa vigente.

Risultati e discussione

Il 5,48% (73/1332) dei campioni di cozze, vongole e acqua di mare prelevati nel triennio 2020-2022 è risultato non conforme ai parametri di legge. Più precisamente, gli esami effettuati sui mitili (*Mytilus galloprovincialis*) hanno evidenziato che solo 11 (1,83%) campioni dei 600 analizzati è risultato non conforme. Trattasi, in 7 casi su 11, di non conformità analitiche dovute a livelli di *Escherichia coli* superiori agli standard stabiliti dalla normativa vigente delle zone classificate come “Classe A” (*E. coli* MPN/100 g < 230) e, per la restante parte,

di non conformità legate a livelli di biotossine algali superiori ai limiti di legge. Per quanto riguarda il piano di monitoraggio delle vongole (*Venus gallina*), l'8,46% dei 732 campioni analizzati è risultato non conforme. Trattasi, in 58 casi su 62, di non conformità analitiche dovute a livelli di *Escherichia coli* superiori agli standard stabiliti dalla normativa vigente delle zone classificate come "Classe A" (*E. coli* MPN/100 g < 230) e, per i restanti casi sfavorevoli, di non conformità legate alla rilevazione di *Salmonella* spp.. I dati ottenuti forniscono una fotografia della buona qualità sanitaria complessiva delle zone di mare del medio Adriatico adibite alla raccolta dei molluschi bivalvi riportando percentuali di non conformità molto basse. La disparità del numero di non conformità registrate per i campioni di vongole, 62 esiti sfavorevoli (84,9%), rispetto ai campioni di mitili, 11 esiti sfavorevoli (15,1%), è dovuta molto probabilmente alla diversa distanza dalla costa dei punti di campionamento. I punti di prelievo dei banchi naturali sono, infatti, fissati a 0.3, 0.6 e 1 miglia nautiche dalla costa rispetto alla localizzazione degli impianti di molluschicoltura che è oltre le 2 miglia nautiche. La maggiore vicinanza alla costa dei punti di prelievo dei transetti, e quindi alle foci dei fiumi, può essere il motivo di una maggiore contaminazione del prodotto da *Escherichia coli* e *Salmonella* spp. a causa dello sversamento in mare aperto di portate d'acqua significative a seguito di abbondanti piogge e di eventi meteorologici avversi (Kay *et al.*, 2008) [3]. A ciò si aggiunge anche l'influenza della corrente marina dell'Adriatico (*Western Adriatic Current*) che scorre al largo della costa italiana con direzione da Nord a Sud-Est trasportando acque diluite e cariche di sedimenti fini e altri materiali immessi da tutti i fiumi nord adriatici verso le aree più meridionali del bacino. Si stima che tale corrente raggiunga la massima intensità a circa 2-3 miglia marine dalla riva. Questa condizione sembra aver influenzato il trend delle non conformità che mostrano un andamento stagionale. Il maggior numero di esiti sfavorevoli, infatti, si sono registrati nei mesi invernali (da ottobre a gennaio), periodo dell'anno caratterizzato dal maltempo e da numerose e abbondanti piogge. Le non conformità causate dal superamento dei limiti di biotossine algali, avvenute principalmente nei mesi di aprile, maggio e ottobre, sembrano confermare il trend di crescita stagionale delle microalghe che presenta un picco ad inizio primavera ed un picco ad inizio autunno, segno che la loro moltiplicazione è influenzata dall'innalzamento della temperatura dell'acqua (Rubini *et al.*, 2021) [4]. È importante sottolineare che il superamento dei livelli di *Escherichia coli* e di biotossine algali e la rilevazione di *Salmonella* spp. nel triennio in esame è risultato sempre un fenomeno temporaneo e non persistente. Tutte le non conformità, infatti, sono state risolte in breve tempo in occasione dei campionamenti di mitili e vongole successivi. In conclusione, l'ingente numero di campioni programmati e l'elevata frequenza di campionamento stabiliti dal piano di monitoraggio hanno consentito di tenere costantemente sotto controllo i valori delle determinazioni sottoposte ad analisi al fine di evitare di immettere sul mercato un prodotto contaminato. L'attività svolta dal personale del Servizio Veterinario Igiene degli allevamenti e delle produzioni zootecniche della ASL 02 Abruzzo Lanciano-Vasto-Chieti in occasione del piano di monitoraggio dei molluschi bivalvi nel triennio 2020-2022 ha avuto l'obiettivo di verificare il mantenimento dei requisiti sanitari di zone di mare classificate, di implementare i dati relativi al monitoraggio delle aree classificate per i molluschi bivalvi raccolti nelle acque del medio Adriatico e di evidenziare sempre di più l'importanza del ruolo del medico veterinario nell'ambito della sicurezza alimentare.

Bibliografia

- [1] Regolamento di esecuzione (UE) 2019/627 della Commissione, del 15 marzo 2019, che stabilisce modalità pratiche uniformi per l'esecuzione dei controlli ufficiali sui prodotti di origine animale destinati al consumo umano in conformità al regolamento (UE) 2017/625 del Parlamento europeo e del Consiglio e che modifica il regolamento (CE) n. 2074/2005 della Commissione per quanto riguarda i controlli ufficiali. Gazzetta Ufficiale dell'Unione Europea. L. 131/151, 17.5.2019, pp. 1-50.
- [2] Piano pluriennale regionale integrato dei controlli della Sanità Pubblica veterinaria e Sicurezza Alimentare della Regione Abruzzo (PPRIC) 2020-2022. 4ª Edizione. Giunta Regionale D'Abruzzo. Assessorato Regionale alla Salute, Famiglia e Pari Opportunità. Dipartimento di Sanità. Sanità Veterinaria e Sicurezza Alimentare.
- [3] Kay D., Kershaw S., Lee R., Wyer M. D., Watkins J., Francis C., 2008. *Results of field investigations into the impact of intermittent sewage discharge on the microbial quality of wild mussels (Mytilus edulis) in a tidal estuary*. Water Res. 42:3033-3046.
- [4] Rubini, S., Albonetti, S., Menotta, S., Cervo, A., Callegari, E., Cangini, M., Dall'Ara, S., Baldini, E., Vertuani, S., Manfredini, S., 2021. *New trends in the occurrence of Yessotoxins in the northwestern Adriatic sea*. Toxins, 13(9), 634.

Molluschicoltura Multitrofica Sostenibile-Gargano (Mol.Mul.SOS–Gargano)

M. Francavilla¹, P. Marasco¹, D. Racca¹, M. Marone¹, F. Contillo¹, G. Paziienza², D.P. Debernardis², G. Normanno²

¹ STAR*Facility Centre, Department of Agriculture, Food, Natural Resources and Engineering (DAFNE), University of Foggia, Via Napoli 25, 71122 Foggia, Italy

² Department of Agriculture, Food, Natural Resources and Engineering (DAFNE), University of Foggia, Via Napoli 25, 71122 Foggia, Italy

Keywords: Molluschicoltura, IMTA, Macroalghe, Biosicurezza, Living-lab

Introduzione

L'idea del progetto Molluschicoltura Multitrofica Sostenibile-Gargano (Mol.Mul.SOS–Gargano) (FEAMP 2014/2020 MISURA 2.47 “Innovazione”, Regione Puglia) nasce come risposta alla crescente domanda di innovazione/diversificazione e alle crescenti preoccupazioni degli operatori del settore *molluschicoltura* dell'area garganica del Mar Adriatico per i diffusi e frequenti fenomeni di mortalità dei molluschi e conseguente crollo delle vendite, tema ricorrente e ben noto alla Regione Puglia. La realizzazione di questo progetto di interesse collettivo, trova ulteriori ragioni d'essere nel manifestarsi di altre criticità del settore (ad es. contaminazione da biotossine algali e microplastiche) a cui si aggiungono ulteriori preoccupazioni per la grave crisi economica e la probabile stagnazione produttiva dovuta alla pandemia Covid-19. L'analisi preliminare del progetto è stata condivisa con gli operatori del comparto nel corso di varie iniziative. Il confronto con i produttori e i rappresentanti delle associazioni è avvenuto durante vari incontri informativi-formativi tematici, svolti alla presenza di tecnici e ricercatori. Da questi incontri è emersa una esigenza di supporto alla categoria, viste le carenze organizzative e le limitate capacità di gestione delle attività produttive sviluppate sull'intera area, e rafforzare le conoscenze climatico/ambientali/sanitarie.

Summary

The idea of the Molluschicoltura Multitrofica Sostenibile-Gargano Project (Mol.Mul.SOS–Gargano) (FEAMP 2014/2020 MISURA 2.47 “Innovazione”, Regione Puglia) was born as a response to the growing demand for innovation/diversification and to the growing concerns of operators in the shellfish farming sector in the Gargano area of the Adriatic Sea due to the widespread and frequent phenomena of shellfish mortality and consequent collapse in sales, a recurring and well-known theme in the Apulia Region. The realization of this project of collective interest finds further reasons for being in the manifestation of other critical issues in the sector (e.g. contamination by algal biotoxins and microplastics) to which are added further concerns for the serious economic crisis and the probable production stagnation due to the Covid-19 pandemic. The preliminary analysis of the project was shared with sector operators during various initiatives. The discussion with the producers and representatives of the associations took place during various thematic information-training meetings, held in the presence of technicians and researchers. From these meetings, a need emerged to support the category, given the organizational deficiencies and limited management capabilities of the production activities developed across the entire area, and to strengthen climate/environmental/health knowledge.

Metodologia

Il progetto, in via di esecuzione, ha come obiettivo lo sviluppo tecnologico e l'innovazione, mediante il supporto dell'attività di Ricerca Accademica finalizzata alla ristrutturazione dell'attuale sistema produttivo su *long-line*, generando una nuova molluschicoltura ad elevata compatibilità ambientale, basata su metodi di produzione sostenibili (molluschicoltura multitrofica integrata) (Fig.1), nella realizzazione di processi di blu bioraffineria sequenziali (a cascata), ispirati ai principi della “Green Chemistry”, al fine di valorizzare la biomassa della macroalga *Gracilaria gracilis*, prodotta in sistemi di acquacoltura multitrofica integrata. Mediante l'estrazione e produzione di composti bioattivi, biomateriali, biostimolante e biofuels, si intende realizzare processi di Economia Circolare, ottimizzando l'utilizzo della materia in ingresso e riducendo la generazione di residui. Pertanto, lo studio della composizione biochimica della biomassa algale come fonte “multiprodotto”, adottando tecniche estrattive green e non convenzionali, rappresenta il punto di partenza dell'attività di ricerca. Saranno, inoltre, sviluppate buone pratiche in materia di biosicurezza, salute e benessere degli animali, al fine di generare un prodotto salubre e di elevato standard qualitativo. Infine, il progetto ha messo in atto azioni di condivisione di *know-how* attraverso il coinvolgimento diretto degli operatori in attività di laboratorio sul campo (*living-lab*), favorendo l'acquisizione di nuove conoscenze tecnico-scientifiche sulle condizioni ecologico-ambientali e di competenze gestionali integrative. Infine, la realizzazione di *focus-group* specifici è stata finalizzata a definire la prospettiva comune su cui la comunità locale (interesse collettivo) intende orientarsi per accrescere e ampliare le prospettive di business e il benessere sociale.



Mol.Mul.SOS – Gargano
Molluschicoltura Multitrofica
Sostenibile nel Gargano



*Mis. 2.47 | Reg. UE n. 508/2014 | Art. 47 | Cod. id.
0001/INA/20/ CUP B79J20003170009*



Figura 1. Sistemi di produzione multitrofica in corso di sperimentazione nell'ambito delle attività del progetto Mol.Mul.Sos Gargano

Valutazione dei risultati del monitoraggio igienico sanitario per la ricerca di metalli pesanti in molluschi bivalvi prodotti in Veneto dal 2014 al 2022

E. Franzago¹, M. Toson¹, G. Binato¹, A. Gallina¹, M. Corazza², G. Fornasiero³, A. Ristori³, P. Fumelli⁴, A.L. Amorena⁵, G. Lunardelli¹, M. Dalla Pozza¹, G. Arcangeli¹, L. Bille¹

¹) Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie – Legnaro (PD)

²) Az. ULSS 4 – Veneto Orientale – San Donà di Piave (VE)

³) Az. ULSS 3 – Serenissima – Venezia (VE)

⁴) Az. ULSS 5 – Polesana – Rovigo (RO)

⁵) Regione Veneto - U.O. Sicurezza Alimentare - Venezia (VE)

Keywords: Cadmio, Mercurio, Piombo, Molluschi

Introduzione

Dopo Spagna (~231.000 t) e Francia (~148.000 t), l'Italia risulta essere il terzo produttore europeo di molluschi bivalvi (MB) (~93.000 t) e la produzione nazionale consiste soprattutto in due specie, il mitilo (*Mytilus galloprovincialis*) (~ 62.000 t) e la vongola verace (*Ruditapes philippinarum*) (~31.000 t) [1]. La Regione Veneto è il secondo produttore nazionale di MB [2], potendo anche sfruttare un ampio bacino lagunare e marittimo. Tuttavia, il Nord Adriatico è un mare scarsamente profondo nonché zona di afflusso di numerosi fiumi i quali attraversano insediamenti urbani e zone industriali e vanno a costituire possibili fonti inquinanti [3, 4].

Tra i contaminanti ambientali ci sono i metalli pesanti, ossia Cadmio (Cd), Mercurio (Hg) e Piombo (Pb), che si possono accumulare nei prodotti ittici e, in particolare, negli organismi filtratori come i MB, il cui consumo può rappresentare un'importante fonte di esposizione per l'uomo [5].

La normativa europea [6] prevede il monitoraggio delle zone di produzione dei MB, per assicurare la conformità del prodotto rispetto ai limiti stabiliti dal Reg. (UE) 2023/915, anche per i metalli pesanti.

Lo scopo di questo lavoro è stato quello di effettuare un'analisi dei dati storici relativi alle concentrazioni di Pb, Cd e Hg rilevati nei molluschi campionati durante le attività di monitoraggio igienico-sanitario delle zone di produzione del Veneto nel periodo 2014-2022 aggiornando la precedente valutazione relativa al periodo 2007-2012 [5].

Summary

Heavy metals, such as cadmium (Cd), lead (Pb) and mercury (Hg), are ubiquitous in aquatic environments due to natural sources, industrial activities and urban runoff. Molluscs, as filter feeding organisms, can concentrate suspended particles, including heavy metal pollutants, in their tissues with potential risk for the consumer. In this study, the results of controls conducted on molluscs for heavy metals from 2014 to 2022 were evaluated through descriptive and statistical analysis. The detected contamination levels were generally far below legal limits. Cd levels generally higher than other species were detected in *Pectinidae* and oysters, particularly those reared at sea. Comparing the values found only in areas with coexistence of mussels and clams, mussels were found to have higher Cd values while clams had higher Hg contamination. On the other hand, when comparing geographical areas, lagoons recorded higher values than sea areas. Season doesn't seem to influence contamination levels.

Materiali e metodi

I dati relativi ai controlli per metalli pesanti svolti nel periodo 2014-2022 su molluschi e gasteropodi nell'ambito delle attività di monitoraggio delle zone di produzione del Veneto sono stati estratti dal gestionale di laboratorio dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie (IziLab).

I dati sono stati validati e sottoposti ad analisi descrittiva e statistica utilizzando il software Stata 17.0.

Per mettere a paragone i livelli di contaminazione riscontrati tra gruppi indipendenti (confronto tra specie di maggiore interesse commerciale (mitili e vongole veraci) e tra aree di campionamento) è stato applicato il test di Kruskal-Wallis, previa verifica dell'omoschedasticità dei dati mediante il test di Levene (si considerano significativi i test con p-value<0.05).

Risultati e discussione

Nel periodo 2014-2022 sono stati analizzati 2349 campioni per la ricerca di metalli pesanti (Cd, Pb e Hg).

La distribuzione della numerosità per specie rispecchia l'entità delle produzioni del Veneto, che sono principalmente basate sulla vongola verace e il mitilo, le quali rappresentano rispettivamente il 31% e 22% dei campioni. A seguire troviamo Lupini (13%) e Fasolari (8%) mentre il restante 26% è costituito da altre specie minori.

Per quanto riguarda il Cd non si evidenziano particolari criticità per i bivalvi, soprattutto quelli di maggior interesse commerciale [mitili: μ_{Cd} : 0,12 ± 0,05 mg/kg; vongole: μ_{Cd} : 0,06 ± 0,04 mg/kg].

L'unica eccezione è rappresentata dai murici i cui tenori di contaminazione si pongono su una scala diversa rispetto ai bivalvi in virtù della naturale tendenza ad accumulare Cd [7]. Prima del 2015 il riscontro di valori non conformi in queste specie era un evento molto comune. La nota n. 566 del 23/06/15 del l'Istituto Superiore di Sanità (ISS) ha stabilito che la determinazione del cadmio dovesse essere svolta solo sulla parte muscolare del gasteropode eliminando quindi l'epatopancreas, organo dove si accumula la maggior parte del Cd. In seguito a ciò non sono più stati rilevati valori non conformi. Inoltre, in considerazione del fatto che sono gasteropodi non filtratori, sono stati esclusi dall'elenco delle specie classificate in Veneto e vengono quindi sottoposti a controlli ufficiali nelle sale d'asta, centri spedizione molluschi o stabilimenti di trasformazione prodotti ittici.

Nei pettinidi (canestrelli e cappesante) sono state rilevate in due occasioni concentrazioni molto prossime al limite di legge (Cd: 1 mg/kg) pur risultando tecnicamente conformi, tenuto conto dell'incertezza di misura. Dalla letteratura è noto che i pettinidi possono accumulare elevati livelli di Cd, soprattutto nella ghiandola digestiva. A tal proposito, questi episodi potrebbero ragionevolmente essere imputabili alla non completa rimozione dell'epatopancreas durante la fase di preparazione del campione. La definizione di parte edibile data dalla normativa vigente per *Pecten Maxima* (Cappasanta Atlantica), viene infatti applicata per analogia ai pettinidi in generale.

Tra le altre specie, le ostriche sia piatte che concave hanno registrato concentrazioni tendenzialmente più alte di Cd, in particolare nelle zone a mare rispetto a quelle lagunari. In bibliografia per le ostriche sono riportati anche valori al di sopra dei 2 mg/kg [8, 9, 10] e l'accumulo sembra appunto essere influenzato da fattori ambientali, come ad esempio la salinità.

Le concentrazioni di Pb e Hg [mitili: μ_{Pb} : 0,18 \pm 0,10 mg/kg; vongole: μ_{Pb} : 0,19 \pm 0,10 mg/kg; mitili: μ_{Hg} : 0,03 \pm 0,01 mg/kg; vongole: μ_{Hg} : 0,04 \pm 0,03 mg/kg] non hanno destato alcuna preoccupazione in quanto sempre ampiamente al di sotto del limite di legge.

Per indagare eventuali differenze nella capacità di accumulare i contaminanti oggetto di studio tra specie, sono state prese in considerazione solo mitili e vongole, perché quelle di maggior interesse commerciale e, soprattutto, per le quali si hanno le maggiori numerosità campionarie. Sono inoltre stati considerati solo i campioni provenienti da zone di produzione dove vengono allevate entrambe e quindi sono teoricamente esposte ad uguale contaminazione ambientale (n=423).

I valori di Cd sono risultati significativamente più elevati nei mitili (MIT) rispetto alle vongole veraci (VV) (μ_{Cd} MIT 0,11 mg/kg vs μ_{Cd} VV 0,06 mg/kg) mentre per il Hg la situazione è opposta (μ_{Hg} VV 0,03 mg/Kg vs μ_{Hg} MIT 0,02 mg/Kg). Per il Pb i gruppi sono risultati non confrontabili.

Per valutare eventuali differenze nei livelli di contaminazione legate ai diversi ambienti, sono state considerate le macroaree Laguna di Venezia (LV), l'insieme delle lagune del Delta del Po (LDP) e, infine, le zone di produzione a mare (M). Le uniche differenze significative rilevate sono state per il Cd nelle vongole con LDP>LV (0,07 mg/Kg vs 0,05 mg/Kg) e per il Pb nei mitili con LV>M (0,18 mg/Kg vs 0,15 mg/Kg). Tutti gli altri confronti non sono stati possibili a causa di una elevata variabilità fra le aree. Tuttavia dal punto di vista descrittivo emerge che i valori sono leggermente più elevati nelle lagune rispetto al mare.

Andando a valutare l'andamento delle concentrazioni complessive dei metalli nel periodo di studio, non emergono particolari andamenti temporali negli anni.

In merito alla stagionalità, eseguendo una stratificazione per specie, sono emersi nelle vongole veraci valori più bassi in primavera-estate rispetto ad autunno-inverno in tutti gli anni. Questo è in accordo con quanto riportato da alcuni autori, secondo i quali l'aumento di volume dei molluschi durante la riproduzione che avviene nei mesi caldi favorirebbe l'effetto diluizione [10, 11, 12]. Secondo altri studi invece il Cd in primavera aumenterebbe a causa di una maggiore qualità dell'alimento presente nelle acque e per correlazione una migliore assimilazione di Cd [13] e invece valori più bassi in estate e autunno [14].

Conclusioni

L'analisi dei dati storici relativi ai risultati delle attività di monitoraggio delle zone di produzione molluschi nel periodo 2014-2022 non ha evidenziato particolari criticità in termini di superamento dei limiti normativi. Considerando questo fatto e che i livelli di contaminazione risultano sostanzialmente stabili nel tempo, non si rileva la necessità di una particolare intensificazione dei controlli (in merito la normativa vigente non detta regole specifiche), eventualmente si potrebbe sottoporre a controlli più ravvicinati nel tempo solo quelle specie che hanno evidenziato una maggiore variabilità del dato, nello specifico pettinidi e ostriche.

Bibliografia

- [1] FAO (2021). Fishery and Aquaculture Statistics, Aquaculture production, yearbook 2019. Available at: https://www.fao.org/fishery/static/Yearbook/YB2019_USBCard/navigation/index_content_aquaculture_e.htm#C;
- [2] Ispra (2019). Report on companies in aquaculture and production in Italy. Available at: https://annuario.isprambiente.it/sys_ind/381;
- [3] S.P.C Tankéré, N.B Price, P.J Statham, Mass balance of trace metals in the Adriatic Sea, Journal of Marine Systems, Volume 25, Issues 3–4, 2000, Pages 269-286, ISSN 0924-7963, [https://doi.org/10.1016/S0924-7963\(00\)00021-X](https://doi.org/10.1016/S0924-7963(00)00021-X);
- [4] Oliver Bajt, Andreja Ramšak, Vesna Milun, Bruno Andral, Giulia Romanelli, Alfonso Scarpato, Milena Mitrić, Tarik Kupusović, Zoran Kljajić, Michael Angelidis, Algi Çullaj, François Galgani, Assessing chemical contamination in the coastal waters of the Adriatic Sea

- using active mussel biomonitoring with *Mytilus galloprovincialis*, *Marine Pollution Bulletin*, Volume 141, 2019, Pages 283-298, ISSN 0025-326X, <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2019.02.007>;
- [5] Laura Bille, Giovanni Binato, Veronica Cappa, Marica Toson, Manuela Dalla Pozza, Giuseppe Arcangeli, Antonia Ricci, Roberto Angeletti, Roberto Piro, Lead, mercury and cadmium levels in edible marine molluscs and echinoderms from the Veneto Region (north-western Adriatic Sea – Italy), *Food Control*, Volume 50, 2015, Pages 362-370, ISSN 0956-7135, <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.09.018>;
- [6] EU Council. (2017). Regulation (EC) No 2017/625 of the European parliament and of the council of 15 March 2017 laying down specific rules for the organisation of official controls on products of animal origin intended for human consumption. on official controls and other official activities performed to ensure the application of food and feed law, rules on animal health and welfare, plant health and plant protection products, amending Regulations (EC) No 999/2001, (EC) No 396/2005, (EC) No 1069/2009, (EC) No 1107/2009, (EU) No 1151/2012, (EU) No 652/2014, (EU) 2016/429 and (EU) 2016/2031 of the European Parliament and of the Council, Council Regulations (EC) No 1/2005 and (EC) No 1099/2009 and Council Directives 98/58/EC, 1999/74/EC, 2007/43/EC, 2008/119/EC and 2008/120/EC, and repealing Regulations (EC) No 854/2004 and (EC) No 882/2004 of the European Parliament and of the Council, Council Directives 89/608/EEC, 89/662/EEC, 90/425/EEC, 91/496/EEC, 96/23/EC, 96/93/EC and 97/78/EC and Council Decision 92/438/EEC (Official Controls Regulation). *Official Journal of the European Union*, Series L 95/1, 7.4.2017;
- [7] Romeo, M., Gharbi-Bouraqoui, S., Gnassia-Barelli, M., Dellali, M., & Aïssa, P. (2006). Responses of *Hexaplex (Murex) trunculus* to selected pollutants. *Science of the Total Environment*, 359, 135e144;
- [8] Schallie, K. (2001). Results of the 2000 survey of cadmium in B.C. oysters. In G. M. Kruzynski, R. Addison, & R. W. Macdonald (Eds.), 2002. Proceedings of a workshop on possible pathways of cadmium into the Pacific oyster *Crassostrea gigas* as cultured on the coast of British Columbia, Institute of Ocean Sciences, March 6-7, 2001 (pp. 31e32). *Can. Tech. Rep. Fish. Aquat. Sci.* 2405, vi þ 65 pp.;
- [9] Kruzynski, G. M. (2001). Cadmium in BC cultured oyster: an overview. In G. M. Kruzynski, R. Addison, & R. W. Macdonald (Eds.), 2002. Proceedings of a workshop on possible pathways of cadmium into the Pacific oyster *Crassostrea gigas* as cultured on the coast of British Columbia;
- [10] Lekhi, P., Cassis, D., Pearce, C. M., Ebell, N., Maldonado, M. T., & Orians, K. J. (2008). Role of dissolved and particulate cadmium in the accumulation of cadmium in cultured oysters (*Crassostrea gigas*). *Science of the Total Environment*, 393, 309e325;
- [11] Guéguen, M., Amiard, J., Arnich, N., Badot, P., Claisse, D., Guérin, T., et al. (2011). Shellfish and residual chemical contaminants: Hazards, monitoring, and health risk assessment along french coasts. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 213, 55e111. http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4419-9860-6_3.
- [12] Devier MH, Augagneur S, Budzinski H, Le Menach K, Mora P, Narbonne JF, Garrigues P (2005) One-year monitoring survey of organic compounds (PAHs, PCBs, TBT), heavy metals and biomarkers in blue mussels from the Arcachon bay, France. *J Environ Monit* 7:224-240.
- [13] Max Blanc, J., Molinet, C., Díaz, P.A. et al. Drastic difference in cadmium concentration in mussels (*Mytilus chilensis*) observed between seasons in natural bed and aquaculture systems in Chile. *Environ Monit Assess* 191, 53 (2019). <https://doi.org/10.1007/s10661-018-7169-2>
- [14] V. Antoniou, N. Zantopoulos & S. Tsitsamis (1996) Heavy metal concentrations in mussels from the gulf of Olympias - Chalkidiki, Greece, *Journal of Environmental Science and Health Part A: Environmental Science and Engineering and Toxicology*, 31:1, 55-65, DOI: 10.1080/10934529609376343

Valorizzazione dei bivalvi prodotti in Puglia: indagine sullo stato sanitario ed influenza di fattori climatico-ambientali sullo sviluppo di patogeni. Implicazione sulla salute degli allevamenti e sulla salute pubblica

L.Guarino¹, G.Arcangeli², G.La Salandra¹, F.C. Basile³, A.M. Iacono¹, A.Vetri²

¹) Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Puglia e della Basilicata – Foggia

²) Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie – Legnaro(PD)

³) ASL Taranto/1 S.C. Igiene degli Alimenti di Origine Animale

Keywords: molluschi bivalvi, *Vibrio sp*, *Marteilia sp*, *OstreidHerpesvirus 1*, fattori climatico-ambientali

Introduzione

Nella regione Puglia, al terzo posto in Italia con una produzione di circa 10.000 tonnellate di molluschi bivalvi con 90 impianti censiti [1], la specie più allevata è il mitilo (*M. galloprovincialis*), seguita negli ultimi anni da alcuni allevamenti di ostrica concava (*Magallana gigas*) ed ostrica piatta (*Ostrea edulis*). Studi recenti mostrano che oltre ai protozoi, storicamente considerati quali unici responsabili di patologie nei bivalvi, anche virus e batteri possono esserne coinvolti in episodi di mortalità anomala. Pertanto, l'obiettivo principale del presente progetto è stato ampliare l'approccio diagnostico alle patologie dei molluschi, per verificare l'eventuale presenza di parassiti, virus e batteri fra i quali *Vibrio* patogeni per i molluschi stessi. Inoltre è stata verificata l'eventuale presenza di *Vibrio spp.* patogeni per l'uomo, considerata anche la consuetudine, nel territorio pugliese, di consumare bivalvi crudi. Nel corso della ricerca sono stati raccolti nelle diverse stagioni alcuni parametri fisico-chimici dell'acqua dove sono stati allevati i molluschi, quali pH, ossigeno disciolto, salinità e temperatura al fine di valutare eventuali correlazioni tra condizioni ambientali, patologie dei molluschi e presenza di *Vibrionaceae* patogene per l'uomo.

Summary

In Apulia, with a production of around 10.000 tonnes of bivalve molluscs and 90 census facilities, the most farmed species is the Mediterranean mussel (*M. galloprovincialis*), followed in the last years by the Pacificus oyster (*M.gigas*) and the flat oyster (*O. edulis*). Recent studies show that in addition to protozoa, historically considered the only ones responsible for pathologies in bivalves, viruses and bacteria may also be involved in abnormal mortality events. Therefore, the aims of the project was to improve the diagnostic approach to molluscs diseases, to check for the presence of parasite in bivalves, to verify the possible presence of parasites, viruses and bacteria including *Vibrio* species pathogenic to molluscs. In addition, the possible presence of *Vibrio spp.* pathogenic to humans was verified, also considering the habit of consuming raw molluscs in Apulia region. Finally, water physical-chemical parameters were collected during different seasons, such as pH, dissolved oxygen, salinity and temperature, in order to assess any correlations between environmental conditions, mollusc pathologies and the presence of *Vibrio spp.* pathogenic to humans.

Materiali e metodi

Nel periodo compreso tra settembre 2020 e settembre 2022 sono stati effettuati 144 campionamenti: 20 nella provincia di Barletta, Andria e Trani (BAT), 10 a Foggia, 15 a Lecce e 99 a Taranto. I siti di campionamento comprendevano allevamenti e zone di stabulazione della provincia di Taranto (Mar Ionio: Mar Grande e Mar Piccolo), di Lecce (Mare Adriatico: Castro), di BAT e di Foggia (Mar Adriatico). Dei 144 campionamenti totali, 119 erano mitili e 25 ostriche (7 *O.edulis*, e 18 *M.gigas*). La ricerca di *Vibrio* potenzialmente enteropatogeni per l'uomo è stata eseguita nella Sezione di Taranto mediante metodica batteriologica (ISO 21872-1:2017) [2]. I ceppi di *Vibrio cholerae*, *V.vulnificus* e di *V. parahaemolyticus* isolati sono stati sottoposti alla ricerca dei geni tossigeni, mediante PCR secondo ISO 1872-1:2017-Parte Molecolare [3]. Per la ricerca di *Vibrio aestuarianus* e *Vibrio splendidus* nella Sezione di Taranto è stato condotto esame batteriologico, secondo metodica dell'IZS delle Venezie, Centro Nazionale per la diagnosi delle patologie di pesci, molluschi e crostacei, seguito da analisi molecolare mediante qPCR. La ricerca dei parassiti è stata eseguita dall'IZS delle Venezie con metodo istologico. La ricerca di *Ostreid herpesvirus* e della variante 01 microvar, è stata eseguita dall'IZS delle Venezie mediante qPCR.

Risultati e discussione

L'analisi batteriologica sui campioni pervenuti ha permesso di isolare 15 ceppi di *Vibrio* potenzialmente patogeni per l'uomo (10,41%): 9 ceppi di *Vibrio parahaemolyticus* (6,94%), 5 ceppi di *V. cholerae* (3,47%) ed 1 ceppo di *V. vulnificus* (0,69%). Gli stessi ceppi sono stati sottoposti ad analisi molecolare e si è evidenziato che non erano presenti geni entero-tossinogeni. Tra le specie di *Vibrio* potenzialmente patogene per *M. gigas* e *M. galloprovincialis* è stata rilevata positività mediante analisi molecolare a *V. splendidus* in 6 soggetti mentre

non è stata rilevata positività a *V. aestuarianus*. L'esame molecolare eseguito presso l'IZS delle Venezie ha inoltre evidenziato la presenza di *Ostreid Herpesvirus 1-microvar* in 1 campione di *M. gigas* del Mar Ionio. L'esame istologico ha rilevato la presenza di alcuni protozoi patogeni per i molluschi: *Marteilia* spp. in *Mytilus galloprovincialis* in 5 soggetti del Mar Jonio (3,47%) e *Perkinsus* spp. in un solo soggetto di *M. galloprovincialis*. In nessun soggetto analizzato è stata rilevata la presenza di *Bonamia* spp.

Dall'analisi dei dati raccolti è emerso che, per quanto riguarda la circolazione stagionale di *Vibrionaceae* nei molluschi valutata nell'arco di 24 mesi, nella totalità dei campioni sono stati isolati ceppi di *Vibrio* spp.: tra questi, in particolare, è stato isolato *Vibrio alginolyticus*, sia nel periodo primaverile-estivo che nei mesi invernali. In merito ai *Vibrio* spp potenzialmente patogeni per l'uomo presenti nei molluschi, tutti i ceppi isolati (10,42 % sul totale) sono risultati successivamente non tossigeni. La positività a *Vibrio splendidus*, isolato nel 4,17% dei campioni, non è stata associata ad episodi di moria, così come la presenza rilevata mediante analisi istologica, di *Perkinsus-like* e *Marteilia* spp. in *M. galloprovincialis*.

Le indagini effettuate durante gli episodi di mortalità anomala occorsi nei mesi estivi del 2021 e del 2022 nelle aree marine della provincia di Taranto (Mar Grande e Mar Piccolo) a carico di mitili e ostriche non hanno fatto emergere che nell'eziologia fossero responsabili o coinvolti agenti patogeni dei molluschi ma in entrambi i casi è stato registrato un aumento della temperatura ambientale. Analogamente, nel novembre 2022 la mortalità riscontrata nelle ostriche è stata associata a fattori climatici. In conclusione, si segnala che i bivalvi oggetto di questa ricerca godono di un buono stato di salute: il fatto di aver isolato rari patogeni non abbinati a casi di mortalità o comunque disvitalità evidenzia corrette modalità di allevamento, che arrecano poco stress agli animali, abbinate a caratteristiche ambientali ottimali. La segnalazione di *Perkinsus* spp. in *M. galloprovincialis*, evento piuttosto raro in questa specie, merita senza dubbio ulteriori approfondimenti che chiariscano se si tratti di *Perkinsus "olseni"*, diffuso in Mediterraneo anche in altre specie, o di nuova specie. Per quanto riguarda i *Vibrio* patogeni per l'uomo, l'isolamento in più campioni di *V. parahaemolyticus*, conferma la diffusione di questa vibrionacea, anche se in questa indagine non sono stati rilevati geni entero-tossinogeni. Trattandosi di una specie facente parte della normale flora microbica dei molluschi, unica azione di prevenzione del rischio rimane la corretta informazione del consumatore, il quale, soprattutto se di fascia a rischio (in stato di gravidanza, bambini, anziani, immunodepressi) dovrebbe evitare il consumo di bivalvi crudi soprattutto nel periodo estivo, con temperature dell'acqua più idonee alla moltiplicazione di *Vibrionaceae*.

Bibliografia

[1] MiPAAF, A.M.A. dati 2016

[2] Metodo orizzontale per la ricerca di *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio cholerae* e *Vibrio vulnificus* potenzialmente enteropatogeni. (IZS PB PT/MA/048)

[3] Metodo orizzontale per la ricerca di *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio cholerae* e *Vibrio vulnificus* potenzialmente enteropatogeni-Parte molecolare (IZS PB PT/MA/058)

Identificazione di serpulidi in molluschi bivalvi allevati

L. Iacobucci¹, F. Tosi¹, G. Arcangeli¹

¹Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, National Reference Center for Fish, Molluscs and Crustacean Diseases, Legnaro (PD)

Keywords: serpulidi, molluschi bivalvi, DNA barcoding

Introduzione

I Serpulidae sono una grande famiglia di policheti marini sedentari i quali, mediante la produzione di tubi calcarei, vivono adesi a substrati duri come rocce, gusci di molluschi e superfici artificiali (reti per l'acquacoltura, scafi delle navi, tubature, etc.). Questi anellidi policheti sono stati riscontrati in tutti gli habitat acquatici, prevalentemente marini, dalle zone tropicali a quelle polari, dalle zone intertidali alle acque profonde. Attualmente, la famiglia comprende 562 specie identificate, a loro volta suddivise in 69 generi (Capa et al. 2021): il più abbondante in numero è il genere *Hydroides*, che consta di più di 100 specie (Read et al., 2017). Il crescente interesse verso questo gruppo di organismi deriva sia dalla loro rilevanza in ambito ecologico, in quanto sono attivi filtratori delle particelle sospese nell'acqua (Riisgard et al., 2000), proteggono e sono nutrimento per molluschi, crostacei e pesci di interesse commerciale (Heiman et al., 2008; Sanfilippo et al., 2013) che dalle problematiche generate dai tubi calcarei da loro stessi prodotti, essendo questi degli agenti di biofouling (Kupriyanova et al., 2001), che comportano importanti costi economici per la loro prevenzione e rimozione. Un modo per accedere alle funzioni ecologiche svolte dalle specie è l'identificazione e la loro classificazione in gruppi funzionali che, tradizionalmente, venivano effettuate mediante il riconoscimento di caratteristiche morfologiche comuni. In tempi più recenti, l'utilizzo di tecniche basate sul sequenziamento del DNA ha reso questo obiettivo molto più semplice e veloce da raggiungere, permettendo di esaminare specie ampiamente distribuite che possono tendere a contenere due o più specie geneticamente distinte (Kobayashi G et al., 2021).

In due distinti campionamenti di molluschi bivalvi allevati, sono stati rinvenuti dei policheti: nel primo caso, a seguito di un episodio di mortalità di molluschi bivalvi in alto Adriatico e nel secondo in esemplari di ostrica concava (*Magallana gigas*) derivanti da un campionamento effettuato presso un allevamento a La Spezia (Figura 1). In totale, sono stati rinvenuti 3 esemplari di policheti nel primo caso, uno in seme di vongola e due in esemplari di ostriche, mentre nel secondo due esemplari, adesi sulla superficie del guscio di ostriche. Per l'identificazione di specie è stato utilizzato l'approccio del *DNA barcoding*: per il primo campionamento, l'identificazione è stata effettuata amplificando un frammento del gene mitocondriale citocromo ossidasi I (COI) e i geni ribosomiali codificanti per LSU rRNA18S e SSU rRNA 28S. Nel secondo campionamento, oltre al gene COI, è stata amplificata una porzione del gene ribosomiale rRNA 16S. Tutti gli amplificati sono stati poi sequenziati per l'identificazione di specie.

Summary

In the present context, polychaetes were found in two different mollusk samples, respectively after a mollusk mortality event in the Adriatic Sea and in oyster samples taken from a mollusk farm in La Spezia. Overall, we found three polychaetes in the first sample, (one in a clam seed and the other two in oysters) and two in the second one, attached to oyster shells. For species identification we used DNA barcoding approach; in the first sample, we amplified a fragment of the mitochondrial gene cytochrome oxidase I (CoxI) and ribosomal genes LSU rRNA18S and SSU rRNA 28S. In the second sample, in addition to CoxI amplification, we amplified a portion of the ribosomal gene rRNA 16S. All the amplified products were then sequenced for species identification.

Materiali e Metodi

I policheti identificati nei due campionamenti descritti precedentemente sono stati prelevati e conservati in etanolo assoluto fino al momento della procedura di estrazione del DNA: in tale occasione, questi anellidi sono stati precedentemente passati su carta bibula per rimuovere l'eccesso di etanolo e poi pesati. Il DNA è stato poi amplificato mediante PCR end point. Il target è un frammento del gene mitocondriale citocromo ossidasi I (COI). Successivamente sono stati amplificati anche i geni ribosomiali codificanti per LSU rRNA 18S e SSU rRNA 28S; per il primo campionamento e il gene ribosomiale rRNA 16S per il secondo. Tutti i prodotti di amplificazione sono stati visualizzati mediante corsa elettroforetica e, a seguito della verifica della banda di interesse, sono stati sequenziati.

Risultati e discussione

L'amplificazione del gene target citocromo ossidasi I (COI) non è stato favorevole per ciascuno dei campioni del primo campionamento; questo risultato è conforme a quanto ottenuto in precedenti tentativi di

amplificazione del gene COI per queste specie di anellidi policheti; sebbene infatti questo gene sia frequentemente usato per l'identificazione di specie eucariotiche, in alcuni gruppi di policheti tra cui i serpulidi, precedenti tentativi di amplificazione sono stati poco efficaci, sia per la mancanza di primer appropriati (Sun et al., 2012), che per la scarsità di sequenze di riferimento a disposizione (Yuryev, 2007).

Anche il gene ribosomiale codificante per LSU rRNA 18S si è rivelato inefficace per l'amplificazione, in quanto ha portato all'ottenimento di prodotti aspecifici in un caso e assenza di bande nei restanti campioni. Solo l'amplificazione del gene ribosomiale codificante per SSU rRNA 28S ha permesso l'identificazione di uno dei tre serpulidi rinvenuti: la sequenza del gene, ottenuta con metodo Sanger e confrontata mediante BLAST con le 3 Best Hits, identifica la specie *Hydroides elegans* con una identità del 100% e una Query coverage al 99% (Figura 2).

La specie identificata, appartenente alla famiglia dei serpulidi, è stata originariamente riscontrata a Port Jackson, Sydney (Australia); attualmente, grazie anche al trasporto via mare, sono state riscontrate in tutte le acque marine temperate-tropicali e nelle lagune eutrofiche. Questo scambio genetico via nave è con molta probabilità anche la ragione per cui dal punto di vista molecolare, le popolazioni globali di serpulidi mostrano tra loro un grande livello di similarità (Pettengill et al. 2007). La loro presenza è stata riscontrata anche nelle coste dell'alto Adriatico, come indicato dal *World Register of Marine Species* (WORMS): questo dato trova riscontro nel campionamento effettuato proprio in queste acque, a seguito dell'episodio di mortalità anomala registrato.

Nel secondo campionamento, il confronto della sequenza del primo esemplare sottoposto ad analisi con quella delle 100 Best Hits ottenute da BLAST, ha dato come miglior output la specie *Ceratonereis costae*, usando il gene COI come target (identità 92% e Query coverage 99%) e le specie *Hediste japonica/Hediste atoka* con il 16S (identità 87% e Query coverage 99%). Dal risultato ottenuto non è stato possibile discriminare con precisione la specie, ma tutti gli output fanno parte delle *Nereididae*, famiglia di anellidi policheti costituita da 39 generi e 535 specie diffuse in tutto il mondo. L'analisi della sequenza del gene 16S del secondo esemplare analizzato, confrontata con quella delle 18 Best Hits ottenute da BLAST, ha permesso di determinare una discreta similarità (sebbene non particolarmente significativa per assenza di sequenze), con le specie *Capitella biota/Capitella teleta/Capitella capitata* (identità 79% e Query coverage 98%), anellidi policheti appartenenti alla famiglia delle *Capitellidae*.

La capacità di *Hydroides spp.* di adattarsi rapidamente a diversi ambienti marini e la rapidità di crescita della sua popolazione, la fa annoverare tra le specie invasive (Tovar-Hernández et al. 2009). Questa peculiarità è particolarmente rilevante in quanto questo polichete è considerato uno dei principali agenti di biofouling, sia di superfici artificiali che di organismi marini; grazie alla loro capacità di formare colonie, sono in grado di interferire con l'insediamento dei molluschi presso i loro substrati, causando fenomeni di mortalità estese (Miura and Kajihara 1984): le distese masse di tubi calcarei create da questi vermi sono infatti in grado di competere con le popolazioni di molluschi per il cibo e per lo spazio, creando nel contempo un substrato adatto a supportare la vita di altri organismi.

Monitorare e classificare le diverse specie di serpulidi presenti sui gusci dei bivalvi allevati fornisce indicazioni sulla loro distribuzione e prevalenza negli allevamenti e può aumentare le conoscenze anche per un loro miglior controllo.

Bibliografia

- [1] Capa M, Kupriyanova EK, Nogueira JM, Tovar-Hernández M. (2021) Fanworms: Yesterday, today, tomorrow. *Diversity* 13(3): e130. 10.3390/d13030130
- [2] Heiman, Kimberly & Vidargas, Nicholas & Micheli, Fiorenza. (2008). Non-native habitat as home for non-native species: Comparison of communities associated with invasive tubeworm and native oyster reefs. *Aquatic Biology - AQUAT BIOL.* 2. 47-56. 10.3354/ab00034.
- [3] Kobayashi G, Goto R. 2021. Molecular phylogenetic assessment of *Spirobranchus kraussii*-complex (Annelida: Serpulidae) from the Japanese Archipelago. *PeerJ* 9: e11746 <https://doi.org/10.7717/peerj.11746>
- [4] Kupriyanova, Elena & Nishi, Eijiroh & ten Hove, Harry & Rzhavsky, Alexander. (2001). Life-history patterns in serpulimorph polychaetes: Ecological and evolutionary perspectives. *Oceanography and marine biology.* 39. 1-101.
- [5] Miura T, Kajihara T (1984) An ecological study of the life histories of two Japanese serpulid worms, *Hydroides ezoensis* and *Pomatoleios kraussii*. In: Hutchings PA (Ed.) *Proceedings of the First International Polychaete Conference*, Sydney, Australia, July 1983. The Linnean Society of New South Wales, 338-354
- [6] Pettengill, G. B.; Wendt, D. E.; Schug, M. D.; Hadfield, M. G. (2007) Biofouling likely serves as major mode of dispersal for the polychaete *Hydroides elegans* as inferred from microsatellite loci., *Biofouling* 23(3/4): 161-169
- [7] Pina S, Russell-Pinto F, Rodrigues P. Morphological and molecular study of *Microphallus primas* (Digenea: Microphallidae) metacercaria, infecting the shore crab *Carcinus maenas* from northern Portugal. *Folia Parasitol (Praha)*. 2011 Mar;58(1):48-54. doi: 10.14411/fp.2011.005. PMID: 21539138.
- [8] Read, Geoffrey & ten Hove, Harry & Sun, Yanan & Kupriyanova, Elena. (2017). *Hydroides Gunnerus*, 1768 (Annelida, Serpulidae) is feminine: A nomenclatural checklist of updated names. *ZooKeys.* 642. 1-52. 10.3897/zookeys.642.10443.
- [9] Riisgård, H. U., Nielsen, C., & Larsen, P. S. (2000). Downstream collecting in ciliary suspension feeders: the catch-up principle. *Marine Ecology - Progress Series*, 207, 33-51. <https://doi.org/10.3354/meps207033>
- [10] Sanfilippo, Rossana & Vertino, Agostina & Rosso, Antonietta & Beuck, L. & Freiwald, Andre & Taviani, Marco. (2013). Serpula aggregates and their role in deep-sea coral communities in the southern Adriatic Sea. *Facies.* 59. 10.1007/s10347-012-0356-7.
- [11] Sun, Yanan & Kupriyanova, Elena & Qiu, Jian-Wen. (2012). COI barcoding of *Hydroides*: A road from impossible to difficult. *Invertebrate Systematics.* 26. 539-547. 10.1071/IS12024.

- [12] Tobe, Shanan. (2007). PCR Primer Design, Anton Yuryev (Ed), 1 edition, Humana Press, (Aug 2 2007), 367 pages, ISBN10: 158829725X. Science & Justice - SCI JUSTICE. 47. 173-173. 10.1016/j.scijus.2007.10.008.
- [13] Tovar-Hernandez, Maria Ana; Mendez, Nuria; Villalobos-Guerrero, Tulio Fabio (2009) Fouling polychaete worms from the southern Gulf of California: Sabellidae and Serpulidae, *Systematics and Biodiversity* 7(3): 319-336



Figura 1: Esempi di policheti presenti sulle valve di ostrica concava (*Magallana gigas*)

Hydroides elegans voucher SAM E3616 28S ribosomal RNA gene, partial sequence

Sequence ID: [EU195369.1](#) Length: 994 Number of Matches: 1

Range 1: 1 to 697 [GenBank](#) [Graphics](#)

[▼ Next Match](#) [▲ Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1288 bits(697)	0.0	697/697(100%)	0/697(0%)	Plus/Plus

Figura 2: Similarità della sequenza ottenuta dal sequenziamento con la Best Hit identificata da BLAST

Impiego della valvometria non invasiva per la valutazione dell'effetto della refrigerazione in condizioni ipossiche sul movimento di *gaping* valvare di mitili di allevamento

L. Lanci¹, F. Mosca¹, T. Bouma², P.G. Tiscar¹

¹ Facoltà di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Teramo, Teramo, Italy

² Royal Netherland Institute for Sea Research, Yerseke, The Netherland

Keywords: Valvometry, Hall sensor, *Mytilus galloprovincialis*, Gaping behaviour

Introduzione

Mytilus galloprovincialis si caratterizza per un'ampia distribuzione geografica e costituisce una delle principali specie oggetto di acquacoltura. Fin dagli anni '70, i bivalvi sono stati impiegati in qualità di organismi sentinella all'interno degli ecosistemi costieri. Attualmente, in molti paesi, esistono diversi programmi di monitoraggio di questi animali, utilizzati sia per il miglioramento delle procedure di allevamento che per la valutazione dell'impatto ambientale. La valvometria non invasiva è una tecnica basata sulla misurazione delle variazioni dell'apertura valvare, inizialmente messa a punto per studi di tipo fisiologico e poi ampliata al fine di valutare il comportamento degli individui in funzione dei cambiamenti dell'ambiente circostante. Il *gaping* valvare dipende strettamente dal metabolismo e riveste un ruolo funzionale e protettivo nella fisiologia dei bivalvi. Inoltre, esso è stato direttamente associato ad attività biologiche di base come la respirazione, l'escrezione o l'alimentazione. Esiste una ricca letteratura che descrive come le variazioni dell'ampiezza dell'apertura valvare e delle frequenze di movimento siano attribuibili a cambiamenti della temperatura. Trattandosi di un processo fisiologico fondamentale, il *gaping* è soggetto a vari livelli di regolazione più o meno funzionali all'adattamento al cambiamento delle condizioni ambientali. La chiusura valvare potrebbe essere interpretata come una forma di "adattamento a risparmio energetico" e, analogamente, un "comportamento di apertura-chiusura simile alla fame d'aria" potrebbe costituire un meccanismo atto a mantenere un basso consumo di ossigeno, evitando così un metabolismo anaerobico meno efficiente. La maggior parte degli studi in merito presenti in letteratura riguarda l'effetto dell'incremento della temperatura sul *gaping* valvare, ma poche sono le informazioni disponibili circa l'effetto della refrigerazione su tale processo. Per questa ragione, lo scopo del presente studio è quello di valutare, simulando le principali fasi della filiera commerciale del mitilo, l'effetto a breve termine della refrigerazione in condizioni ipossiche sul movimento valvare mediante l'impiego di sensori innovativi (biosensori Biophys) sviluppati dal Royal Netherlands Institute for Sea Research (NIOZ). L'obiettivo è quello di determinare se, e in che misura, la conservazione a temperatura di refrigerazione (4 °C) influisca sul comportamento di *gaping*, valutando l'eventuale presenza di periodicità o di pattern specifici all'interno dei tracciati.

Summary

The bivalve *Mytilus galloprovincialis* has a broad geographic distribution and constitute a major aquaculture species. Since the 1970s bivalves have been used as sentinel species for coastal ecosystems. At present, diverse bivalve-based monitoring programs exist in many countries, for shellfish aquaculture or environmental impact assessment purposes. Non invasive valvometry is the measurement of valve gape variations, which has been developed first for physiological studies and then was expanded to investigate individuals' behavior as a function of changes of their proximal environment. Therefore, valve movements depend on metabolism and have a functional and protective roles in bivalves physiology. Patterns of valve movements have been directly linked to basic biological activities such as respiration, excretion, or feeding and to changes in temperature. Valve-gaping, the opening and closing movement of the two valves, is linked to both feeding and respiration, and hence thought to be a physiological process, which could be regulated to respond to changes in the environmental conditions. Valve-closing should be interpreted as 'an energy-saving adaptation or as an exaptation' and that a 'starvation opening-closing behaviour' could be a mechanism to maintain low oxygen uptake avoiding less efficient anaerobic metabolism. Most of the studies in the literature concern the effect of temperature rise on valve gaping, but little is known about the effect of refrigeration on this process. For this reason, the aim of this study is to assess the short-term effect of refrigeration on valve *gaping* of farmed mussels by using innovative tools (Biophys sensors) developed by the Royal Netherlands Institute for Sea Research (NIOZ). The objective is to determine whether, and to what extent, storage at refrigeration temperature (4°C) affects the gaping behavior, evaluating the possible presence of periodicities or specific patterns within the tracks.

Materiali e metodi

Lo studio è stato condotto su tre diversi *pool* di mitili, prelevati a cadenza settimanale direttamente dai sistemi *long-line* dell'impianto di mitilicoltura Adriatica Offshore srl, sito a Giulianova (Lat. 42°48'30"N e Long. 14°00'00"E). I campioni sono stati immediatamente trasportati in laboratorio per la processazione. Ai fini della

valutazione del movimento di *gaping* valvare sono stati impiegati n. 6 sensori Biophys PARS V2 (NIOZ). Le misurazioni ottenute per mezzo di tali strumenti si basano sul principio descritto da Ballesta-Artero *et al.*¹, ma associando a ciascun sensore un singolo mitilo e valutando l'effetto Hall mediante l'impiego di un magnete. Tutti i rilevatori di segnale sono inclusi nell'estremità superiore dello strumento. La frequenza minima di rilievo dei dati è 0,1 s ma si è scelto di impostare 1s per ciascuno dei parametri misurati in modo da limitare il consumo della batteria ottenendo al contempo dati ad elevata frequenza. Ciascuno dei sei mitili campionati per ogni *pool* è stato posizionato su un'apposita staffa mediante colla per acquari e un magnete di dimensioni 3x3 mm è stato apposto sulla valva inferiore di ciascun soggetto, tra il sifone inalante e il mantello². Il magnete è stato posizionato perpendicolarmente al rilevatore di segnale incluso nell'estremità superiore del biosensore e ad una distanza di circa 1 cm dallo stesso. Una volta associati con i rispettivi mitili, gli strumenti sono stati collocati in acquario (18 C°) per 18 ore, in maniera tale da favorire l'acclimatamento degli animali. Successivamente, i mitili sono stati separati in due gruppi: il primo è stato refrigerato alla temperatura di 4C° per 6 ore, mentre il secondo è stato sottoposto alle medesime condizioni, ma per un periodo complessivo di 24 ore. Gli animali sono stati poi ricollocati in acquario per la valutazione del comportamento di *gaping* valvare post-refrigerazione e sono stati monitorati per ulteriori 72 ore. I dati sono stati analizzati mediante Phytos 3.6 (Spyder 3.1.4, Anaconda) ed elaborati in maniera tale da ottenere un singolo valore di Hall per minuto. Infine, è stata effettuata la graficazione dei risultati ottenuti in modo da valutare ampiezze e frequenze di apertura all'interno dei tracciati.

Risultati e discussione

I tracciati derivanti dall'elaborazione e graficazione dei dati ottenuti sono specifici di ciascun mitilo oggetto di indagine e non sono stati osservati pattern specifici o periodicità statisticamente significative comuni a tutti gli animali. Ciò nonostante, sono stati rilevati alcuni trend comuni di risposta allo stress rispetto a quanto osservato nella fase di acclimatamento. In particolare, durante quest'ultima (18 ore), per gran parte del tempo gli animali hanno manifestato "micromovimenti" caratterizzati da una bassa intensità e una frequenza regolare, intervallati da pochi cicli di apertura-chiusura, leggermente più ampi. A seguito dell'esposizione allo stress indotto dalla refrigerazione in condizioni ipossiche, tutti gli animali hanno mostrato un aumento dell'ampiezza dei movimenti valvari e della frequenza degli stessi. Inoltre, sebbene non si tratti di una tendenza comune a tutti i soggetti campionati, gli animali sottoposti a 24 ore di refrigerazione hanno manifestato movimenti più ampi e frequenti, rispetto alla controparte esposta alle medesime condizioni per 6 ore. In particolare, gli elevati valori di ampiezza e frequenza relativi al *gaping* valvare di alcuni soggetti ricollocati in acquario dopo 24 ore di refrigerazione sembrerebbero essere correlati ad un maggior tasso mortalità degli stessi. Negli ecosistemi acquatici, l'ipossia è comunemente definita come un livello di ossigeno disciolto (DO) inferiore a 2 mg/L e impatta negativamente sulla fisiologia e sul comportamento degli organismi ospitati in tali ambienti. Gli animali non mobili come i molluschi bivalvi, quando esposti a basse concentrazioni di ossigeno, non hanno la capacità di sottrarsi all'ambiente ipossico, ma modificano le loro abitudini alimentari e i tassi di crescita per adattarsi alle nuove condizioni. Independentemente dalla causa, l'ipossia cronica tende a ridurre l'assunzione di alimento e la crescita e ad aumentare la suscettibilità alle patologie. Quando i meccanismi protettivi di tali animali falliscono per via dell'esposizione a stress ambientali come l'ipossia, gli organismi potrebbero indebolire le loro attività fisiologiche, con conseguente sviluppo di disturbi funzionali a carico dei processi di assunzione ed assimilazione dei nutrienti. Nel presente studio, il comportamento manifestato dai soggetti esposti a 24 ore di refrigerazione in condizioni di ipossia, caratterizzato da escursioni valvari molto ampie e frequenti, è sovrapponibile al "movimento da fame d'aria" evidenziato da altri autori in diverse condizioni sperimentali di stress. In tal senso, la valvometria potrebbe costituire uno strumento ottimale per la valutazione dei parametri di benessere animale. In ogni caso, il ridotto numero campionario non rende possibile, allo stato attuale, una generalizzazione dei risultati osservati ma ulteriori prove sperimentali condotte nel corso dell'annualità e in diverse fasi del ciclo produttivo dei mitili permetteranno di ottenere dati più rappresentativi e getteranno le basi per la successiva valutazione di altri parametri ambientali di stress, nonché per l'eventuale impiego diretto degli strumenti nell'ambiente marino di allevamento.

Bibliografia

- [1] Ballesta-Artero I, Witbaard R, Carroll M, Van Der Meer J. – (2017) Environmental factors regulating gaping activity of the bivalve *Arctica islandica* in northern Norway. In: *Mar. Biol.* 164, 1–15.
- [2] Bertolini C, Rubinetti S, Umgieser G, Witbaard R, Bouma TJ, Rubino A, Pastres R. – (2021) How to cope in heterogeneous coastal environments: Spatio-temporally endogenous circadian rhythm of valve gaping by mussels. In: *Sci Total Environ.*

Il progetto cozza selvaggia

L. Lanci¹, F. Mosca¹, C.J. Di Pasquale¹, G. Sacchetti², A. Papa³, R. Morselli³, P. Besutti³, E. G. Rosafio⁴, A. Ciccarelli⁵, M. Di Domizio⁵, S. Busetti⁵, C. Di Pietro⁶, P. G. Tiscar¹

¹Dipartimento di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Teramo, Teramo

²Dipartimento di Bioscienze e tecnologie agro-alimentari e ambientali, Università degli Studi di Teramo, Teramo

³Dipartimento di Scienze della comunicazione, Università degli Studi di Teramo, Teramo

⁴Dipartimento di Giurisprudenza, Università degli Studi di Teramo, Teramo

⁵Dipartimento di Scienze politiche, Università degli Studi di Teramo, Teramo

⁶Adriatica offshore srl, Giulianova (TE)

Keywords: Blue growth, sustainable development, mussels farming

Introduzione

Il territorio costiero abruzzese si caratterizza per la combinazione costante di unità e diversità in senso ambientale, culturale e socio-economico, tanto da configurarsi quale incrocio composito di utilizzi dell'ambiente marino e terrestre. In questo panorama variegato, la risorsa ittica risulta assai peculiare, in quanto influenzata da una complessa serie di elementi caratterizzanti facenti capo all'ambiente marino, alle fasi di prelievo, produzione, trasformazione, commercializzazione e, infine, consumo. La gestione delle suddette componenti nell'ambito di un contesto geografico e antropico definito, appare strettamente interconnessa allo sviluppo economico-sociale del territorio e alla valorizzazione del suo ecosistema. L'azione di qualificazione della mitilicoltura locale rientra pienamente nel quadro appena descritto, come si evince dalla completa fusione tra elementi di sostenibilità ambientale e tipicità che caratterizza le specificità del settore. A partire dal bando Priorità 4 - Obiettivo specifico 4.1. Interventi a sostegno dello sviluppo locale di tipo partecipativo (CLLD) Selezione delle strategie di sviluppo locale attuate dai FLAGS PIANO DI AZIONE LOCALE del FLAG COSTA BLU, Azione 1.2.1 Studi e progetti pilota di molluschicoltura e mitilicoltura (FEAMP 2014/2020) si è costituito un gruppo di ricerca composto da esponenti dei 5 Dipartimenti dell'Università di Teramo (Medicina Veterinaria, Scienze Politiche, Giurisprudenza, Scienze della Comunicazione, Bioscienze e tecnologie agro-alimentari e ambientali) che, sviluppando network esistenti con il territorio (Adriatica off-shore srl, DAN Europe, AGER s.r.l., Birrifficio Terre d'Acquaviva, Ristorante D.One, Albergo Diffuso Montepagano 1137) hanno comportato l'attuazione di azioni di ricerca ed innovazione tecnologica coordinate dedicate al contesto abruzzese. Il progetto ha coinvolto una concessione situata al largo di Tortoreto (TE) dedicata all'allevamento dei mitili, sia in superficie mediante long line che in profondità su strutture artificiali di cemento armato. Le azioni previste nel progetto sono state finalizzate ad aumentare il livello di innovazione nel settore della acquacoltura attraverso la promozione di una produzione di nuova concezione, rappresentata da un ecotipo di mitili allevato in profondità e caratterizzato da una maggiore eco-sostenibilità. L'allevamento in profondità può costituire un'attrattiva per i turisti: gli *snorkelists* e subacquei più esperti potranno immergersi direttamente sulle strutture poste sul fondo mentre le produzioni, rappresentate anche da vini e birre affinati sott'acqua, potranno essere veicolate, anche nei termini di visibilità, attraverso attori del territorio operanti nell'ambito del turismo esperienziale.

Summary

The project involved experts from various disciplines at the University of Teramo, along with local partners, to promote the sustainable development of mussel farming in the Abruzzo region. The main objective was to develop a technologically innovative production of mussels, cultivated in-depth, with enhanced eco-sustainability. The actions included the creation of submerged structures designed to attract scuba divers and snorkelers. The project also aimed to explore the correlation between the marine environment, the nutritional characteristics of mussels, and the sensory perceptions of consumers, contributing to characterizing the deep-sea mussel ecotype. From a marketing perspective, strategies were proposed to promote enogastronomic and underwater tourism, leveraging mussel production as a driving force, while from a regulatory standpoint; a legislative text was proposed to enable tourist activities within a concession dedicated to mussel production. In summary, the project has demonstrated the potential of sustainable mussel farming and has opened up new opportunities for the economic and tourist development of the Abruzzo coastal area.

Materiali e metodi

L'impianto (Adriatica Offshore srl) è localizzato al largo della costa nel comune di Tortoreto, a 2,25 MN con una profondità media pari a 13 m ed è caratterizzato sia da una produzione di mitili mediante long line che dalla presenza di strutture sul fondo. Nel 2003 furono posizionati sul fondale 15 gabbioni in cemento armato (4 m x 5 m x 6 m): a causa delle mareggiate intercorse nel marzo 2015 si è denunciato il loro ribaltamento che ha causato, fondamentalmente, il loro abbassamento ad una profondità critica per il reclutamento di seme di mitilo rendendole improduttive. La caratteristica fondamentale dell'allevamento dei mitili su strutture sommerse

rispetto al sistema long line consiste nel grande risparmio di ore lavoro e di utilizzo delle imbarcazioni, a fronte però di una forte diminuzione di produttività, visto che non sono richieste operazioni di reincalzo durante il ciclo di crescita dei mitili. Per quanto concerne la produzione di mitili in profondità, sono state studiate modalità di raccolta del seme dall'impianto in superficie che evitassero il ricorso alle calze in plastica tipiche della mitilicoltura tradizionale, conferendo così al prodotto maggiore sostenibilità e contribuendo a ridurre l'impatto ambientale. In questo senso, sono state prodotte apposite "vele" in rete tessuta da appendersi al *long-line* in superficie e specifici telai metallici con fondo reticolato in acciaio da collocare sui cassoni in cemento e al di sopra dei quali appoggiare le vele contenenti il seme. Per verificare l'accrescimento dei mitili prima della completa implementazione delle strutture sommerse, all'inizio di agosto 2022 è stato posto un quantitativo di seme proveniente dal *long-line* superiore al di sopra di una struttura sperimentale già precedentemente predisposta su un gabbione. Da questo quantitativo, si è poi proceduto al prelievo dei campioni di profondità. In particolare, ai fini della valutazione zootecnico-biologica, è stato effettuato il rilievo degli indici morfometrici (Lunghezza, larghezza, altezza, peso totale sgocciolato, peso conchiglia, e peso parte edibile) di 4 campioni di mitili prelevati rispettivamente, nei mesi di agosto 2022, ottobre 2022, gennaio 2023 e marzo 2023 (BOTTOM) confrontandoli con cozze provenienti dal long line (TOP). In parallelo sono stati monitorati i valori di temperatura, salinità, ossigeno e clorofilla sia mediante valutazione satellitare che attraverso una boa posizionata nell'impianto munita di sonda multiparametrica e correntometro posti a 9 m di profondità capace di trasmettere i risultati in modo continuativo a terra. Inoltre, ai fini di un arricchimento ambientale, si è collocata sul fondale una struttura artistica in ferro e policarbonato delle dimensioni di 3m x 3m x 4m. Infine, nelle immediate vicinanze, sono state allocate due casse in ferro: una contenente bottiglie di varie tipologie di vino ed un'altra contenente bottiglie di birra, ambedue da condursi in affinamento subacqueo. Attraverso ripetute immersioni subacquee sono state definite le biocenosi sviluppate sulle strutture sommerse. Al fine di definire le qualità dei mitili prodotti (TOP e BOTTOM), campioni relativi sono stati sottoposti ad assaggio, condotto da un gruppo di esperti, finalizzato alla differenziazione ed alla definizione del loro profilo sensoriale. In seconda istanza, è stato condotto un test di gradimento: in particolare, sono stati sottoposti ai consumatori gli stessi campioni al fine di valutare aspettative, reale gradimento verso le due tipologie di mitili e influenza delle informazioni relative alla tipologia di allevamento e alla sua eco-sostenibilità sulla relativa risposta. In parallelo campioni di mitili (TOP e BOTTOM) raccolti a febbraio e giugno 2023 sono stati sottoposti ad analisi atte a definire il cartellino nutrizionale e le specifiche degli acidi grassi rilevati. Per quanto riguarda le azioni di marketing da operarsi sul prodotto, si è proceduto a: 1) produrre una analisi SWOT per identificare per ogni percorso di differenziazione della *value proposition*, gli elementi di maggior criticità e di maggior opportunità per diversificare la proposta competitiva, che fossero in linea con i punti di forza dell'ecosistema territoriale locale; 2) *studio in depth del case history* attraverso *focus group* che ha visto coinvolti i *partner* di progetto al fine di elaborare le proposte di strumenti e le strategie di sviluppo dell'offerta turistica enogastronomica locale valorizzando l'esperienza del consumatore sulla quale sviluppare economie accessorie sia direttamente sfruttabili dall'allevatore, sia percorribili da altre imprenditorie connesse al turismo eno-gastronomico e subacqueo. Da un punto di vista normativo, l'ordinanza della Capitaneria di porto che regola le attività che possono svolgersi all'interno del sito, vieta il transito, la pesca, l'ancoraggio e qualsiasi altra attività a qualunque natante, imbarcazione e nave, nonché il transito e la sosta a persone e a mezzi che non siano quelli direttamente destinati ai concessionari. A fronte dell'impedimento a esercitare attività di carattere turistico-ricreativo nonché socio-culturale all'interno dell'impianto di mitilicoltura, si è quindi dapprima ricostruito il quadro normativo nazionale e regionale in materia di pescaturismo e ittiturismo, per poi produrre una proposta di modifica alla L. R. Abruzzo 5/6/2012, n. 23 funzionale alla differenziazione economica della molluscoltura locale.

Risultati e discussione

I primi dati del progetto, evidentemente non a carattere esaustivo poiché da condursi su tempistiche prolungate nel tempo, hanno già mostrato correlazioni tra 1) le variabili dell'ambiente marino; 2) l'impatto dei differenti ambienti sui valori nutrizionali delle due produzioni; 3) le caratteristiche sensitive conseguenti alle diverse qualità nutrizionali; 4) gli elementi oggettivi di descrizione del prodotto finalizzati alle campagne di marketing. L'affondamento di bottiglie di vino e birra di pregio per il loro affinamento subacqueo costituisce una originalità affinché, congiuntamente alla produzione di mitili, possano contribuire all'aumento delle marginalità e della visibilità di tutte le Aziende coinvolte. Lo studio sperimentale sulle qualità percepite dei mitili è riuscito a focalizzare l'attenzione su cosa effettivamente un consumatore legge relativamente al prodotto alimentare proposto. La stratificazione delle variabili componenti i gruppi di assaggio ha permesso di fornire preziose indicazioni sui target di interesse per chi dovrà commercializzare i mitili prodotti; inoltre, si sono poste le basi per una completa ricostruzione delle specifiche proprietà nutrizionali utili mediante ulteriori rilievi a definire l'ecotipo dei mitili prodotti in profondità. Nei termini di marketing si sono prodotte proposizioni concrete da inserirsi nell'ambito delle scelte di politica turistica a carattere territoriale: il connubio tra produzione, servizi all'acquiturismo ed al turismo subacqueo, ristorazione di pregio e pernottamento permette di presentare una proposizione nuova persino per l'area mediterranea proiettando, quindi, la Provincia teramana su offerte turistiche capaci di coinvolgere, a vario titolo, una molteplicità di comuni costieri.

Equilibri in laguna: sfruttare i resoconti etnografici relativi alla molluschicoltura nell'implementazione di politiche veterinarie tenendo conto del significato culturale del lavoro

S. Latini

Confcooperative FedAgripesca Sardegna
Cooperativa Pescatori Feraxi
Cooperativa Pescatori San Giovanni
CAP Sardegna

Keywords: etnografia, zone umide, lagune, molluschicoltura, Sardegna

Introduzione

La Sardegna presenta numerose aree idonee alla molluschicoltura, ma, per ragioni di carattere storico e culturale, il settore è emerso nell'economia isolana solo a partire dagli anni '90 [1]. La storia delle zone umide dell'isola si intreccia con quella della nascita delle cooperative di pescatori a partire dagli anni '50, succedute alla gestione latifondista di stagni e lagune [2]. Questo fondamentale passaggio, associato a mutamenti occorsi nel settore di produzione di carattere economico, ha portato alla nascita di una nuova figura: il "pescatore d'acqua dolce" è oggi un vero e proprio "pastore di pesci" [3] e un allevatore di molluschi, che ha diversificato la propria produzione e dialoga con i soggetti regionali che ne supportano l'attività. Tale attività è portata avanti sfruttando le conoscenze in merito agli equilibri ambientali specifici delle zone di produzione. L'intervento intende documentare gli avanzamenti di una ricerca ancora in corso e che indaga il ruolo del patrimonio culturale, materiale e immateriale, dei molluschicoltori del Sarrabus, regione storica della Sardegna. Contemporaneamente la ricerca si interroga sulla possibilità di sinergie tra tradizione e innovazione tra allevatori e agenzie regionali di sviluppo rurale ed enti veterinari regionali preposti al monitoraggio delle zone di produzione di molluschi.

Summary

Sardinia has numerous areas suitable for shellfish farming. Despite the favorable context for historical and cultural reasons the sector only emerged in the island's economy starting from the 1990s. The history of the island's wetlands is intertwined with that of the birth of fishermen's cooperatives starting from the 1950s, which succeeded the landowner management of the ponds. This fundamental step led to the birth of a new figure: the "freshwater fisherman" is today a "fish herder" and a breeder of shellfish, which has diversified its production and communicates with regional entities that support its activity. This activity is carried out by exploiting the knowledge of the specific environmental balances of these areas and the techniques of relationship with the territory. The intervention aims to document the progress of ongoing ethnographic research which aims to underline the role of material and immaterial heritage of the fishermen of the wetlands of Sarrabus, historical region of Sardinia, within the collaboration with the regional rural development agencies and the regional veterinary bodies responsible for monitoring the shellfish production areas.

Materiali e metodi

Nell'arco di tempo compreso tra aprile 2023 e settembre 2023 è stata svolta una ricerca etnografica presso la Cooperativa Pescatori San Giovanni (Muravera) e la Cooperativa Pescatori Feraxi (Loc. Feraxi, Muravera) nella regione storica del Sarrabus (Provincia di Cagliari). Sono stati utilizzati tutti gli strumenti propri del metodo etnografico: osservazione partecipante, interviste semi strutturate e registrate, realizzazione di un diario di campo e materiali audiovisivi, partecipazione a eventi realizzati dalle due cooperative per la promozione dell'azienda. Nel medesimo periodo le informazioni raccolte durante la ricerca sul campo sono state integrate con materiale di carattere storico e antropologico ottenuto tramite ricerca bibliografica. Nel mese di maggio 2023 e luglio 2023 sono state realizzate tre interviste ad esperti del settore, nello specifico con funzionari degli enti preposti al monitoraggio e al supporto delle attività di molluschicoltura (Confcooperative FedAgripesca Sardegna, LAORE, IZS Sardegna).

Risultati e discussione

La regione storica del Sarrabus (Sardegna Sud Orientale) è storicamente segnata, nelle sue zone umide, dal passaggio che ha visto la gestione latifondista di queste aree sostituita dalla gestione ottenuta con un percorso non sempre pacifico dalle cooperative di pescatori locali. Questa trasformazione ha avuto un impatto significativo sul ruolo attribuito al lavoro e sui processi di costruzione dell'identità degli operatori del settore e delle loro comunità di appartenenza. Anche le tecniche di pesca in acqua dolce e di molluschicoltura hanno subito delle trasformazioni graduali accogliendo un apparato normativo legato all'igiene delle produzioni alimentari in continuo accrescimento. Tale processo ha richiesto una gestione attenta delle modifiche apportate all'ambiente di lavoro date anche da eventi catastrofici come le alluvioni generate dalle piene del Flumendosa,

principale corso d'acqua dell'area al quale sono legate la maggior parte di zone umide, e l'adeguamento della propria produzione ai cambiamenti del mercato.

In particolare la molluschicoltura è stata avviata nell'area di ricerca a partire dalla fine degli Ottanta successivamente allo studio di fattibilità del prof. Matta (1983-1986) nella laguna di San Giovanni [4]. L'importanza del documento risiede non solo nell'aver fornito i dati necessari all'avvio dell'allevamento di mitili e ostriche, ma nell'aver evidenziato l'importanza di una collaborazione, non sempre facile, con gli operatori della laguna. La collaborazione ha poi sostenuto l'introduzione di innovazioni apportate dalle agenzie regionali, soprattutto per quanto concerne la molluschicoltura e in particolare l'ostricoltura, l'arrivo degli strumenti tecnici di misurazione dei valori dell'acqua e soprattutto l'adozione di nuove modalità di costruzione degli strumenti di lavoro. Le nuove tecniche scientificamente aggiornate e suggerite da enti esterni hanno da un lato modificato il rapporto tra pescatori, il proprio lavoro e l'ambiente in cui si inseriscono, dall'altro avviato un confronto tra diverse modalità di gestione del tempo e degli spazi di lavoro e di manipolazione del prodotto realizzato mettendo inoltre in discussione il concetto di autorità nella trasmissione delle competenze nell'ambito lavorativo con modalità riscontrate altrove nell'isola [5]. Alla luce di questi fattori ritengo necessario indagare il grado di rielaborazione delle tecniche di lavoro e di adeguamento agli indirizzi di gestione del prodotto in un'ottica sanitaria che viene realizzato all'interno delle realtà cooperative.

Scelte specifiche portate avanti dagli allevatori come il non utilizzo di una linea di sgranatura per mitilicoltura che viene invece effettuata a mano, seguita poi da una ulteriore selezione manuale del prodotto, lo spostamento in laguna attraverso imbarcazioni a remi, l'affiancamento di un'analisi visiva e olfattiva dell'acqua all'utilizzo degli strumenti di rilevazione di parametri specifici realizzano un quadro in cui le tecniche scientificamente aggiornate coesistono a elementi tradizionali del lavoro motivati da una serie di fattori culturali. Una tecnica proposta quando accolta e adottata dagli operatori viene "filtrata" attraverso una gestualità tradizionale, che deriva da una riproposizione di tecniche del passato a cui si attribuisce il valore di "garanzia del risultato" e attraverso una cornice di significato culturale che attribuisce uno specifico valore al nuovo elemento in termini di priorità e importanza. Questo produce una rielaborazione delle tecniche del lavoro d'interesse per il personale veterinario durante l'implementazione delle proprie politiche volte ad aumentare il livello di produzione o renderne maggiormente efficiente la gestione del rischio. Dai dati qualitativi raccolti emerge la necessità di considerare l'esistenza di un "alfabeto concettuale" attraverso cui il lavoro acquista un significato culturale. In questo alfabeto rientrano il concetto di "lavoro" e "lavoro ben svolto", "rischio", "spazio e tempo del lavoro", "igiene" e "produttività".

La comprensione di come i concetti e le tecniche al centro dell'attenzione veterinaria vengano intesi e rielaborati all'interno del panorama di conoscenze tradizionali proprie dei molluschicoltori favorirebbe il dialogo tra i soggetti coinvolti a vario titolo nel settore della molluschicoltura e la loro collaborazione.

Bibliografia

- [1] LAORE, IZS Sardegna (2016) Acquacoltura in Sardegna. Tradizioni, innovazioni, sapori e ambiente,
- [2] Manca Cossu M. (1990) I pescatori di Cabras, S'Alvure, Oristano.
- [3] Angioni G. (1997), "La pesca di stagno", in Pesca e pescatori in Sardegna. Mestieri del mare e delle acque interne, (a cura di) Mondardini Gabriella, Silvana Editoriale, Milano, pp. 163-186.
- [4] Matta F. (1991) Cronaca di una ricerca sulla molluschicoltura, Sardegna Economica, Quaderni, 6, Cagliari.
- [5] Padre G. (1997) "La mitilicoltura nel golfo di Olbia", in Pesca e pescatori in Sardegna. Mestieri del mare e delle acque interne, (a cura di) Mondardini Gabriella Silvana Editoriale, Milano, pp. 187-193.

Obiettivi e finalità della Ricerca Finalizzata: Risk mitigation Strategies and Tools for an Ongoing Problem. Tetrodotoxins (TTXs), a group of emerging toxins in live bivalve mollusks intended for human consumption (STOPTTXs)

Progetto finanziato dal Ministero della Salute – bando 2021- Direzione Generale della ricerca e dell'innovazione in sanità – project code RF-2021-12373885

C. Losasso¹, P. Antonelli¹, L. Iacobucci¹, F. Tosi¹, A. Vetri¹, B. Salerno¹, A. Peruzzo¹, A. Tubaro², S. Sosa², M. Pelin², S. Dall'Ara³, M. Cangini³, E. Testai⁴, M. Manganelli⁴, S. Scardala⁴, G. Arcangeli¹

¹ Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie - Legnaro (PD),

² Dipartimento di Scienze della Vita, Università degli Studi di Trieste,

³ Fondazione Centro Ricerche Marine, Cesenatico (FC),

⁴ Dipartimento Ambiente e Salute, Istituto Superiore di Sanità, Roma.

Keywords: tetrodotossine, molluschi bivalvi, sicurezza alimentare

Introduzione

Le tetrodotossine (TTX) sono potenti neurotossine che prendono il nome dai pesci della famiglia Tetraodontidae. L'ingestione di prodotti ittici contaminati da TTX può provocare una importante sintomatologia neurotossica che, in ultima istanza, può portare anche alla morte. La presenza di TTX è stata riscontrata in molluschi bivalvi dall'area del Pacifico e, recentemente, nei mari Europei vicino alle coste di diversi stati, specialmente quelli confinanti con il Mar Mediterraneo. In Italia, le TTX sono state già identificate in mitili in Sicilia nel 2016 e, dal 2017, anche in bivalvi provenienti dal Mare Adriatico.

Nel 2017, l'Autorità Europea per la Sicurezza Alimentare (EFSA) ha proposto un limite di sicurezza di 44 ug/kg per la presenza di TTX in gasteropodi marini e bivalvi per il consumo umano, anche se il livello di incertezza è elevato per la scarsità dei dati. Nonostante ciò, ad oggi le TTX non sono ancora incluse nella lista delle biotossine marine ufficialmente monitorate in molluschi bivalvi vivi all'interno dell'Unione Europea, anche se in alcuni casi sono stati riscontrati livelli superiori ai limiti suggeriti dall'EFSA. L'origine biogenetica delle TTX è dibattuta, dal momento che non sono ancora chiari gli organismi produttori, i pathway biosintetici e i geni coinvolti. Ceppi batterici (es. *Vibrio* sp.) isolati da bivalvi positivi per la presenza di TTX hanno dimostrato solo in alcuni casi di poter produrre TTX quando messi in coltura. La presenza di microalghe marine tossiche (es. *Prorocentrum cordatum*) è stata correlata al ritrovamento di TTX in bivalvi, nonostante non sia stata osservata una evidenza diretta. Pertanto, il principale obiettivo di questo progetto è quello di ridurre i rischi da esposizione a TTX, associato al consumo di molluschi bivalvi contaminati, attraverso un approccio multidisciplinare basato sulla combinazione di sistemi di allerta preventivi, strumenti diagnostici innovativi e una aumentata consapevolezza dell'importanza di questo problema tra i diversi stakeholders. Questa strategia permetterà il rapido rilevamento di TTX nei molluschi bivalvi, la valutazione del rischio associato per i consumatori, una gestione rapida ed efficace, nonché azioni di controllo correlate.

Summary

Tetrodotoxins (TTXs) are potent neurotoxins named after the Tetraodontidae fish family. The ingestion of TTX contaminated seafood can cause serious neurotoxic symptomatology and can eventually lead to death. TTXs occurrence has been reported in bivalve mollusks from the Pacific Area and, recently, in European seas close to the coast of different countries, especially those bordering the Mediterranean Sea. In Italy, TTXs have been firstly reported in 2016 in Sicilian mussel, and from 2017 also in bivalves from Adriatic Sea. In 2017, European Food Safety Authority (EFSA) proposed a safety limit of 44 µg TTX/kg flesh in marine gastropods and bivalves for human consumption, although a certain degree of uncertainty exists due to scant data. However, to date, TTXs have not yet been included in the list of marine biotoxins officially monitored in live bivalve mollusks within the European Union, even if levels of TTX higher than the EFSA limit have been found in few cases. The biogenetic origin of TTXs is debated, as the producing organisms, the biosynthetic pathway and the involved genes are still unclear. Bacterial strains (e.g. *Vibrio* sp.) isolated from TTX-bearing bivalves have been shown to produce TTXs when cultured only occasionally. Marine toxic microalgae (e.g. *Prorocentrum cordatum*) have been linked to the occurrence of TTXs in bivalves, however without a direct evidence. Most likely, environmental factors such as temperature, as well as habitat characteristics, regulate the occurrence of TTXs in bivalves. Thus, the main aim of the present project is to reduce the risk of TTXs exposure through consumption of contaminated bivalve mollusks, by means of a multisector approach based on the combination of early-warning systems, innovative diagnostics tools and increased awareness of the relevance of this issue among the different stakeholders. This strategy will allow a rapid TTXs detection in bivalves, the assessment of the associated risk for consumers and the prompt development of effective management and control actions.

Metodologia applicata

Obiettivo 1: Mitili, ostriche ed acqua marina verranno prelevati dalla Laguna di Venezia e Marano (FVG). Le TTX nei bivalvi verranno identificate e quantificate come riportato nelle EURLMB SOP "Determinazione delle Tetrodotossine mediante HILIC-MS/MS". Le specie algali, ritenute coinvolte nella produzione delle TTX verranno analizzate mediante il metodo Utermöhl. Le specie microbiche epibionti verranno ricercate in acqua marina e le specie microbiche presenti nei mitili verranno ricercate nel liquido intravalvare, nonché nella ghiandola digestiva e nella polpa di mitili ed ostriche. Il DNA totale verrà estratto mediante l'uso di kit commerciali e verranno sequenziate le regioni ipervariabili V3-V4 del gene dell'rRNA 16S e analizzate attraverso QIIME2, seguite dalle analisi sulla loro diversità. I dati ambientali verranno confrontati con il profilo tassonomico delle specie microbiche epibionti, e verranno considerate, in ultima istanza, la loro abbondanza e diversità. **Obiettivo 2:** Il saggio funzionale, basato sull'impiego di cellule di neuroblastoma (Neuro-2a) e sul meccanismo d'azione di TTX, verrà migliorato per la quantificazione delle TTX nei molluschi. Il saggio verrà caratterizzato per la sua specificità: (i) valutando la capacità di rilevare altre tossine algali che possono contaminare i molluschi; (ii) co-esponendo le cellule Neuro-2a ad anticorpi anti-TTX per neutralizzare l'effetto delle TTX ed escludere possibili interferenze da parte di altri costituenti. La sensibilità (limite di rilevabilità LOD, e di quantificazione LOQ) verrà determinata valutando l'effetto matrice, mentre l'accuratezza e la precisione verranno determinati valutando la percentuale di recupero delle tossine dai molluschi addizionati di quantità note di tali composti. Infine, l'idoneità a monitorare le TTX nei molluschi verrà valutata quantificando le tossine nei campioni naturalmente contaminati, a confronto con l'analisi mediante cromatografia liquida accoppiata alla spettrometria di massa (LC-MS), valutando provvisoriamente la presenza di TTX nei molluschi in relazione ai cambiamenti climatici in Italia. Il saggio verrà adattato per rilevare altre tossine algali agenti sui canali del Na⁺, come l'inibitore saxitossina, o gli attivatori brevetossine e ciguatossine. **Obiettivo 3:** Attraverso una revisione sistematica e l'analisi critica dei dati di letteratura sulla tossicità delle TTX e altre caratteristiche, si definiranno i valori di riferimento (NOAEL o BMDL) da confrontare con il limite proposto da EFSA nel 2017. L'esposizione dei consumatori verrà ottenuta usando i dati di contaminazione determinati in questo progetto, combinati a quelli sul consumo di pesce e frutti di mare e confrontati con i dati di contaminazione in altre regioni. L'effetto del cambiamento climatico sul rischio di esposizione verrà determinato considerando il cambiamento dello scenario di esposizione, legato all'aumento degli organismi produttori. I risultati ottenuti e il loro possibile impatto sul consumo di molluschi, verranno condivisi in meeting, con volantini e infografiche da distribuire ai vari stakeholder, con moduli di apprendimento, condividendo informazioni attraverso il sito web del coordinatore del progetto e i social media. La comunicazione e lo scambio di informazioni con gli stakeholder permetteranno di capire l'impatto del progetto sulla comunità.

Risultati attesi

Il monitoraggio delle concentrazioni di TTX con metodi chimici nei mitili costituirà il primo screening per la presenza e la diffusione di TTX nel mollusco delle aree della Laguna di Venezia e di Marano (Friuli-Venezia Giulia) e contribuirà a individuare la matrice maggiormente coinvolta nella contaminazione. Il saggio biologico sulle cellule di neuroblastoma permetterebbe un rapido screening per il rilevamento di TTX nei molluschi. Con l'obiettivo di identificare possibili taxa produttori di TTX, le analisi di fitoplancton e metatassonomiche permetteranno di rivelare potenziali relazioni causa-effetto tra la composizione delle comunità microbiche e fitoplanctoniche e la produzione di TTX. Il previsto miglioramento del saggio funzionale consentirà una quantificazione rapida, sensibile, specifica, precisa e accurata della TTX e dei suoi analoghi tossici. Inoltre, il saggio permetterà di analizzare diversi campioni contemporaneamente in un breve lasso di tempo, superando le principali limitazioni degli attuali metodi chimici, risultando adatto come strumento di screening per monitorare le TTX ed i loro analoghi tossici nei molluschi. Inoltre, la capacità del saggio di anche altre tossine marine rappresenterà uno strumento utile ad un loro rilevamento precoce, necessario per valutare e gestire rapidamente i rischi associati per i consumatori. La valutazione del rischio consentirà di determinare se in Italia la TTX è un rischio emergente reale e di prevenire esposizioni pericolose. Verranno presi in considerazione nuovi scenari di cambiamento climatico per definire il nuovo quadro in cui sviluppare opportune soluzioni gestionali. La comunicazione con i diversi stakeholders ed il loro impegno nella gestione dell'esposizione al rischio nelle diverse fasi della catena alimentare migliorerà la sicurezza di lavoratori e consumatori.

Bibliografia

- [1] Antonelli P., Peruzzo A., Mancini M., Boscolo Anzoletti A., Dall'Ara S., Orsini M., Bordin P., Arcangeli G., Zanolin B., Barco L., Losasso C., 2023, Tetrodotoxin in bivalve mollusks: An integrated study towards the comprehension of the influencing factors of a newly native phenomenon, *Chemosphere* 339, 139682.
- [2] Dhanji-Rapkova M., Teixeira Alves M., Triñanes J.A., Martinez-Urtaza J., Haverson D., Bradley K., Baker-Austin C., Huggett J.F., Stewart G., Ritchie J.M., Turner A.D., 2023, Sea temperature influences accumulation of tetrodotoxin in British bivalve shellfish, *Science of the Total Environment* 885, 163905.

Ricerca di microplastiche in telline (*Donax trunculus*) raccolte lungo il litorale toscano nel contesto delle attività di monitoraggio ufficiale

C. Malloggi¹, M. Guidi¹, S. Bartalena², A. Giusti¹, L. Nalbone³, F. Giarratana³, F. Susini², A. Armani^{1*}

¹ Fishlab, Dipartimento di Scienze Veterinarie, Università di Pisa - Pisa (PI)

² Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Lazio e della Toscana - Pisa (PI)

³ Dipartimento di Scienze Veterinarie, Università di Messina, Polo Universitario Dell'Annunziata - Messina (ME)

Keywords: Microplastiche, Molluschi bivalvi, *Donax trunculus*, Sicurezza del consumatore

Introduzione

Le microplastiche (MP) sono definite come particelle di polimeri plastici di dimensioni comprese tra 0,1 µm e 5 mm, prodotte tal quale a livello industriale (MPM primarie) o derivate dalla frammentazione di oggetti in plastica più grandi (MP secondarie) [1]. La presenza di MP è stata ampiamente documentata in tutti gli oceani e mari del mondo [1]. Una volta fatto il loro ingresso nell'ecosistema marino, data la loro piccola dimensione, le MP possono essere facilmente ingerite da un vasto numero di organismi, a più livelli trofici, entrando così nella catena alimentare [2]. I molluschi bivalvi (MB) essendo filtratori, sono in grado di accumulare e veicolare contaminanti e patogeni [3] e possono rappresentare, quindi, anche una fonte di esposizione umana alle MP. Tali organismi vengono pertanto spesso utilizzati per valutare l'inquinamento da MP negli ambienti marini. I mitili sono fra i MB più utilizzati, seguiti da ostriche, vongole e capesante [1]. Al contrario le telline (genere *Donax*) (superfamiglia Tellinoidea, famiglia Donacidae) nonostante ampiamente consumate in alcune regioni costiere europee, sono state poco indagate da questo punto di vista. Solo quattro studi hanno valutato la presenza di MP in questa specie [4,5,6,7]. La specie *D. trunculus* è un importante costituente della fauna bentonica infralitorale, già utilizzata come sentinella per monitorare gli inquinamenti marini delle spiagge sabbiose nelle aree del Mediterraneo [8]. Come per tutte le altre specie di MB, la raccolta delle telline può avvenire soltanto in zone classificate e monitorate per i criteri stabiliti dalla normativa dalle Autorità Competenti [9,10]. Nonostante, quindi, ad oggi le MP siano riconosciute come un inquinante emergente che richiede iniziative condivise a livello internazionale, non sono ancora considerate tra i contaminanti alimentari [11]. Lo scopo del presente studio, è stato quello di rilevare la presenza di MP in *D. trunculus*, raccolte lungo la costa toscana nel contesto di attività di monitoraggio ufficiali. Successivamente le particelle sono state caratterizzate quantitativamente per valutare il potenziale rischio per il consumatore.

Summary

The aim of this work was to detect the presence of microplastics (MPs) in *Donax trunculus*'s specimens collected along the Tuscan coast in the context of official monitoring activities. For MP extraction, the protocol of Ben Haddad et al. (2022) was adapted to our laboratory. Of the 39 samples analyzed, 35 (89,7%) tested positive for a total of 85 particles: 45 (52,9%) classified as fibers (MP-li) and 40 (47,1%) as fragments (MP-fr). The most represented colors of particles were black (29%) and blue (28%). The average particle abundance per sample was $2,18 \pm 1,79$ particles/sample, while that per gram was $0,22 \pm 0,18$ (particles/g*ww). In agreement with the latter, consumption of a 100 g portion would result in the ingestion of an average of 22 particles (4 to 40), which is lower than that reported in the literature for other MB species. Furthermore, the number of particles to which consumers could be exposed would be 70,4 MPs/capita/year (range 12,5-127), considering a per-capita consumption of 0,32 kg. This study represents the only one that analyzed samples collected from sampling sites defined by the CA. The low abundance of MP found can suggest a low level of plastic pollution contamination in this area. However, since these are specimens from Class A areas, the consumer is exposed to all the particles present. Finally, an assessment of the actual human health risks associated with MB consumption is not yet possible, as the lack of reliable and validated methods does not allow the generation of the necessary scientific data. Further studies evaluating the presence of MP in *D. trunculus* in the Mediterranean Sea are therefore desirable.

Materiali e Metodi

Tutti gli esemplari analizzati, raccolti da febbraio a dicembre 2021 (esclusi gennaio e aprile), provenivano dai cinque siti di campionamento per il monitoraggio dei banchi naturali classificati come zone di tipo A (Reg. (CE) 853/04). I campioni utilizzati per le analisi di ricerca delle MP erano costituiti da pool di 10 gr (n=35) di polpa e liquido intervalvare. Per l'estrazione delle particelle è stato opportunamente modificato un protocollo precedentemente sviluppato per la ricerca di MP in telline [5]. Per minimizzare le contaminazioni ambientali durante le fasi di preparazione ed analisi, sono state adottate delle rigorose misure di controllo qualità. Sono stati eseguiti bianchi procedurali, filtri bianchi e controlli positivi al fine di valutare le contaminazioni ambientali e la riproducibilità dell'analisi. Successivamente, le particelle sono state classificate morfologicamente [1] e

misurate attraverso il supporto di un software. È stata calcolata l'abbondanza delle particelle per ogni campione e l'abbondanza media delle particelle (media \pm deviazione standard). La valutazione dell'esposizione alle MP in seguito al consumo di telline è stata calcolata considerando una porzione di 100 g e un consumo pro capite/anno di 0,32 Kg (consumo medio riferito alle vongole).

Risultati e discussioni

In totale sono stati sottoposti ad analisi 39 campioni, per un totale di 1365 esemplari. Essendo ad oggi, le analisi qualitative ancora in corso, i calcoli sono stati condotti sul totale delle particelle riscontrate. Di questi 39 campioni, 35 (89,7%) sono risultati positivi (presenza di almeno una particella per filtro) per un totale di 85 particelle. Di queste particelle, 45 (5,9%) sono state classificate come fibre (MP-li) e 40 (47,1%) come frammenti (MP-fr). Il colore più riscontrato per le MP-fr era il nero (43,0%), mentre per le MP-li era il blu (40%). Per quanto riguarda le dimensioni, le MP-li avevano una lunghezza compresa tra ~100 μ m e ~4000 μ m, mentre, quella dei MP-fr variava tra ~30 μ m e ~500 μ m. Questo risultato si trova in linea con quanto riportato in letteratura: il tipo predominante di particelle riscontrato negli altri studi condotti su telline e su altre specie di MB è rappresentato infatti dalle fibre [2,5]. La media delle densità di particelle per campione era pari a $2,18 \pm 1,78$ particelle/campione ($0,06 \pm 0,05$ particelle/individuo), mentre quella per grammo era pari a $0,22 \pm 0,18$ (particelle/g*ww). Nel 53,9% (n=21) dei campioni sono state riscontrate 1 o 2 particelle, mentre nel 35,9% (n=14) sono state riscontrate più di 2 particelle (con un massimo di 8). Solo nel 10,3% (n=4) dei campioni non sono state riscontrate particelle. L'abbondanza media riscontrata in questo studio risulta più bassa rispetto a quella riportata negli altri studi condotti su esemplari di *D. trunculus* raccolti nel Mar Nero e Oceano Atlantico. Inoltre, rientra nell'intervallo riportato nell'unico studio condotto su esemplari della stessa specie raccolti nel Mar Tirreno (lungo le coste laziali) [6]. Infine, risulta più bassa anche delle abbondanze medie riportate in altre specie del genere *Donax* e l'abbondanza media, calcolata nello studio di Ding et. al (2022) [2], per numerose specie di vongole, MB infaunali come le telline. In accordo con l'abbondanza media osservata, il consumo di una porzione di 100 gr di telline, comporterebbe l'ingestione di una media di 22 particelle (4 - 40), inferiore rispetto a quella riportata in letteratura per altre specie di MB. Inoltre, la quantità di particelle a cui potrebbero essere esposti i consumatori sarebbe di 70.4 particelle/capita/anno (range 12.5- 127). Non avendo ad oggi effettuato l'identificazione dei polimeri, l'esposizione del consumatore è stata calcolata considerando tutte le particelle come MP. Pertanto, allo scopo di rendere questo valore più attendibile, l'esposizione è stata ricalcolata utilizzando un fattore di correzione. Infatti, in un precedente lavoro (dati non pubblicati) è stato calcolato che una percentuale variabile dal 17% al 90% delle particelle riscontrate nei MB venivano effettivamente confermate come MP all'analisi qualitativa. Alla luce di questa correzione i consumatori sarebbero, quindi, esposti ad un numero di MP compreso tra 4 e 20 per ogni porzione di e tra 13 e 64 MP/capita/anno. Considerando, inoltre, che le telline provenivano da aree di produzione di classe A, che non necessitano di un trattamento di depurazione e sono quindi direttamente destinabili alla vendita, il consumatore sarebbe esposto effettivamente a tutte le MP presenti nella porzione. Valori elevati di esposizione a MP dovuti al consumo di MB sono stati riportati in diversi paesi europei come Francia, Belgio e Spagna. Tuttavia, sono riportate in letteratura altre importanti fonti di contaminazione, anche non direttamente legate all'alimento, tra cui il l'acqua potabile e il sale marino [12,13]. Questo studio è uno dei pochi ad aver indagato la presenza di MP in telline (*D. trunculus*) e rappresenta l'unico ad aver analizzato esemplari nell'ambito delle attività di monitoraggio ufficiale. Al fine di completare lo studio, alcune particelle sono state inviate al Dipartimento di Scienze Veterinarie dell'Università di Messina per l'identificazione dei polimeri. In conclusione, una valutazione degli effettivi rischi per la salute umana associati al consumo di MB non è ancora possibile alla luce dei dati disponibili in letteratura. Infine, sono auspicabili ulteriori studi condotti su MB provenienti da zone di classe B al fine di valutare l'effetto della depurazione sull'accumulo di MP.

Bibliografia

- [1] Group of Experts on the Scientific Aspects of Marine Environmental Protection (GESAMP). (2019). Guidelines or the monitoring and assessment of plastic litter and microplastics in the ocean. In P. J. Kershaw, A. Turra, & F. Galgani (Eds.), *Rep. Stud. GESAMP No. 99* (p. 130). Available at <http://www.gesamp.org/publications/guidelines-for-the-monitoring-and-assessment-of-plastic-litter-in-the-ocean>
- [2] Ding, J., Sun, C., Li, J., Shi, H., Xu, X., Ju, P., ... & Li, F. (2022). Microplastics in global bivalve mollusks: A call for protocol standardization. *Journal of Hazardous Materials*, 438, 129490.
- [3] Venugopal, V., & Gopakumar, K. (2017). Shellfish: nutritive value, health benefits, and consumer safety. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 16(6), 1219-1242.
- [4] Alexandrova, A. V., Ignatova-Ivanova, T. V., Bachvarova, D. G., Toschkova, S. G., Doichinov, A. H., Ibryamova, S. F., & Chipev, N. H. (2022). Pilot Screening and Assessment of Microplastic Bioaccumulation in Wedge Clams *Donax trunculus* Linnaeus, 1758 (Bivalvia) from the Bulgarian Black Sea Coast. *Acta Zool. BulG*
- [5] Ben-Haddad, M., Abelouah, M. R., Hajji, S., De-la-Torre, G. E., Abou Oualid, H., Rangel-Buitrago, N., & Alla, A. A. (2022). The wedge clam *Donax trunculus* L., 1758 as a bioindicator of microplastic pollution. *Marine Pollution Bulletin*, 178
- [6] Olivieri, Z., Cesarini, G., Orsini, M., De Santis, S., & Scalici, M. (2022). Uptake of Microplastics in the Wedge Clam *Donax trunculus* : First Evidence from the Mediterranean Sea. *Water*, 14(24), 4095.
- [7] Şentürk, Y., Esensoy, F. B., Öztekin, A., & Aytan, Ü. (2020). Microplastics in bivalves in the southern Black Sea. *Marine Litter in the Black Sea*, 303-313.

- [8] Tlili, S., & Mouneyrac, C. (2019). The wedge clam *Donax trunculus* as sentinel organism for Mediterranean coastal monitoring in a global change context. *Regional environmental change*, 19, 995-1007.
- [9] EU Council (2017). Regulation (EU) 2017/625 of the European Parliament and of the Council of 15 March 2017 on official controls and other official activities performed to ensure the application of food and feed law, rules on animal health and welfare, plant health and plant protection products. *Official Journal of the European Communities Serie L* 95, 7.4.2017.
- [10] EU Commission (2019). Commission Delegated Regulation (EU) 2019/624 of 8 February 2019 concerning specific rules for the performance of official controls on the production of meat and for production and relaying areas of live bivalve molluscs in accordance with Regulation (EU) 2017/625 of the European Parliament and of the Council. *Official Journal of the European Communities Serie* 131, 17.5.2019, p. 1–17
- [11] EU Commission (2023). Commission Regulation (EU) 2023/915 of 25 April 2023 on maximum levels for certain contaminants in food and repealing Regulation (EC) No 1881/2006. *Official Journal of the European Communities Serie* 119, 5.5.2023, p. 103–157
- [12] Danopoulos, E., Jenner, L., Twiddy, M., and Rotchell, J. M. (2020a). Microplastic contamination of salt intended for human consumption: a systematic review and meta-analysis. *SN Applied Sciences* 2(12):1-18.
- [13] Danopoulos, E., Twiddy, M., and Rotchell, J. M. (2020b). Microplastic contamination of drinking water: A systematic review. *PLoS one* 15(7): e0236838.

Sicurezza alimentare dei molluschi bivalvi prodotti nel Golfo della Spezia: patogeni virali classici ed emergenti

C. Masotti¹, R. Battistini¹, L. Serracca¹, E. Costa², M. Orlandi², E. Suffredin³, C. Ercolini¹

¹ Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta – Sezione di La Spezia

² Azienda Sociosanitaria Ligure 5 – Struttura Complessa Igiene degli Alimenti di Origine Animale – La Spezia

³ Istituto Superiore di Sanità - Dipartimento di Sicurezza Alimentare, Nutrizione e Sanità Pubblica Veterinaria - Roma

Keywords: molluschi bivalvi, Norovirus, Epatite A, Epatite E, Astrovirus, Aichivirus

Introduzione

I molluschi bivalvi sono organismi filtratori, capaci di concentrare nell'epatopancreas da 100 a 200 volte i microorganismi presenti nelle acque [1]. Pertanto, contribuiscono alla diffusione degli agenti virali che possono trasmettere all'uomo, soprattutto se consumati crudi o poco cotti. Nonostante numerosi studi, la contaminazione virale nei molluschi rimane un problema serio. I virus enterici a trasmissione oro-fecale sono spesso associati a gastroenteriti nell'uomo ed in alcune specie animali. Norovirus (NoV) ed Epatite A (HAV) sono tra i virus enterici maggiormente implicati in epidemie trasmesse con gli alimenti [2]. L'identificazione di epatite E (HEV) all'interno dei molluschi è rara [3,4]. Negli ultimi anni altri virus con potenziale zoonotico, come Astrovirus (AsV) e Aichivirus (AiV), sono stati ritrovati con elevata prevalenza e concentrazione nelle acque reflue e sono stati associati a focolai di gastroenterite umana in relazione al consumo di ostriche o altri molluschi in varie parti del mondo [5,6]. Nel presente studio è stata indagata la presenza di virus enterici patogeni, classici ed emergenti, in ostriche (*Crassostrea gigas*) e mitili (*Mytilus galloprovincialis*) provenienti dalle zone di molluschicoltura del Golfo della Spezia.

Summary

Bivalve molluscs are filter-feeding organisms, capable of concentrating pathogenic microorganisms from the surrounding environment, thus contributing to the spread of viral pathogens, which they can transmit to humans, especially if eaten raw or undercooked. Although NoV and HAV are considered the most common causes of foodborne infections, other viruses with zoonotic potential (HEV, AsV and AiV) have been identified in shellfish in recent years. The aim of the study is to investigate the presence of classical and emerging pathogenic enteric viruses in oysters (*Crassostrea gigas*) and mussels (*Mytilus galloprovincialis*) from the mollusc farming areas of the Gulf of La Spezia, between April 2022 and March 2023. In the period considered, a total of 168 samples (84 oysters and 84 mussels) were analysed. The prevalence of NoV was highest with 33% (55/168) of positive samples, followed by 17% (29/168) for AsV and 8% (14/168) for AiV. This study revealed for the first time the presence of AsV and AiV in molluscs farmed in this sea area. All samples tested were negative for HAV and HEV.

Materiali e metodi

Il monitoraggio è stato condotto tra aprile 2022 e marzo 2023 prelevando ostriche e mitili allevati nel Golfo della Spezia con frequenza mensile. Tutti i campioni sono stati analizzati mediante metodiche molecolari (RT-PCR) per la ricerca quali-quantitativa dei virus enterici umani classici (NoV, HAV, HEV) ed emergenti (AsV, AiV).

Risultati e discussione

Nel periodo considerato sono stati analizzati complessivamente 168 campioni (84 ostriche e 84 mitili). La prevalenza di NoV è risultata quella più elevata con il 33% (55/168) dei campioni positivi, seguita dal 17% (29/168) per AsV e dall'8% (14/168) per AiV. Le prevalenze riscontrate sono in linea con quelle osservata in altri paesi europei e zone di produzione italiana [7,8,9,10]. Questo studio ha fatto emergere per la prima volta la presenza di AsV e AiV nei molluschi allevati in quest'area di mare. Tutti i campioni esaminati sono risultati negativi per HAV ed HEV. Il 58% (98/168) dei campioni analizzati è risultato positivo per almeno un target virale. I campioni contaminati da più di un virus sono risultati il 19% (32/168) e di questi, un solo campione è risultato positivo a 3 dei virus ricercati. In quasi la metà dei campioni positivi per NoV è stata rilevata la positività anche per AsV (21/55), mentre solo 3 campioni hanno mostrato la presenza contemporanea di NoV e AiV. Tra i campioni positivi a NoV ed AsV, le ostriche rappresentano un rischio maggiore rispetto ai mitili, in quanto oltre a presentare una carica virale più elevata di un fattore 10, sono generalmente consumate crude [7]. La carica virale di NoV GII è risultata superiore rispetto a GI sia nelle ostriche che nei mitili, probabilmente giustificato sia un'elevata prevalenza nella comunità dei ceppi di NoV GII sia alla differenza della presenza di ligandi nei diversi apparati dei molluschi [11].

L'analisi statistica ha evidenziato una correlazione inversa tra i valori di carica virale e la temperatura dell'acqua di mare al momento del campionamento, confermando l'andamento stagionale di questi virus

(Grafico 1). Considerando il trend della contaminazione virale riscontrata in questa ricerca, il rischio di contaminazione virale per i molluschi prodotti durante il periodo invernale e primaverile appare più elevato. I dati forniti da questo studio rappresentano un fondamentale punto di partenza per i molluscoltori affinché vengano adottate idonee strategie pre e post-harvest utili a migliorare la qualità igienico-sanitaria del prodotto, in quanto la depurazione classica non risulta sufficientemente efficace per diminuire il rischio per la sicurezza del consumatore legato alla presenza di virus enterici [7,12,13]. Questa ricerca ha inoltre permesso all'Autorità Competente di acquisire informazioni rilevanti per le future decisioni di gestione del rischio virologico, nel momento in cui la ricerca dei virus diventerà parte integrante della normativa comunitaria ed alla luce della potenziale introduzione di un limite legale per NoV.

Bibliografia

- [1] Richards, G.P. (1988) Microbial purification of shellfish. *J Food Prot* 51:218-51.
- [2] EFSA 2022. EFSA and ECDC (European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control), 2022. The European Union One Health 2021 Zoonoses Report. *EFSA Journal* 2022; 20(12): 7666, 273
- [3] La Rosa, G., Proroga, Y. T. R., De Medici, D., Capuano, F., Iaconelli, M., Della Libera, S., & Suffredini, E. (2018). First detection of hepatitis E virus in shellfish and in seawater from production areas in Southern Italy. *Food and environmental virology*, 10, 127-131.
- [4] Di Cola, G., Fantilli, A.C., Pisano, M.B., Ré, V.E. (2021) Foodborne transmission of hepatitis A and hepatitis E viruses: A literature review. *Food Microbiol.* 338, 108986.
- [5] Rivadulla, E., & Romalde, J. L. (2021). Correction to a comprehensive review on human Aichi virus. *Virologica Sinica*, 36(2), 342.
- [6] Donato, C., Vijaykrishna, D. (2017), The Broad Host Range and Genetic Diversity of Mammalian and Avian Astroviruses. *Viruses* 9, 102.
- [7] Battistini, R., Masotti, C., Listorti, V., Suffredini, E., Maurella, C., Garcia-Vozmediano, A., Costa, E., Iacona, F., Orlandi, M., Ercolini, C., Serracca, L. (2021) Norovirus Persistence in Oysters to Prolonged Commercial Purification. *Pathogens*, 28;10(8):944.
- [8] Fusco, G., Di Bartolo, I., Cioffi, B., Ianiro, G., Palermo, P., Monini, M., & Amoroso, M. G. (2017). Prevalence of foodborne viruses in mussels in Southern Italy. *Food and Environmental Virology*, 9, 187-194.
- [9] Romalde, J. L., Rivadulla, E., Varela, M. F., & Barja, J. L. (2018). An overview of 20 years of studies on the prevalence of human enteric viruses in shellfish from Galicia, Spain. *Journal of applied microbiology*, 124(4), 943-957.
- [10] Ludwig-Begall, L. F., Mauroy, A., & Thiry, E. (2021). Noroviruses—the state of the art, nearly fifty years after their initial discovery. *Viruses*, 13(8), 1541.
- [11] Van Beek, J., de Graaf, M., Al-Hello, H., Allen, D. J., Ambert-Balay, K., Botteldoorn, N., ... & Koopmans, M. P. (2018). Molecular surveillance of norovirus, 2005–16: an epidemiological analysis of data collected from the NoroNet network. *The Lancet Infectious Diseases*, 18(5), 545-553.
- [12] McLeod, C., Polo, D., Le Saux, J. C., & Le Guyader, F. S. (2017). Depuration and relaying: a review on potential removal of norovirus from oysters. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 16(4), 692-706.
- [13] Battistini, R., Masotti, C., Maurella, C., Costa, E., Orlandi, M., Feletti, M., Ercolini, C., Serracca, L. (2022) Study on the Effect of Relaying on Norovirus Reduction from *Crassostrea gigas* Oysters. *Microorganisms*. 1;10(12):2389.

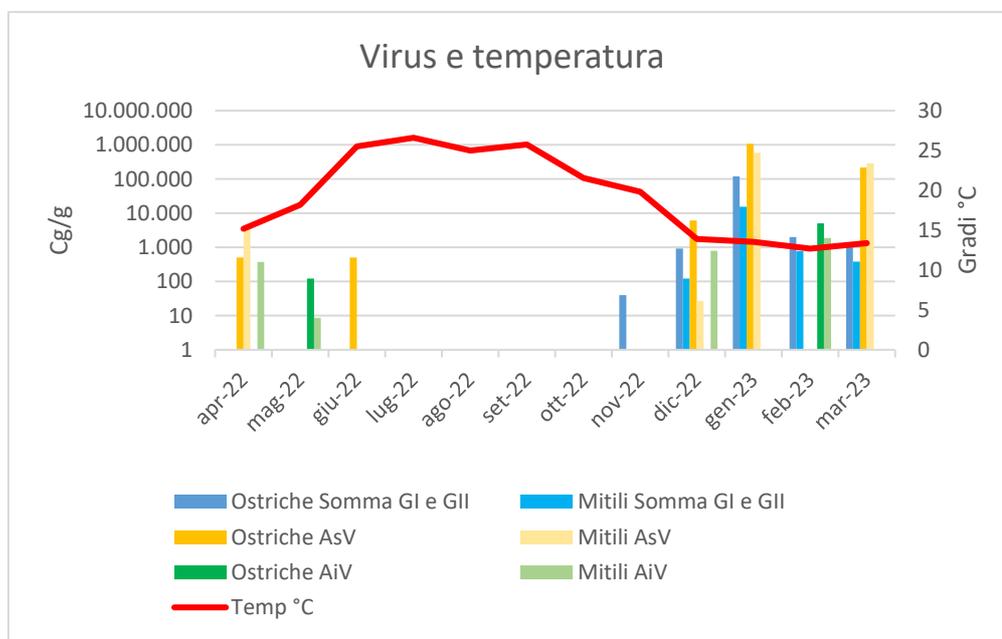


Grafico 1. Andamento stagionale di tutti i virus, raffrontato con andamento della temperatura dell'acqua marina.

Esposizione di *Mytilus galloprovincialis* alle microplastiche: Accumulo, Depurazione e Valutazione dei livelli di espressione di una selezione di biomarcatori molecolari

F. Pizzurro¹, E. Nerone¹, M. Ancora¹, M. Di Domenico¹, L.F. Mincarelli¹, R. Salini¹, L. Di Renzo¹, F. Di Giacinto¹, C. Corbau², S. Recchi¹

¹ Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Abruzzo e Molise (IZSAM), Teramo (Italy)

² Università di Ferrara, Dipartimento di Scienze dell'Ambiente e della Prevenzione, Ferrara (Italy)

Keywords: *Mytilus galloprovincialis*, molluschi, microplastiche, depurazione

Introduzione

Le microplastiche (MPs) sono un inquinante onnipresente la cui diffusione è una preoccupazione crescente in tutto il mondo. Possono rappresentare una minaccia per la sicurezza alimentare e la salute dei consumatori in quanto vengono ingerite attraverso vari alimenti. I molluschi bivalvi sono considerati tra quelli più a rischio, poiché filtrano grandi quantità di acqua di mare ed entrano nella dieta dei consumatori ingeriti per intero.

Nel presente studio è stata condotta una contaminazione sperimentale dei mitili (*Mytilus galloprovincialis*) utilizzando una miscela delle 3 principali tipologie di MPs solitamente presenti nella colonna di acqua di mare (53% filamenti, 30% frammenti, 3% granuli) [1], ed utilizzando una concentrazione frequentemente rilevata nell'ambiente marino (10⁴ particelle/L) [2]. Nello specifico, l'esperimento ha previsto un'esposizione dei mitili della durata di 3 giorni, seguita da due diversi tempi di depurazione (2 giorni e 7 giorni).

Lo scopo del presente lavoro è stato quello di studiare l'accumulo e la successiva depurazione dei bivalvi dalle MPs, attraverso un'analisi quali-quantitativa effettuata allo stereomicroscopio, al fine di testare il processo di depurazione come potenziale metodo di rimozione di tali contaminanti dai bivalvi destinati al consumo umano. Sono stati inoltre valutati, sia nelle ghiandole digestive che nelle branchie dei mitili oggetto di sperimentazione, dei biomarcatori molecolari, mediante RT-PCR SYBR Green, al fine di rilevare eventuali variazioni nei livelli di espressione di alcuni geni associati alla biotrasformazione (Cytochrome P450-3-like-2 (*cyp32*)), alla risposta cellulare (Heat-shock protein 70, *hsp70*), e al sistema immunitario (Cathepsin L (*cat*)) [3].

Summary

Filter feeders are target species for microplastic (MPs) pollution, as particles can accumulate in the digestive system, disturbing feeding processes and becoming internalized in tissues. This study aims to assess the accumulation and subsequent purification of mussels (*Mytilus galloprovincialis*) from MPs in order to identify the depuration process to remove these contaminants from bivalves intended for human consumption. Changes in gene expression levels implicated in detoxification, DNA repair, cellular response, stress and innate immunity have been evaluated by RT-PCR SYBR Green. The main results of this study demonstrates that: a) the purification process can significantly reduce MPs contamination in *Mytilus galloprovincialis*, though longer depuration periods need to be tested, in order to assess the possibility of an even greater reduction in MPs contamination; b) a differential expression level has been observed between mussels tested and in particular most of the differences were found in the gills, thus defining it as the target organ for the use of these biomarkers. Therefore, this study further suggests the potential use of molecular biomarkers as innovative method, encouraging their use in next generation marine monitoring programs.

Materiali e metodi

I mitili utilizzati per gli esperimenti, di dimensioni commerciali (4-7 cm), sono state prelevati da un allevamento situato lungo la costa molisana e successivamente suddivisi in gruppi sperimentali, ciascuno composto da 120 individui.

Nella fase iniziale dell'acclimatazione, i bivalvi sono stati mantenuti per 7 giorni in due acquari di vetro da 50 L contenenti acqua di mare sintetica filtrata, posti all'interno di una camera termostata a 20 °C, alle stesse condizioni di salinità (35 ‰), temperatura (18 ± 1 °C) e pH (8±0.5). Durante tale fase gli organismi sono stati inoltre sottoposti ad un regime di fotoperiodo di 12 ore di luce e 12 ore di buio, non sono stati alimentati ed è stato effettuato un rinnovo quotidiano dell'acqua. Successivamente, è stata condotta la fase di esposizione, della durata di 3 giorni, durante la quale quotidianamente è stata rinnovata l'acqua contaminata con le MPs (concentrazione di 10⁴ particelle/L; rapporto: 53% filamenti/30% frammenti/3% granuli) ed è stata monitorata la mortalità degli organismi. In questa fase, come anche durante la successiva fase di depurazione, i mitili sono stati alimentati quotidianamente con colture algali di *Isochrysis galbana* e *Tetraselmis suecica* con una dose giornaliera pari al 3% del peso secco dei bivalvi, ragione ritenuta sufficiente a soddisfarne il fabbisogno energetico giornaliero [4]. Infine, gli organismi sono stati trasferiti in nuove vasche contenenti acqua di mare sintetica filtrata e quindi sottoposti al processo di depurazione. Per una durata complessiva di 7 giorni sono stati effettuati quotidianamente il ricambio dell'acqua, il monitoraggio della mortalità e l'alimentazione degli individui.

Il prelievo dei mitili (gruppi costituiti da 20 organismi) è stato effettuato in tempi prestabiliti: il gruppo di controllo, è stato prelevato alla fine della fase di acclimatazione; il gruppo T0, alla fine della fase di contaminazione; i gruppi T2 e T7, rispettivamente dopo 2 e 7 giorni di depurazione.

Gli organismi sono stati quindi sottoposti sia al processo di digestione del tessuto molle e successiva analisi quali-quantitativa delle MPs allo stereomicroscopio, che ad indagini biomolecolari per l'analisi di tre geni associati alla biotrasformazione (*cyp32*), alla risposta cellulare (*hsp70*), e al sistema immunitario (*cat*) su branchie ed epatopancreas mediante RT-PCR SYBR Green.

L'analisi statistica dei dati ottenuti è stata condotta con i software R v4.0.5 (R Core Team, 2021) ed Excel 2016 (Microsoft, Silicon Valley, California, USA).

Risultati e discussione

Dall'analisi di regressione lineare (*Grafico 1, Tabella 1*) utilizzata per verificare l'eventuale esistenza di una relazione tra le variabili "numero di particelle di MPs/grammo" e "tempo di depurazione", è stato possibile rilevare una diminuzione statisticamente significativa (p. value 2,5E-14) nella presenza di particelle di MPs riscontrate per ogni grammo di tessuto molle dei mitili analizzati. Tale diminuzione è visibile già dopo 2 giorni di depurazione (decremento pari a 51%), ed è ancora più evidente dopo i 7 giorni (decremento pari a 73%). Questi dati indicano una buona capacità dei bivalvi dopo 7 giorni di riuscire a depurare adeguatamente le microplastiche accumulate all'interno del loro tessuto molle [5-6].

Sono state inoltre riscontrate differenze statisticamente significative tra il gruppo T0 e il gruppo T7 (p. value 0,007048) per quanto riguarda la classe dimensionale delle MPs riscontrate all'interno dei mitili analizzati. Nel gruppo T0 la classe dimensionale più rappresentata era compresa tra 1000-2000 μm a differenza del gruppo T7 dove erano più presenti MPs di dimensioni <1000 μm . Questi risultati potrebbero spiegare la capacità dei molluschi bivalvi di eliminare le particelle microplastiche più grandi, più facilmente e in tempi più brevi [7-8].

Infine la tipologia di microplastiche che sembra essere eliminata più efficacemente dai mitili, sia dopo 2 che 7 giorni di depurazione, sono i granuli, seguiti dai filamenti e dai frammenti. Probabilmente la dimensione sferica dei granuli consente ai bivalvi di eliminarli più facilmente, a differenza dei filamenti che invece, per la loro geometria, rimangono intrappolati nelle branchie e non riescono ad essere facilmente rimossi attraverso il processo di filtrazione [9-10-11-12].

Come mostrato in *Figura 1*, tre biomarcatori molecolari, noti già da altri studi per essere coinvolti nella risposta agli inquinanti [3,13], sono stati testati nelle branchie e nelle ghiandole digestive dei mitili oggetto di sperimentazione. Nel complesso è stata osservata un'espressione differenziale tra i gruppi di mitili testati ed in particolare la maggior parte delle differenze sono state riscontrate nelle branchie, definendolo quindi l'organo target per l'utilizzo di tali biomarcatori [13,16].

Sono ancora in corso le analisi per altri geni, tra i quali quelli associati alla biotrasformazione e disintossicazione (Cytochrome P450-1-like-1 (*cyp11*), π -Glutathione-s-transferase (π -*gst*)), alla riparazione del DNA (tumor protein, *p53*) e al sistema immunitario (Lysozyme (*lys*)), al fine di ampliare il set dei possibili biomarcatori coinvolti nella risposta dei bivalvi agli inquinanti.

Dai primi risultati preliminari, abbiamo osservato un livello di mRNA di *cyp32* più elevato nelle branchie dei mitili sottoposti a 2 giorni di depurazione (T2) rispetto al gruppo di controllo. Tale risultato fornirebbe un'ulteriore prova del coinvolgimento di tale gene nei processi di biotrasformazione dei mitili, come già descritto da altri autori [13,16]. Sempre nelle branchie abbiamo osservato un aumento dell'espressione di *hsp70* dopo la fase di esposizione dei bivalvi (T0), dato descritto anche da altri studi di contaminazione con MPs [3,17,18], che potrebbe indicare un'induzione della sintesi ex novo di queste proteine come tentativo di far fronte a fattori inquinanti. Infine, per quanto riguarda il gene *cat*, i nostri risultati hanno mostrato una down-regolazione nel gruppo esposto a MPs (T0), a differenza di altri recenti studi [3,18] che hanno riportato una up-regolazione della trascrizione del gene *cat* dopo l'esposizione alle MPs, suggerendo che questa catepsina potrebbe avere un ruolo nel percorso apoptotico intracellulare.

In conclusione, il risultato del presente studio dimostra che: (a) i processi di depurazione possono ridurre significativamente la contaminazione da MPs in *Mytilus galloprovincialis*; (b) potrebbe essere incoraggiato l'uso dei biomarcatori molecolari come strumento utile ed innovativo all'interno di programmi di monitoraggio ambientale marino.

Bibliografia

- [1] Burns, E. E., & Boxall, A. B. A. (2018). Microplastics in the aquatic environment: Evidence for or against adverse impacts and major knowledge gaps. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 37(11), 2776–2796. <https://doi.org/10.1002/etc.4268>
- [2] Gardon, T., Morvan, L., Huvet, A., Quillien, V., Soyez, C., le Moullac, G., & le Luyer, J. (2020). Microplastics induce dose-specific transcriptomic disruptions in energy metabolism and immunity of the pearl oyster *Pinctada margaritifera*. *Environmental Pollution*, 266, 115180. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.115180>
- [3] Brandts, I., Teles, M., Gonçalves, A. P., Barreto, A., Franco-Martinez, L., Tvarijonaviute, A., Martins, M. A., Soares, A. M. V. M., Tort, L., & Oliveira, M. (2018). Effects of nanoplastics on *Mytilus galloprovincialis* after individual and combined exposure with carbamazepine. *Science of The Total Environment*, 643, 775–784. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.06.257>

- [4] Albetosa, M., Sánchez-Hernández, M., Campillo, J. A., & Moyano, F. J. (2012). Relationship between physiological measurements (SFG -scope for growth-) and the functionality of the digestive gland in *Mytilus galloprovincialis*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 163(3–4), 286–295. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2012.07.019>
- [5] Covernton, G. A., Dieterle, M., Pearce, C. M., Gurney-Smith, H. J., Dower, J. F., & Dudas, S. E. (2022). Depuration of anthropogenic particles by Pacific oysters (*Crassostrea gigas*): Feasibility and efficacy. *Marine Pollution Bulletin*, 181, 113886. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2022.113886>
- [6] Fernández, B., & Albetosa, M. (2019). Insights into the uptake, elimination and accumulation of microplastics in mussel. *Environmental Pollution*, 249, 321–329. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.03.037>
- [7] Browne, M. A., Dissanayake, A., Galloway, T. S., Lowe, D. M., & Thompson, R. C. (2008). Ingested Microscopic Plastic Translocates to the Circulatory System of the Mussel, *Mytilus edulis* (L.). *Environmental Science & Technology*, 42(13), 5026–5031. <https://doi.org/10.1021/es800249a>
- [8] van Cauwenbergh, L., & Janssen, C. R. (2014). Microplastics in bivalves cultured for human consumption. *Environmental Pollution*, 193, 65–70. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2014.06.010>
- [9] Renzi, M., Guerranti, C., & Blašković, A. (2018). Microplastic contents from maricultured and natural mussels. *Marine Pollution Bulletin*, 131, 248–251. <https://doi.org/10.1016/J.MARPOLBUL.2018.04.035>
- [10] de Witte, B., Devriese, L., Bekaert, K., Hoffman, S., Vandermeersch, G., Cooreman, K., & Robbens, J. (2014). Quality assessment of the blue mussel (*Mytilus edulis*): Comparison between commercial and wild types. *Marine Pollution Bulletin*, 85(1), 146–155. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2014.06.006>
- [11] Ward, J. E., Zhao, S., Holohan, B. A., Mladinich, K. M., Griffin, T. W., Wozniak, J., & Shumway, S. E. (2019). Selective Ingestion and Egestion of Plastic Particles by the Blue Mussel (*Mytilus edulis*) and Eastern Oyster (*Crassostrea virginica*): Implications for Using Bivalves as Bioindicators of Microplastic Pollution. *Environmental Science and Technology*, 53(15), 8776–8784. <https://doi.org/10.1021/acs.est.9b02073>
- [12] Li, J., Wang, Z., Rotchell, J. M., Shen, X., Li, Q., & Zhu, J. (2021). Where are we? Towards an understanding of the selective accumulation of microplastics in mussels. *Environmental Pollution*, 286, 117543. <https://doi.org/10.1016/J.ENVPOL.2021.117543>
- [13] Lacroix, C., Coquillé, V., Guyomarch, J., Auffret, M., & Moraga, D. (2014). A selection of reference genes and early-warning mRNA biomarkers for environmental monitoring using *Mytilus* spp. as sentinel species. *Marine Pollution Bulletin*, 86(1–2), 304–313. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2014.06.049>
- [14] Manduzio, H., Monsinjon, T., Galap, C., Leboulenger, F., & Rocher, B. (2004). Seasonal variations in antioxidant defences in blue mussels *Mytilus edulis* collected from a polluted area: Major contributions in gills of an inducible isoform of Cu/Zn-superoxide dismutase and of glutathione S-transferase. *Aquatic Toxicology*, 70(1), 83–93. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2004.07.003>
- [15] Zanette, J., Jenny, M. J., Goldstone, J. V., Parente, T., Woodin, B. R., Bainy, A. C. D., & Stegeman, J. J. (2013). Identification and expression of multiple CYP1-like and CYP3-like genes in the bivalve mollusk *Mytilus edulis*. *Aquatic Toxicology*, 128–129, 101–112. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2012.11.017>
- [16] Sokolova, I. M. (2009). Apoptosis in molluscan immune defense. *Invertebrate Survival Journal*, 6(1), 49–58.
- [17] Pinsino, A., Bergami, E., della Torre, C., Vannuccini, M. L., Addis, P., Secci, M., Dawson, K. A., Matranga, V., & Corsi, I. (2017). Amino-modified polystyrene nanoparticles affect signalling pathways of the sea urchin (*Paracentrotus lividus*) embryos. *Nanotoxicology*, 11(2), 201–209. <https://doi.org/10.1080/17435390.2017.1279360>
- [18] Gomes, T., Chora, S., Pereira, C. G., Cardoso, C., & Bebianno, M. J. (2014). Proteomic response of mussels *Mytilus galloprovincialis* exposed to CuO NPs and Cu²⁺: An exploratory biomarker discovery. *Aquatic Toxicology*, 155, 327–336. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2014.07.015>

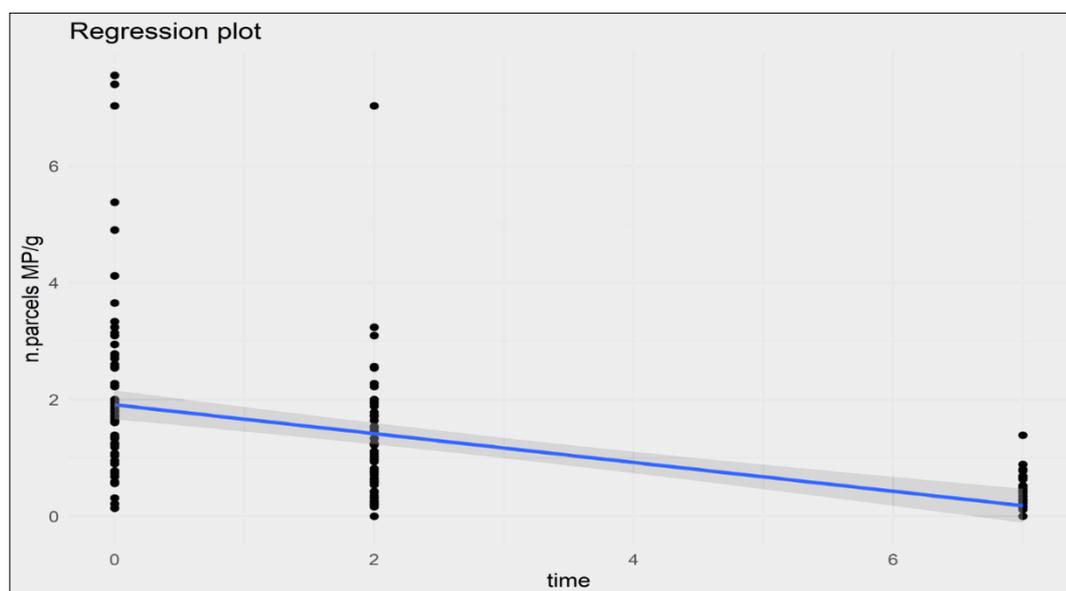


Grafico 1. Trend del “n. particelle MPs/g” rispetto ai tempi di depurazione (2 giorni e 7 giorni)

	Coefficienti	Errore standard	Stat t	Valore di significatività	Inferiore 95%	Superiore 95%
Intercetta	1,909	0,125	15,277	0,000	1,663	2,156
TEMPO	-0,247	0,030	-8,304	0,000	-0,306	-0,188

Tabella 1. Tabella dei coefficienti dell’analisi di regressione lineare per la verifica di una relazione lineare tra il “n. particelle MPs/g” e il “tempo espresso in giorni”

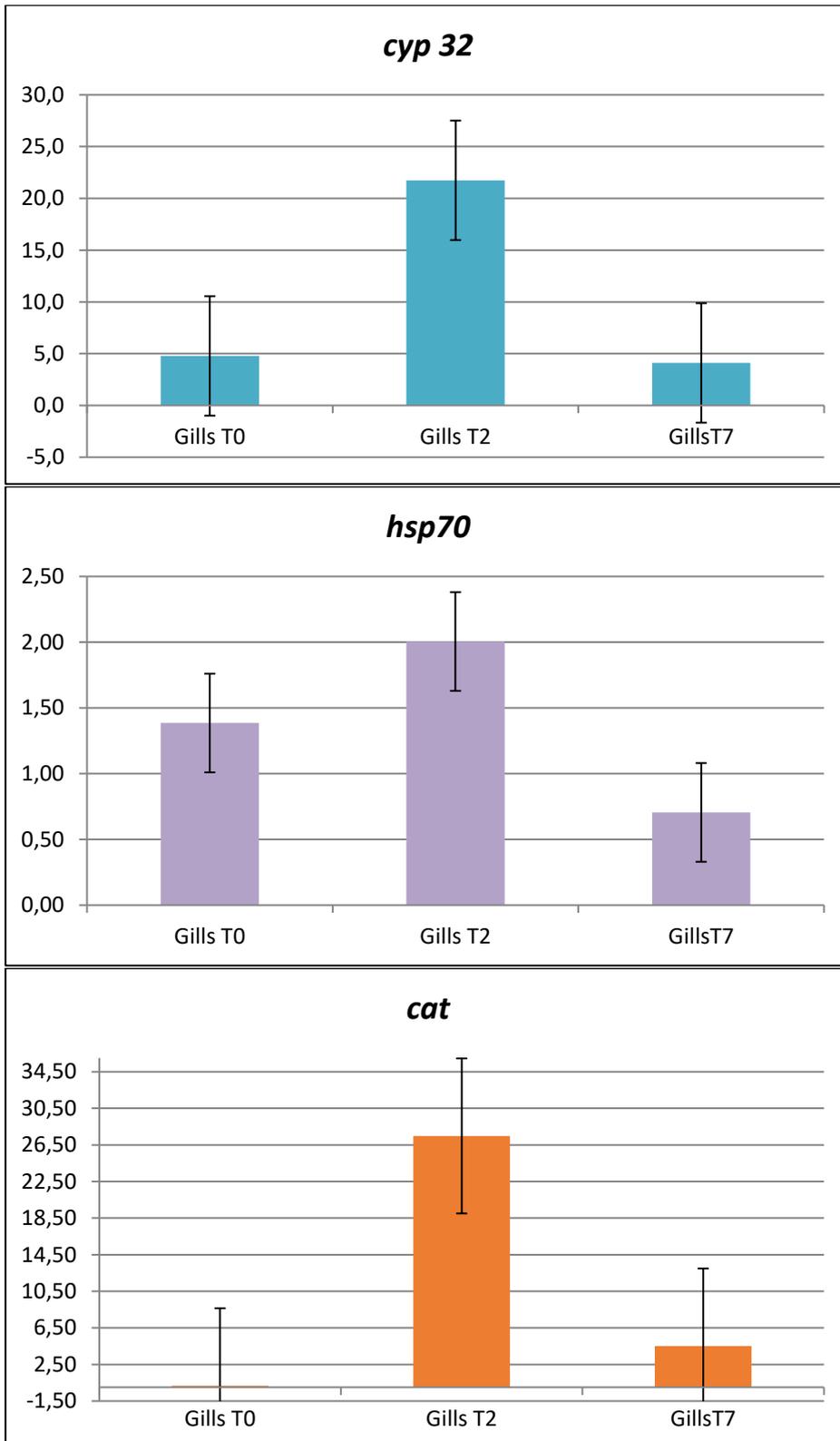


Figura 1. Espressione genica di alcuni biomarcatori molecolari nelle branchie di *Mytilus galloprovincialis* dopo 3 giorni di esposizione alle microplastiche (Gills T0); dopo 2 giorni di depurazione (Gills T2); e dopo 7 giorni di depurazione (Gills T7)

Trend temporali e geografici di acido Okadaico e Yessotossine nei mitili della costa marchigiana: il ruolo delle piogge come possibile strumento di previsione

M. Siracusa ^{1,2,4}, S. Bacchiocchi ^{1,2}, M. E. Giuliani ^{1,2}, E. Calandri ³, L. Ferroni ³, M. Ciriaci ^{1,2}, T. Tavoloni ^{1,2}, S. Gorbi ⁴, C. Maresca ³, F. Barchiesi ², A. Piersanti ^{1,2}

¹) Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche "Togo Rosati" - Via Cupa di Posatora 3, 60131 Ancona (AN)

²) Centro di Referenza Nazionale per il Controllo Microbiologico e Chimico dei Molluschi Bivalvi Vivi – Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche "Togo Rosati" - Via Cupa di Posatora 3, 60131 Ancona (AN)

³) Unità Operativa Semplice a Valenza Dipartimentale Osservatorio Epidemiologico- Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche "Togo Rosati" - Via Gaetano Salvemini 1, 06126 Perugia (PG)

⁴) Università Politecnica delle Marche - Dipartimento di Scienze della Vita e dell'Ambiente – Via Brecce Bianche, 60131 Ancona (AN)

Keywords: acido Okadaico, Yessotossine, LC-MS/MS, piogge, mitili

Introduzione

Le tossine lipofile sono biotossine marine prodotte da numerose specie di microalghe dinoflagellate, che possono accumularsi attraverso la catena trofica, rappresentando una minaccia per l'uomo e per la molluschicoltura. Comprendono tre sottogruppi di molecole regolamentate, [1] acido Okadaico e Dinofisitossine (AO e DTxs), Yessotossine (YTXs) e Azaspiracidi (AZAs). Il Mar Adriatico, una delle aree più eutrofiche del Mar Mediterraneo, ospita una fiorente attività di molluschicoltura, ma purtroppo, è spesso colpito da fioriture algali tossiche. Negli ultimi trent'anni si sono verificati numerosi episodi di contaminazione da tossine lipofile nei mitili con prevalenza di alternativamente di YTXs e AO [2-3]. Sebbene i controlli ufficiali effettuati per monitorare tale fenomeno [4], siano adeguati a salvaguardare la salute del consumatore, una previsione più efficace dell'evento tossico tutelerebbe maggiormente i produttori contenendo i danni economici. Alcuni studi hanno già dimostrato che variabili ambientali quali temperatura dell'acqua, salinità e piogge possono influenzare le fioriture algali e la conseguente produzione di tossine, quindi potrebbero essere utilizzate nella progettazione di modelli predittivi [5]. Lo scopo del lavoro è di descrivere gli andamenti temporali e geografici di 10 anni di monitoraggio (2012-2021) di AO e YTXs nei mitili della costa marchigiana e quindi di confrontarli con i trend spazio-temporali delle piogge, nello stesso periodo, nei bacini idrografici dei maggiori fiumi marchigiani. L'intento è di studiare l'influenza delle piogge sull'insorgenza e la severità degli eventi tossici nei mitili.

Summary

The northwestern Adriatic Sea, one of the most eutrophic areas of Mediterranean Sea, is highly exploited for mussel farming but periodically affected by Harmful Algal Bloom, threatening public health and shellfish industry. The Official Control addresses this issue with good results in safeguarding humans, but early warning instruments would be surely useful both, for control authority and producers. This work aimed to describe seasonal and geographic trends of a long term monitoring (ten years 2012-2021) of Okadaic acid (OA) and Yessotoxins (YTXs) in mussels from Marche coast. Moreover studies on the influence of rainfall on toxin contamination in mussels were conducted, to develop early warning systems. OA and YTXs were predominant in the mussel toxin profile of Marche coast, showing seasonal patterns and significant geographical differences. YTXs dominated the mussel toxin profile during the first three years of study, but then, since 2015, YTXs levels dropped significantly, leaving space to OA contamination events. OA contamination exhibited a cyclic nature, e.g., in 2015 toxic event was very intense, in 2016 the contamination was absent or very low. The observed changes in mussel toxin profiles, in the last ten years can be explained by both environmental and anthropogenic influences, responsible of the phytoplankton blooms. In the period of study, rainfall data of the Marche region showed a decreasing interannual trend, with the main downward shifts reported in the years most affected by OA contamination in mussels. This suggested a likely role of drought in leading OA toxic event. Instead for YTX, a link between the contamination and the rainfall seemed unlikely. The obtained results are promising, but further investigations are needed to be able to use rainfall monitoring in an early warning predicting system.

Materiali e Metodi

Nell'ambito dei piani di monitoraggio regionale sono stati raccolti almeno con frequenza quindicinale, nel decennio 2012-2021, più di 4500 campioni di mitili lungo l'intera costa marchigiana, suddivisa in 5 zone territoriali (da nord a sud). I campioni sono stati analizzati applicando il metodo ufficiale "EU-Harmonised Standard Operating Procedure for determination of Lipophilic marine biotoxins in molluscs by LC-MS/MS, 5th ed. January 2015" [6]. Gli andamenti temporali di contaminazione sono stati indagati mediante il calcolo di

medie mobili trimestrali e indici stagionali tipici. Per valutare eventuali differenze nei livelli di contaminazione tra aree diverse del litorale sono stati impiegati test non parametrici, corretti per confronti multipli, con una soglia di significatività $\alpha=0,05$. I dati di precipitazione espressi in mm di pioggia giornaliera cumulata nel periodo 2012-2021, sono stati forniti dal Centro Funzionale della Protezione Civile mediante sistema SIRMP online (<http://app.protezionecivile.marche.it>), dalle rilevazioni di 160 sensori pluviometrici distribuiti nei bacini idrografici (12 fiumi principali e relativi affluenti) che interessano le 5 aree territoriali della regione. L'elaborazione statistica è stata effettuata utilizzando il software Stata® 16.1.

Risultati e discussione

Nel decennio studiato AO e/o YTXs sono risultati predominanti nel profilo tossico dei mitili della costa marchigiana, come per altro già noto anche per altre aree del Mar Adriatico [2-3]. Gli eventi tossici hanno mostrato un marcato trend stagionale, con i livelli massimi di contaminazione registrati principalmente in autunno-inizio inverno e primavera-inizio estate. Tale andamento è coerente con la dinamica delle fioriture algali, caratterizzata da due picchi annuali proprio nelle stagioni descritte. Sebbene AO and YTXs si accumulino nei mitili negli stessi periodi, non si è mai verificata nei dieci anni considerati, la presenza simultanea di elevate concentrazioni per entrambe le tossine, anzi ai livelli massimi di un gruppo spesso corrispondevano livelli minimi per l'altro. Ciò probabilmente può essere dovuto ad una competizione per la predominanza nella composizione fitoplanctonica, essendo AO e YTXs prodotte da differenti specie di dinoflagellate. Per quanto riguarda l'andamento geografico, differenze significative sono state riscontrate tra le diverse aree della costa marchigiana per AO e YTXs ($p<0,001$), con livelli di concentrazione generalmente più alti nell'area più a nord della regione Marche. Le YTXs hanno dominato il profilo tossico dei mitili per i primi tre anni (2012-2014) raggiungendo il livello massimo di contaminazione di $6,87 \text{ mg YTX eq. kg}^{-1}$ a novembre 2014. Dal 2015 tali livelli sono diminuiti drasticamente e l'AO è diventato predominante nel profilo tossico dei mitili. Negli anni successivi le contaminazioni da AO hanno evidenziato un andamento irregolare, con anni, come il 2015 (massima concentrazione mai rilevata di $1373 \text{ } \mu\text{g AO eq. kg}^{-1}$), 2017, 2020, 2021 caratterizzati da svariati e significativi eventi tossici, ed anni, come 2016, 2018, 2019, meno colpiti dal fenomeno. Tale andamento può essere dovuto sia a fattori ambientali (cambiamenti climatici in atto) che antropogenici (immissione in mare di nutrienti) che influenzano le fioriture algali. I dati relativi alla pioggia hanno evidenziato un trend inter-annuale decrescente, con diminuzioni particolarmente marcate per gli anni più colpiti dagli eventi tossici per presenza di AO (2015, 2017, 2020, 2021). Oltretutto la primavera e l'estate, le stagioni che solitamente precedono i periodi di maggiore accumulo, sono le meno piovose, con un trend in diminuzione, negli anni. Ciò suggerisce un possibile nesso tra i periodi di siccità e il conseguente accumulo di AO nei mitili, che invece sembrerebbe non esserci per le YTXs. Dai risultati ottenuti possiamo quindi concludere, che le piogge potrebbero essere un valido parametro da considerare nello sviluppo di strumenti di preallerta, ma sicuramente maggiori approfondimenti debbono essere effettuati prima di poterle utilizzare nell'ambito di modelli predittivi utili alle autorità competenti e nella tutela della molluschicoltura.

Bibliografia

- [1] Regulation (EC). No. 853/2004 of the European Parliament and of the Council of 29 April 2004 laying down specific hygiene rules for food of animal origin. Official Journal of the European Communities, 2004, L226, 22–82.
- [2] Bacchiocchi, S., Siracusa, M.; Ruzzi, A.; Gorbi, S., Ercolessi, M., Cosentino, M.A., Ammazalorso, P.; Orletti, R. (2015) Two-year study of lipophilic marine toxin profile in mussels of the North-central Adriatic Sea: First report of azaspiracids in Mediterranean seafood. *Toxicon*, 108 (2015), 108, 115–125.
- [3] Schirone M., Berti M., Visciano P., Chiumiento F., Migliorati G., Tofalo R., Suzzi G., Di Giacinto F., Ferri N. (2018) Determination of Lipophilic Marine Biotoxins in Mussels Harvested from the Adriatic Sea by LC-MS/MS. *Frontiers in Microbiology*, 2018 9:152.
- [4] Regulation (EU) 2019/627 of 15 March 2019. Laying down Uniform Practical Arrangements for the Performance of Official Controls on Products of Animal Origin Intended for Human Consumption; EU: Brussels, Belgium, 2019; Volume L131, p. 51.
- [5] Patricio A., Lopes M. B., Costa P. R., Costa R. S., Henriques R., Vinga S. (2022) Time-Lagged Correlation Analysis of Shellfish Toxicity Reveals Predictive Links to Adjacent Areas, Species, and Environmental Conditions. *Toxins*, 14 (2022) 679.
- [6] EU-Harmonised Standard Operating Procedure for determination of Lipophilic marine biotoxins in molluscs by LC-MS/MS 5th ed., 2015. Available online: https://www.aesan.gob.es/en/CRLMB/web/public_documents/seccion/other_crlmb_standard_operating_procedures.htm

Presenza di tossine lipofile in molluschi bivalvi allevati e commercializzati nella Regione Sardegna dal 2016 al 2022

B.Soro¹, B. Vodret¹, G. Lorenzoni¹, A.G. Mudadu¹, R. Melillo¹, G. Piras¹, S. Salza¹, G. Chessa¹, S. Virgilio¹, S. Cau¹

¹Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sardegna, Via Duca degli Abruzzi 8, 07100 Sassari, Italy

Keywords: Biotossine algali, acido okadaico, molluschi bivalvi, Sardegna

Introduzione

La produzione di molluschi bivalvi in Sardegna rappresenta la principale attività di acquacoltura con rilevanti interessi economici e sociali, pertanto, l'accumulo delle biotossine marine nei molluschi provoca oltre che un rischio per la salute pubblica anche seri danni economici sia per i produttori che per l'intero indotto.

I controlli sanitari e ambientali sulla molluschicoltura sono definiti da una serie di norme comunitarie finalizzate alla tutela della salute dei consumatori. Il Reg. CE 853/04 [1] stabilisce che i molluschi bivalvi non devono contenere biotossine marine in quantità totali superiori ai seguenti limiti: PSP (*Paralytic Shellfish Poison*): 800 µg STX diHCl eq/kg; ASP (*Amnesic Shellfish Poison*): 20 mg/kg di acido domoico; acido okadaico, dinophysitossine complessivamente: 160 µg di equivalente acido okadaico/kg; yessotossine: 3,75 mg di equivalente yessotossine/kg; azaspiracidi: 160 µg di equivalente azaspiracido/kg.

L'Assessorato dell'Igiene e Sanità e dell'Assistenza Sociale della Regione Sardegna ha approvato il piano regionale di controllo ufficiale della produzione e commercializzazione dei molluschi bivalvi vivi [2], ciò al fine di garantire un'attività coordinata dei servizi veterinari nel settore della molluschicoltura e favorire l'applicazione uniforme dei regolamenti comunitari di igiene sul territorio della regione Sardegna.

Lo scopo del presente lavoro è quello di valutare i risultati del piano di monitoraggio per la presenza di tossine lipofile in molluschi bivalvi prelevati nella regione Sardegna nel periodo di tempo compreso tra il 2016 e il 2022 a seguito dell'adozione del metodo chimico LC-MS/MS. Tale metodo è stato riconosciuto dalla Commissione Europea, secondo il Reg. (CE) 15/2011[3], come test ufficiale per la ricerca di tossine marine lipofile.

Summary

The Sardinian production of mollusks plays an important economic role.

To minimize the risk of shellfish poisoning via the consumption of contaminated seafood, the European Union (EU) requires the member states to carry out official monitoring programs for biotoxins in mollusks.

According to Regulation (EC) No. 853/2004, bivalve mollusks must not contain marine biotoxins in total quantities that exceed the following limits: for paralytic shellfish poison (PSP), 800 micrograms of saxitoxin equivalents diHCl per kilogram; for amnesic shellfish poison (ASP), 20 milligrams of domoic acid per kilogram; for okadaic acid and dinophysistoxins together 160 micrograms of okadaic acid equivalents per kilogram; for yessotoxins, 3,75 milligrams of yessotoxin equivalent per kilogram and for azaspiracids, 160 micrograms of azaspiracid equivalents per kilogram.

The aim of this work is to evaluate the results of the monitoring plan for the presence of lipophilic toxins in bivalve mollusks collected in the Sardinia region in the period between 2016 and 2022 following the adoption of the chemical method LC-MS/MS, accredited according to the UNI CEI EN ISO/IEC 17025 standard.

Materiali e metodi

La Sardegna ha una superficie di 24000 km² con 1800 km di coste. Gli allevamenti di molluschi si trovano sia in acque marine che in quelle di transizione lungo la costa. Nel periodo compreso tra gennaio 2016 e dicembre 2022 sono stati analizzati più di 8000 campioni prelevati nelle diverse aree di raccolta della regione Sardegna dal personale dei Servizi Veterinari afferenti alle Aziende Sanitarie Locali (ASL), nell'ambito del piano regionale di controllo della produzione e della commercializzazione dei molluschi bivalvi.

Le tossine lipofile sono state determinate con il metodo chimico EU-RL LC-MS/MS accreditato secondo la norma UNI CEI EN ISO/IEC 17025.

Risultati e discussione

Nel periodo considerato sono stati sottoposti alla ricerca delle tossine lipofile un totale di 8300 campioni suddivisi nelle varie specie: 60% mitili (*Mytilus galloprovincialis*), 19% vongole (*Ruditapes decussatus*), 16% ostriche (*Crassostrea gigas*), 2% cuori di laguna (*Cerastoderma glaucum*) e tartufi (*Venus verrucosa*) e 1% cannolicchi (*Solen marginatus*). La distribuzione dei campioni analizzati annualmente è stata pressoché costante, ad eccezione dell'anno 2018 in cui si è registrata una riduzione pari al 4% rispetto alla media delle altre annualità (figura 1). Inoltre, nel corso degli anni, si è verificato un graduale cambiamento nella produzione delle specie di molluschi bivalvi, in particolare, si è avuta una notevole riduzione della specie mitile a favore di quella di ostriche e vongole (figura 2). Le determinazioni analitiche, eseguite sui campioni di molluschi bivalvi oggetto del presente lavoro, hanno evidenziato la presenza delle sole tossine lipofile appartenenti al gruppo

dell'acido okadaico (OA) con una concentrazione superiore al limite di quantificazione del metodo (LOQ) pari a 60 µg OA eq/kg p.e. Nel periodo di tempo considerato, si sono verificati complessivamente 86 episodi di non conformità (N/C) pari al 1% del totale dei campioni analizzati. In alcuni casi sono stati registrati contenuti di tossine con valori notevolmente superiori a 160 µg OA eq/kg p.e. in particolare, nell'anno 2020, si è avuta una N/C con un quantitativo di acido okadaico 24 volte superiore al limite di legge. Degli 86 episodi di N/C 35 erano primari e hanno riguardato principalmente le aree di competenza delle ASL 4, 5 e 8 (figura 3). La distribuzione su base annuale e mensile delle N/C per il gruppo OA è riportata nella figura 4. Si può osservare come esista una stagionalità delle N/C che riguarda principalmente i periodi invernali e primaverili [4]. Inoltre, l'andamento annuale delle N/C per specie di molluschi bivalvi, ha evidenziato che, nel periodo di tempo analizzato, c'è stata un'inversione di tendenza nelle N/C a favore delle vongole rispetto ai mitili (figura 5), passando dal 4% nel 2016 al 55% tra il 2018 e il 2019 per arrivare al 75% nel 2022.

Figura 1. Distribuzione annuale dei campioni

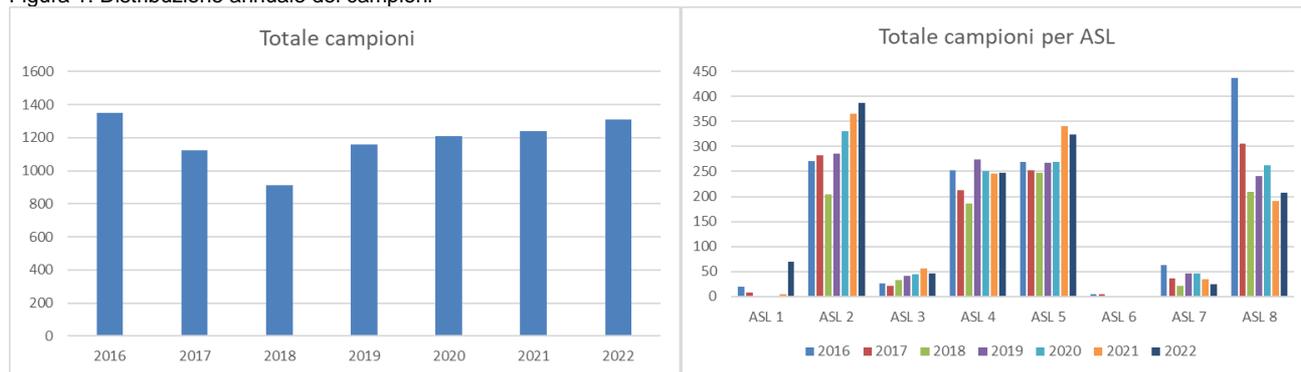


Figura 2. Distribuzione annuale delle specie di molluschi bivalvi analizzati

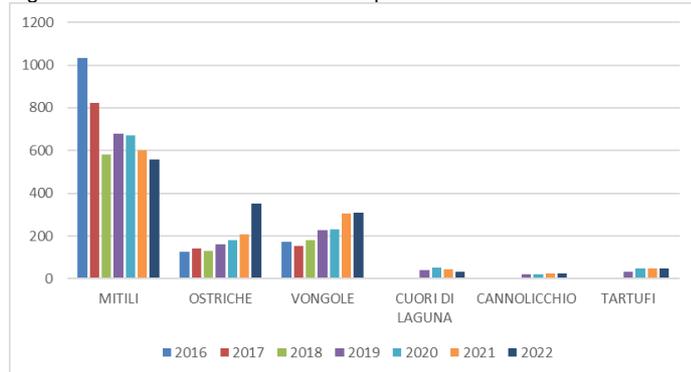


Figura 3. Presenza tossine lipofile appartenenti al gruppo dell'acido okadaico (OA) (> LOQ) dal 2016 al 2022

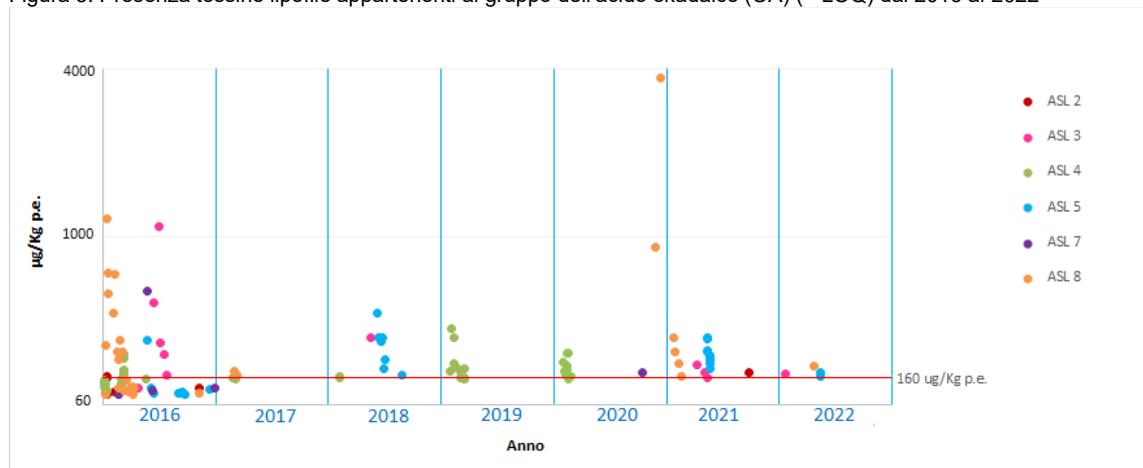


Figura 4. Distribuzione annuale e mensile delle N/C

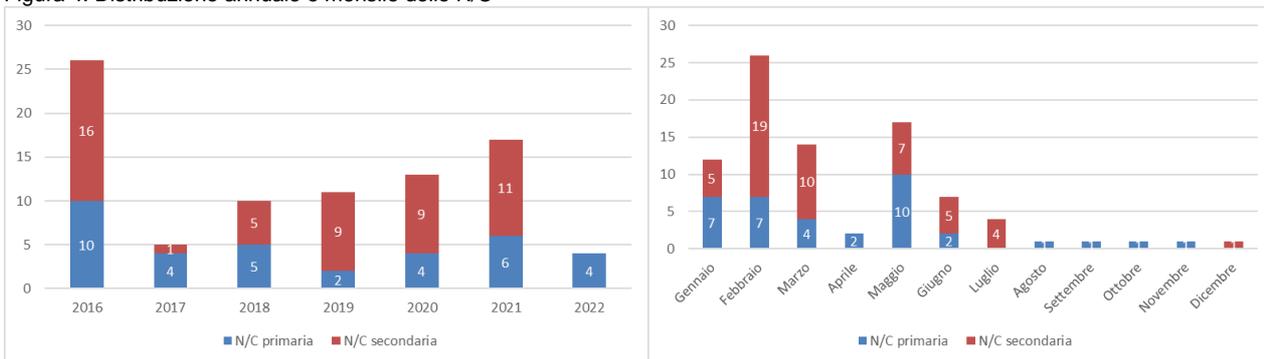
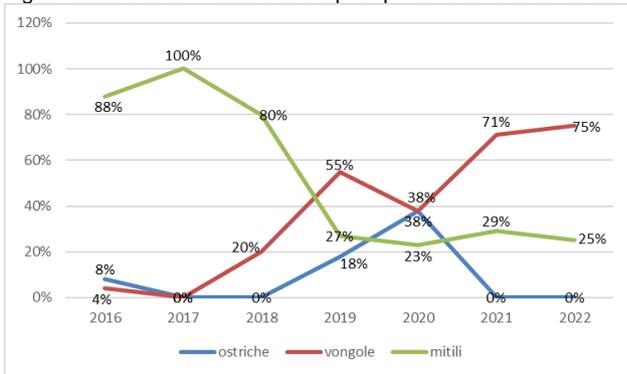


Figura 5. Andamento annuale N/C per specie di molluschi bivalvi



Bibliografia

- [1] Regulation (EC) No 853/2004 of the European Parliament and of the Council of 29 April 2004, Laying Down Specific Hygiene Rules for Food of Animal Origin. Available online: <http://data.europa.eu/eli/reg/2004/853/2023-02-15>
- [2] Piano regionale di controllo ufficiale della produzione e commercializzazione dei molluschi bivalvi vivi. Rev. 2016 e s.m.i.
- [3] Regulation (EC) No 15/2011 of 10 January 2011 amending Regulation (EC) No 2074/2005 as Regards Recognized Testing Methods for Detecting marine biotoxins in Live Bivalve Molluscs. Available online: <https://eurlex.europa.eu/eli/reg/2011/15/oj>.
- [4] Mudadu, A.G., Bazzoni, A.M., Congiu, V., Esposito, G., Cesarani, A., Melillo, R., Lorenzoni*, G., Cau, Soro, B., Vodret, B., Meloni, D., and Virgilio, S. 2021. Longitudinal Study on Seasonal Variation of Marine Biotoxins and Related Harmful Algae in Bivalve Mollusks Bred in Sardinia (Italy, W Mediterranean Sea) from 2015 to 2020 and Assessment of Potential Public Health Risks" J. Mar. Sci. Eng. 2021, 9, 510.

Fitoplancton potenzialmente tossico nelle mitilocolture del Golfo di Trieste: analisi preliminari della serie temporale in rapporto al contesto ambientale e climatico

L. Tondelli¹, O. Blasutto¹, N. Bettoso¹, A. Acquavita¹, C. Orlandi¹

¹) Agenzia Regionale per la Protezione dell'Ambiente del Friuli Venezia Giulia (ARPA-FVG), Via Cairoli 14, 33057, Palmanova, Italy

Keywords: Fitoplancton tossico, Mitilocolture, Golfo di Trieste, Cambiamento climatico, Serie temporale

Introduzione

Il presente studio analizza una serie temporale (dal 2001 al 2022) di abbondanze fitoplanctoniche relativa a campioni raccolti nel Golfo di Trieste focalizzandosi sul fitoplancton potenzialmente tossico. Quest'ultimo è rappresentato da microalghe particolarmente interessanti dal punto di vista sanitario ed ambientale poiché sono in grado di produrre tossine che si accumulano nei tessuti dei molluschi filtratori, come ad esempio i mitili, e causano intossicazioni alimentari. Le sindromi da intossicazione sono principalmente di tipo gastrointestinale e neurologico; le più diffuse sono la sindrome paralitica (PSP), amnesica (ASP) e diarroica (DSP): quest'ultima rappresenta la problematica più comune nel Mare Adriatico [1]. A scopo di prevenzione, l'Arpa FVG effettua, in collaborazione con l'Autorità sanitaria competente, la raccolta di campioni d'acqua in prossimità delle mitilocolture per ricercare la presenza di microalghe potenzialmente tossiche e, in caso di superamento di valori soglia, mette in atto un sistema di *early warning*, ovvero un'allerta precoce in caso di possibile tossicità dei mitili.

Per questo studio sono stati presi in considerazione diversi generi microalgali potenzialmente tossici (tra cui *Dinophysis*) e i dati di abbondanza fitoplanctonica sono stati messi in relazione ai principali parametri chimico-fisici e climatici, in particolare la piovosità. Quest'ultima è stata presa in esame in quanto precedenti studi hanno dimostrato una correlazione tra intense precipitazioni atmosferiche e un aumento dei valori di abbondanza fitoplanctonica [2], perciò rappresenta un parametro utile da approfondire per ottimizzare il sistema di allerta precoce nel settore della molluschicoltura.

Questo studio preliminare può costituire una base di partenza scientifica per ulteriori ricerche sulla relazione tra il fitoplancton tossico e contesto climatico nell'ambito delle mitilocolture al fine di una loro migliore gestione dal punto di vista sanitario e ambientale.

Summary

This study reports the analysis of a phytoplankton abundances time-series (from 2001 to 2022) in samples collected in the Gulf of Trieste focusing on potentially toxic species. These latter are represented by microalgae that are particularly interesting from a sanitary and environmental point of view. In fact, due to the potential synthesis of toxins that accumulates in tissues of filter feeders, such as mussels, they can cause food poisoning. The resulting syndromes are mainly of gastrointestinal and neurological types. The most common are paralytic syndrome (PSP), amnesic syndrome (ASP) and diarrheal syndrome (DSP), and the latter being the most common problem in the Adriatic Sea [1]. For prevention purposes, Arpa FVG in cooperation with the competent health authority, collected discrete water samples close to the mussels farming sites with the aim to detect the presence of potentially toxic microalgae: In case of exceeding of the threshold values an early warning system was promptly activated.

In this work, several potentially toxic microalgal genera (including *Dinophysis*) were considered and phytoplankton abundance was related to the main chemico-physical and climatic parameters, in particular rainfall. As reported in previous research, the intense atmospheric precipitation is often correlated to an increase in phytoplankton abundance [2], thus this is a useful parameter to be developed in order to optimize the early warning system in the shellfish activity.

This preliminary study can provide a scientific basis for further investigation on the relationship between toxic phytoplankton and climate change with the order to improve the safety and environmental management of this activity.

Materiali e metodi

Nel presente studio sono stati analizzati dati di abbondanza fitoplanctonica, relativa a quattro generi microalgali potenzialmente tossici, i dinoflagellati *Alexandrium* (produttore di tossine PSP), *Dinophysis* e *Lingulodinium* (produttori di tossine DSP) e la diatomea *Pseudo-nitzschia* (produttrice di tossine ASP), in 4 siti localizzati in prossimità delle mitilocolture del Golfo di Trieste. I campioni sono stati raccolti utilizzando tre

diverse tecniche di campionamento: bottiglia Niskin (2001-2005), retino da fitoplancton (2006-2014) e tubo campionario (2015-2022). Le analisi sono state condotte con il metodo di Utermöhl [3]. In totale il database di abbondanze fitoplanctoniche consisteva di 15.452 dati. In aggiunta sono stati presi in esame parametri chimico-fisici in colonna d'acqua (temperatura, salinità, clorofilla *a*, nutrienti) e la piovosità (pioggia cumulata decadale) come proxy meteorologico. Le analisi dei dati sono state focalizzate sulla diversità dei siti investigati, sull'analisi temporale e sulle correlazioni tra le abbondanze fitoplanctoniche e i parametri ambientali.

Risultati e discussione

L'analisi temporale dei parametri chimico-fisici in colonna d'acqua ha evidenziato un aumento significativo della temperatura media del mare, della salinità, del carico di azoto disciolto e una diminuzione del carico di fosforo totale, mentre per la clorofilla *a* non si è osservata una tendenza significativa [6]. Questi risultati sono paragonabili a quelli osservati in diversi ambienti marino-costieri del Mare Adriatico [4-6]. Inoltre, anche i generi microalgali potenzialmente tossici confermano gli andamenti stagionali già osservati in letteratura [7].

Analogamente a quanto già osservato le analisi temporali delle abbondanze cellulari non hanno evidenziato trend significativi di crescita o decrescita [8], ad eccezione del genere *Lingulodinium*, campionato con la tecnica del tubo, le cui abbondanze sono risultate in decrescita.

Una correlazione significativa è stata ottenuta tra la piovosità e il fosforo biodisponibile (laddove il campionamento sia stato effettuato con bottiglia Niskin) con le abbondanze dei generi *Dinophysis* e *Lingulodinium*. La correlazione con la piovosità potrebbe essere utilizzata per elaborare un sistema di allerta precoce per la molluschicoltura anche in funzione degli attuali cambiamenti climatici che influiscono sulla quantità e sul periodo delle precipitazioni.

La comparazione tra i tre metodi di campionamento ha evidenziato come la bottiglia Niskin sia adatta a verificare la correlazione tra la concentrazione dei nutrienti e le abbondanze fitoplanctoniche, mentre il campionamento con il tubo ben definisce in modo quali/quantitativo il popolamento fitoplanctonico.

In conclusione, questo studio preliminare condotto su una serie storica del fitoplancton potenzialmente tossico del Golfo di Trieste rappresenta una base di partenza. Questa sarà fondamentale per programmare ulteriori approfondimenti sulla dinamica delle popolazioni fitoplanctoniche in relazione al contesto climatico in evoluzione, e, per migliorare la gestione delle attività di mitilicoltura in chiave sanitaria ed ambientale. Tali obiettivi potrebbero apportare benefici agli stakeholders (mitilicoltori e popolazione) di questa importante attività economica ecosostenibile.

Bibliografia

- [1] Lassus P., Chomérat, N., Hess, P., & Nézan, E. (2016). Toxic and Harmful Microalgae of the World Ocean / Micro-algues toxiques et nuisibles de l'océan mondial. Denmark, International Society for the Study of Harmful Algae / Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO. IOC Manuals and Guides, 68. (Bilingual English/French).
- [2] Ninčević-Gladan, Ž., Matic, F., Arapov, J., Skejić, S., Bužančić, M., Bakrač, A., Straka, M., Dekneudt, Q., Grbec, B., Garber, R., & Nazlić, N. (2020). The relationship between toxic phytoplankton species occurrence and environmental and meteorological factors along the Eastern Adriatic coast. *Harmful Algae*, 92, 101745. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2020.101745>
- [3] UNI EN 15204:2006 "Water quality - Guidance standard on the enumeration of phytoplankton using inverted microscopy (Utermöhl technique)".
- [4] Malačić, V., Celio, M., Čermelj, B., Bussani, A., & Comici, C. (2006). Interannual evolution of seasonal thermohaline properties in the Gulf of Trieste (northern Adriatic) 1991–2003. *Journal of Geophysical Research*, 111(C8), C08009. <https://doi.org/10.1029/2005JC003267>
- [5] Giani, M., Djakovac, T., Degobbi, D., Cozzi, S., Solidoro, C., & Umani, S. F. (2012). Recent changes in the marine ecosystems of the northern Adriatic Sea. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 115, 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.ecss.2012.08.023>
- [6] Mozetič, P., Solidoro, C., Cossarini, G., Socal, G., Precali, R., Francé, J., Bianchi, F., De Vittor, C., Smodlaka, N., & Fonda Umani, S. (2010). Recent Trends Towards Oligotrophication of the Northern Adriatic: Evidence from Chlorophyll *a* Time Series. *Estuaries and Coasts*, 33(2), 362–375. <https://doi.org/10.1007/s12237-009-9191-7>
- [7] Francé, J., & Mozetič, P. (2006). Ecological characterization of toxic phytoplankton species (*Dinophysis* spp., *Dinophyceae*) in Slovenian mariculture areas (Gulf of Trieste, Adriatic Sea) and the implications for monitoring. *Marine Pollution Bulletin*, 52(11), 1504–1516. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2006.05.012>
- [8] Zingone, A., Escalera, L., Aligizaki, K., Fernández-Tejedor, M., Ismael, A., Montresor, M., Mozetič, P., Taş, S., & Totti, C. (2021). Toxic marine microalgae and noxious blooms in the Mediterranean Sea: A contribution to the Global HAB Status Report. *Harmful Algae*, 102, 101843. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2020.101843>

Piano di rilancio dell'ostricoltura nazionale: verifica dello stato di salute delle ostriche in diversi ambienti produttivi

F. Tosi¹, A. Vetri^{1,2}, L. Iacobucci¹, G. Arcangeli¹

¹Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, National Reference Center for Fish, Molluscs and Crustacean Diseases, Legnaro (PD)

²Dipartimento di Biomedicina Comparata ed Alimentazione, Università di Padova, Viale dell'Università 16, 35020, Legnaro (PD)

Keywords: ostricoltura, patogeni, indicatori di stress, fattori ambientali

Introduzione

La presente ricerca è inserita nelle progettualità delle azioni del PO FEAMP previste dall'articolo 47 del Regolamento (UE) n. 508/2014 recante "Innovazione", con la finalità di promuovere l'innovazione nel settore dell'acquacoltura. A partire dagli anni '60, in seguito a gravi eventi di mortalità che decimarono gli allevamenti di specie autoctone, fu introdotta per la prima volta in Europa una nuova specie di ostrica concava (*Crassostrea gigas*, Thunberg 1793) recentemente rinominata *Magallana gigas*. La prima introduzione avvenne lungo le coste francesi e, da subito, riscontrò un notevole apprezzamento da parte del consumatore. Oggi la maggior parte della produzione europea di ostriche è rappresentata da questa specie che ha di fatto "soppiantato" le autoctone *Ostrea edulis* e *Crassostrea angulata*, le quali già dalla prima metà degli anni '60 avevano subito gravi eventi di mortalità causati rispettivamente da protozoi (*Marteilia refringens* e *Bonamia ostreae*) e da virus ("gill virus"). Ad oggi, gli agenti patogeni maggiormente segnalati tra le cause di eventi di mortalità in *M. gigas* sono *Ostreid herpesvirus-1* μ var (*OsHV-1* μ var), *Vibrio aestuarianus* e, sempre più frequentemente, alcune specie di *Haplosporidia*. Altri patogeni, con impatti minori sulle produzioni, sono *Mikrocytos mackini*, *Vibrio splendidus* e alcuni *Iridovirus*. In base a questo stato epidemiologico presente in Europa, obiettivo della ricerca è stato quello di indagare la diffusione dei suddetti patogeni e di metazoi epifiti nei maggiori siti produttivi italiani.

Summary

This research is included in the planning of the "PO FEAMP" actions provided for in Article 47 of Regulation (EU) No. 508/2014 on "Innovation", with the aim of promoting innovation in the aquaculture sector. To date, the most commonly reported pathogens causing mortality events in *M. gigas* are *Ostreid herpesvirus-1* μ var (*OsHV-1* μ var), *Vibrio aestuarianus* and, increasingly, some *Haplosporidian* species. Less impactful pathogens for production are *Mikrocytos mackini*, *Vibrio splendidus* and some *Iridoviruses*. Based on this epidemiological status in Europe, the aim of the research was to investigate the spread of the pathogens and epiphytic metazoans in main Italian production sites. In order to assess the stress status of farmed oysters, immunohistochemical examinations were carried out using two different oxidative stress markers and the Condition Index was calculated.

Materiali e metodi

Sono stati individuati 6 siti produttivi in tutta Italia dove effettuare un campionamento in periodo invernale ed uno nel periodo estivo per un totale di 12 campionamenti costituiti ognuno da 30 esemplari di *Magallana gigas* di taglia commerciale (360 soggetti). Al fine di calcolare il Condition Index (CI), sugli animali campionati sono state effettuate le misurazioni morfometriche, quali lunghezza, massa totale e massa della carne dopo sgocciolamento su carta assorbente per 5 minuti (*Accord interprofessionel sul la dénomination et la classification des huitres creuses*, 2015). Il CI è stato ottenuto moltiplicando 100 volte il rapporto tra la quantità di carne di 20 ostriche post sgocciolamento (m1) e la massa totale delle medesime (m0) secondo la seguente equazione:

$$C.I. = m1 * 100 / m0$$

La ricerca dei principali patogeni è stata effettuata su tutti i soggetti campionati mediante analisi istologiche e molecolari. In particolare, per le analisi molecolari (prelievo pool di organi ed estrazione acidi nucleici) sono stati analizzati 360 esemplari nei quali è stata indagata la presenza di *Ostreid herpesvirus-1* (*OsHV-1*), *Vibrio aestuarianus* e *Vibrio splendidus* (clade) mediante rt-PCR (qualitativa) e qPCR (rt-PCR quantitativa) per un totale di 1080 analisi eseguite. Mediante analisi istologica è stata indagata la presenza di patogeni emergenti, tra i quali alcune specie di *Haplosporidia* e per valutare la maturazione gonadica. Al fine di valutare lo stato di stress presente negli animali delle ostriche allevate è stato effettuato un esame immunoistochimico mediante l'utilizzo di due marcatori di stress ossidativo, la malondialdeide (MDA) e la nitrotirosina (NT) su un totale di 60 soggetti.

Risultati e discussione

I risultati ottenuti dalla misurazione del CI per ciascun sito produttivo evidenziano migliori rese in termini di quantità di carne nelle ostriche allevate in laguna rispetto a quelle ingrassate a mare. L'allevamento con Condition Index più elevato infatti si è rivelato quello sito in Sacca di Scardovari (CI: 14,32 inverno e 15,19 estate) seguito da San Teodoro e La Spezia. Gli allevamenti di Cagnano Varano e Porto San Giorgio hanno presentato valori di CI intermedi, seguiti da Goro, che si è dimostrata l'area con valori i più bassi (CI: 9,34 inverno e 9,54 estate).

Ostreid herpesvirus-1: tutti i campioni analizzati nel corso della ricerca hanno dato esito negativo in tutti i siti campionati, a parte un esemplare su 30 ostriche risultato debolmente positivo nel campionamento invernale del sito delle lagune emiliane. Il risultato registrato conferma la presenza endemica del virus in questa area geografica, già comunque segnalata da rilevazioni effettuate in anni precedenti nella stessa area (Domeneghetti S et al., 2014). Dalla rilevazione del patogeno non sono stati riscontrati fenomeni di mortalità anomala nell'area considerata, in linea con la considerazione che le temperature invernali non rappresentano la condizione ideale per la sua diffusione e patogenesi.

Rilevante per il monitoraggio di OsHV-1 è stata l'identificazione di un episodio di mortalità di ostriche giovanili avvenuto a maggio 2023 presso il sito di Cagnano Varano, correlato positivamente alla presenza del virus in questa area geografica. Il sequenziamento ha confermato la variante OsHV-1 *μvar*, riconoscibile da una delezione di 12 nucleotidi upstream all'ORF4; l'interesse nella identificazione di questa variante deriva dalla sua maggiore virulenza rispetto a OsHV-1 (EFSA, 2010).

Vibrio aestuarianus: tutti i campioni analizzati nel corso della ricerca hanno dato esito negativo, fatta eccezione per due siti nel periodo invernale, nello specifico:

- 3 esemplari su 30 del sito di Goro che sono risultati debolmente positivi (non quantificabili)
- 6 esemplari su 30 del sito di Scardovari che sono risultati debolmente positivi (non quantificabili) ed 1 esemplare positivo quantificabile (2580 genomi equivalenti /μL)

Vibrio splendidus (clade): i valori di positività rilevati per tutti i siti di campionamento sono molto bassi e non correlati a fenomeni di mortalità. Nella maggior parte dei siti analizzati è stata rilevata la presenza di *V. splendidus*, tuttavia sempre con valori di quantificazione bassi, ascrivibili all'ampia diffusione in ambiente marino di questo batterio.

L'analisi istologica non ha rilevato la presenza di *Haplosporidium* spp. o altri patogeni emergenti in nessun soggetto. Tuttavia, si segnala la presenza di gonadi in avanzato o completo stato di maturazione nel campionamento estivo in tre lotti dichiarati triploidi. I 6 siti analizzati hanno evidenziato, con qualche eccezione, positività per la nitrotirosina (NT) mediamente elevate soprattutto nei mesi invernali. Le positività rilevate utilizzando la malondialdeide (MDA) sono state in generale più basse in tutti i siti e in generale non hanno dimostrato differenze significative tra i due momenti di campionamento.

Acknowledgments: Funding from the Italian Ministry of Agriculture through project PO-FEAMP 2014/2020 "Piano di rilancio dell'ostricoltura nazionale" - Misura 2.47 - 6/INA/19 CUP J79J19000250007. The authors are grateful to all partners of project for support and availability.

Bibliografia:

- [1] Destoumieux-Garzón D, Canesi L, Oyanedel D, Travers MA, Charrière GM, Pruzzo C, Vezzulli L. Environ Microbiol. 2020, Vibrio-bivalve interactions in health and disease, 22(10):4323-4341.
- [2] Domeneghetti S, Varotto L, Civettini M, Rosani U, Stauder M, Pretto T, Pezzati E, Arcangeli G, Turolla E, Pallavicini A, Venier P., 2014, Mortality occurrence and pathogen detection in *Crassostrea gigas* and *Mytilus galloprovincialis* close-growing in shallow waters (Goro lagoon, Italy), Fish Shellfish Immunol., 41(1):37-44
- [3] Pernet F., Barret J., Le Gall P., Corporeau C., Dégreumont L., Lagarde F., Pépin J.F., Keck N., 2012, Mass mortalities of Pacific oysters *Crassostrea gigas* reflect infectious diseases and vary with farming practices in the Mediterranean Thau lagoon, France, Aquacult Environ Interact, 2: 215–237;
- [4] Garnier M., Labreuche Y., Garcia C., Robert M., Nicolas J.L., 2007. Evidence for the involvement of pathogenic bacteria in summer mortalities of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. Microb Ecol; 53(2):187-96;
- [5] Rosani U, Varotto L, Domeneghetti S, Arcangeli G, Pallavicini A, Venier P. Dual analysis of host and pathogen transcriptomes in ostreid herpesvirus 1-positive *Crassostrea gigas*. Environ Microbiol. 2015 Nov; 17(11):4200-12. doi: 10.1111/1462-2920.12706. Epub 2014 Dec 17. PMID: 25384719.
- [6] Regolamento (UE) 2016/429 del Parlamento europeo e del Consiglio, del 9 marzo 2016, relativo alle malattie animali trasmissibili e che modifica e abroga taluni atti in materia di sanità animale
- [7] Regolamento di esecuzione (Ue) 2022/925 Della Commissione del 14 giugno 2022 che modifica l'allegato del regolamento di esecuzione (UE) 2018/1882 per quanto riguarda le malattie elencate degli animali acquatici e l'elenco di specie e gruppi di specie che comportano un notevole rischio di diffusione di tali malattie elencate

***Perkinsus olseni* associato a mortalità in mitili (*M. galloprovincialis*) allevati in Nord-Adriatico**

A. Vetri^{1,2}, E. Scrima^{1,2}, E. Agostini¹, L. Cortinovis¹, G. Arcangeli¹, T. Pretto¹

¹Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Legnaro (PD)

²Dipartimento di Biomedicina Comparata ed Alimentazione, Università di Padova, Viale dell'Università 16, 35020, Legnaro (PD)

Keywords: *Perkinsus olseni*, mitili, long-line, mortalità anomala

Introduzione

Tra i parassiti protozoi che colpiscono i molluschi bivalvi allevati in Laguna di Venezia *Perkinsus olseni* è senza dubbio la specie maggiormente segnalata. Il ciclo vitale di questo patogeno è diretto e può essere suddiviso in 3 stadi principali, tutti infettivi: trofozoita e ipnospora all'interno dell'ospite e zoospora in acqua. Tuttavia ad oggi, nonostante numerosi studi ne abbiano evidenziato la presenza in vongole veraci anche con gradi di infestazione molto elevati (Pretto *et al.*, 2014; Waki *et al.*, 2018; Estêvão *et al.*, 2023), questa specie non è mai stata segnalata in mitili in laguna di Venezia o off-shore nel mare antistante. La prima segnalazione di *P. olseni* in mitili (*M. chilensis*) allevati in Sudamerica è molto recente (Vázquez *et al.*, 2022), mentre solo quest'anno è stato segnalato in *M. galloprovincialis* nelle acque italiane meridionali e spagnole (Carella *et al.*, 2023). Negli ultimi anni, gli episodi di mortalità anomala che riguardano mitili dell'alto Adriatico sono sempre più numerosi e le cause molteplici: temperature elevate, carenza di fitoplancton e patogeni emergenti, tra i quali una nuova specie di *Haplosporidium* spp. mai segnalata in Italia (Vetri *et al.*, 2019). A partire da agosto 2023, un episodio di mortalità anomala ha interessato alcuni allevamenti situati al largo di Pellestrina (VE). Gli animali provenivano da seme raccolto e allevato *in loco*; il tasso di mortalità registrato era del 20% nel mese di luglio ed è arrivato al 70% ad agosto.

Summary

Perkinsus olseni is the most reported species among protozoan parasites affecting bivalves in the Venetian Lagoon. The life cycle of this pathogen is direct and it comprises three infectious stages: trophozoite and hypnospore within the host tissues and zoospore in the water column. However, despite the fact that numerous studies had highlighted the presence of *P. olseni* in Manila clams even with very high degrees of infestation, this species has never been reported in mussels farmed in the area. Observation of *P. olseni* in mussels (*M. galloprovincialis*) has been described in Mediterranean mussels (*M. galloprovincialis*) in Tyrrhenian Sea and Catalanian waters (Carella *et al.*, 2023). In recent years, outbreaks in mussels farmed in Northern Adriatic Sea are increasingly observed and the causes are various: high temperatures, phytoplankton deficiency and emerging pathogens including a new species of *Haplosporidium* sp. This study is the first report of *P. olseni* in mussels farmed in Northern Adriatic Sea during a mortality event.

Materiali e metodi

Un campionamento di mitili di taglia commerciale affetti da mortalità è stato effettuato a fine agosto 2023 dall'Autorità Competente (ULSS3 Serenissima, Chioggia), costituito da soli esemplari disvitali/morti. Presso l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie sono stati analizzati un totale di 25 soggetti. Di questi, 20 sono stati esaminati in parallelo con analisi citologiche, istologiche e molecolari. I preparati citologici sono stati effettuati su ghiandola digestiva, mentre gli istologici comprendevano i principali organi target (branchie, mantello, ghiandola digestiva, connettivo periviscerale). Le analisi molecolari per la quantificazione di *P. olseni* sono state eseguite mediante qPCR (Rios *et al.*) su omogenato di ghiandola digestiva e connettivo periviscerale. Infine, 5 soggetti sono stati sottoposti ad analisi batteriologiche a partire da omogenato di mantello, ghiandola digestiva e branchia (crescita in Marine Agar e TCBS) al fine di isolare e identificare i ceppi batterici potenzialmente patogeni.

Risultati e discussione

L'esame citologico della ghiandola digestiva ha evidenziato in alcuni soggetti (3/20) la presenza di protozoi riferibili al genere *Perkinsus*. L'esame istologico eseguito sugli stessi animali, ha confermato la diffusa presenza di *Perkinus* spp. in 2 soggetti nel tessuto connettivo periviscerale e più lieve in 3/20. L'analisi molecolare, effettuata mediante qPCR, ha permesso di rilevare *Perkinsus olseni* in 7/20 soggetti. Attraverso esame batteriologico sono state isolate diverse specie appartenenti al genere *Vibrio* non precedentemente descritte come causa di mortalità in mitilo: *V. harveyi*, *V. alginolyticus*, *V. chagasii* e *V. tubiashii*.

Questa è la prima segnalazione della presenza di *Perkinsus olseni* in mitili allevati in nord Adriatico, anche se già notificato in Tirreno (Campania) e nelle coste spagnole. Nonostante la prevalenza del 35% negli esemplari disvitali non è possibile attribuire con certezza la mortalità a *Perkinsus olseni*. È più probabile che il parassita rappresenti una concausa o un'aggravante a situazioni di forte stress degli animali allevati dovute a condizioni

ambientali sfavorevoli (temperature elevate, carenza di fitoplancton). Saranno dunque necessarie ulteriori indagini per accertare il ruolo del patogeno nelle sempre più frequenti morie segnalate dagli allevatori.

Bibliografia:

- [1] Carella F., Fernandez Tejedor M., Villari G., Andree KB, De Vico G., 2023. The endoparasite *Perkinsus olseni* affecting the Mediterranean mussels (*Mytilus galloprovincialis*) in the Italian and Spanish waters: A new possible threat for mussel aquaculture and wild animal population. *Front. Mar. Sci.*, 24, Sec. Marine Conservation and Sustainability. Volume 10 – 2023. <https://doi.org/10.3389/fmars.2023.1116837>;
- [2] Fernández-Boo S., Duarte C., Guévelou E., Sousa J., Freitas R., Joaquim S., Costas B., Magalhães L., Matias D., Cruz A., 2023. Effect of the alveolate parasite *Perkinsus olseni* infection on sexual maturation and spawning efficiency of the clam *Ruditapes decussatus*. *Parasitology*, 150(4), 321-328. <https://doi:10.1017/S0031182023000082>;
- [3] Pretto T., Zambon M., Civettini M., Caburlotto G., Boffo L., Rossetti E., Arcangeli G., 2014. Massive mortality in Manila clams (*Ruditapes philippinarum*) farmed in the Lagoon of Venice, caused by *Perkinsus olseni*. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.*, 34(2) – 2014;
- [4] Ríos R., Aranguren R., Gastaldelli M., Arcangeli G., Novoa B., Figueras A., 2020. Development and validation of a specific real-time PCR assay for the detection of the parasite *Perkinsus olseni*. *J Invertebr Pathol*;169:107301;
- [5] Vázquez N., Itoh N., Cremonte F., 2022. First record of *Perkinsus olseni* in cultured mussels (*Mytilus chilensis*) in the Beagle Channel, Southwestern Atlantic Ocean. *Aquaculture*, Volume 550 – 2022. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2022.737893>;
- [6] Vetri A., Fiocchi E., Gilebbi S., Prioli G., Arcangeli G., Pretto T., 2019. Aplosporidiosi in molluschi bivalvi: un evento di mortalità in mitili allevati in laguna veneta. VIII Convegno Nazionale SIRAM – 2019;
- [7] Waki T., Takahashi M., Eki T., Hiasa M., Umeda K., Karakawa N., Yoshinaga T., 2018. Impact of *Perkinsus olseni* infection on a wild population of Manila clam *Ruditapes philippinarum* in Ariake Bay, Japan. *Journal of Invertebrate Pathology*, Volume 153 – 2018. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2018.03.001>.

RELAZIONI A INVITO

Emergenza granchio blu: indagini ISPRA-ARPAV in aree di venericoltura del Polesine

*S. Chiesa*¹, *T. Petochi*¹, *R. Boscolo Brusà*², *S. Raicevich*², *F. Cacciatore*², *G. Franceschini*², *C. Antonini*², *C. Vallini*², *V. Bernarello*², *F. Oselladore*², *M. Ciani*¹, *L. Di Blasio*¹, *M. Campolunghi*¹, *F. Baldessin*³, *L. Boldrin*⁴, *G. Marino*¹

- 1) Istituto Superiore per la Protezione e la Ricerca Ambientale (ISPRA) – Roma
- 2) Istituto Superiore per la Protezione e la Ricerca Ambientale (ISPRA) – Chioggia (VE)
- 3) ARPAV-Dipartimento Regionale Qualità Ambiente - Unità Organizzativa Biologia Ambientale e Biodiversità- (Treviso)
- 4) ARPAV- Dipartimento Regionale Qualità Ambiente - Unità Organizzativa Monitoraggio Acque Marine e Lagunari- (Rovigo)

Il granchio blu *Callinectes sapidus* Rathbun, 1896 (famiglia Portunidae) è una specie originaria dell'Atlantico occidentale e distribuito dalla Nuova Scozia (Canada) all'Argentina. Introdotto in Europa già ai primi del '900 attraverso le acque di zavorra, il granchio blu ha ampliato la sua distribuzione dalle coste atlantiche al Mediterraneo e al Mar Nero. E' una specie eurialina, diffusa negli estuari, negli ambienti marini e in grado di colonizzare anche ambienti totalmente dulcicoli durante il suo ciclo biologico. Il granchio blu è onnivoro, in grado di nutrirsi di invertebrati (spt. molluschi bivalvi), pesci, detriti e macrofite. A seguito dell'esplosione demografica osservata durante l'estate 2023 e delle gravi ripercussioni per la molluschicoltura, su richiesta della Regione Veneto e con il supporto del Consorzio Cooperative Pescatori del Polesine ISPRA e ARPAV hanno condotto due sopralluoghi congiunti nei mesi di luglio e ottobre 2023, localizzati nelle Sacche del Canarin e di Scardovari. I primi risultati indicano che gli ingenti quantitativi di granchio blu catturati a luglio con ostreghero sono diminuiti con l'avanzare dell'autunno. Nel campionamento di luglio sono state catturate numerose femmine ovigere con uova a diverso stadio di maturazione; viceversa, le stesse sono risultate sporadiche nel mese di ottobre, quando è stata invece riscontrata la presenza di giovanili di diverse taglie. Per quanto concerne le produzioni di vongola verace filippina, in entrambe le Sacche è stata riscontrata una elevata presenza di gusci vuoti, che in alcuni orti di ingrasso raggiunge oltre il 90% del campione, di cui parte con evidenti segni riconducibili alla predazione da granchio blu. Nelle aree di reclutamento naturale, già a luglio il prodotto seminale risultava quasi del tutto triturato, giustificando la scarsa presenza o assenza osservata nel campionamento di ottobre. Ulteriori indagini sono in corso al fine di approfondire la dinamica di popolazione del granchio blu e i relativi impatti sulla molluschicoltura e gli ecosistemi delle aree investigate.

Le attività WOAAH: panoramica sulle interazioni con la Molluschicoltura

M. Latini

World Organization for Animal Health, SRR Astana, Kazakhstan

Introduzione

L'Organizzazione Mondiale per la Salute Animale è l'autorità mondiale sulla salute degli animali. Fondata nel 1924 come Office International des Epizooties (OIE), nel maggio 2003 ha adottato il nome di World Organization for Animal Health (WOAH). Come organizzazione intergovernativa essa, insieme ai suoi membri, coordina le risposte globali alle emergenze sanitarie degli animali, la prevenzione delle malattie zoonotiche, promuove la salute e il benessere degli animali e favorisce un migliore accesso all'assistenza sanitaria degli animali. Gli standard prodotti dai comitati scientifici del WOAAH sono riconosciuti dal World Trade Organization (WTO) (1) per regolare gli scambi commerciali internazionali. Le attività del WOAAH ricoprono anche le malattie dei molluschi bivalvi e ne regolano quindi anche gli scambi commerciali. La presentazione valuta come le attività e i documenti prodotti dal WOAAH interagiscono con la produzione e la commercializzazione dei molluschi bivalvi in ambito internazionale.

Summary

the presentation highlights the WOAAH activities related to the production of bivalve molluscs. It follows a path of explicit understanding of the structure and functioning of the organization as well as its aims. The WOAAH activities are wrapped up in strategic and operational documents that are listed and explained. Activities under the Collaborating Centres and the Reference Laboratories are highlighted too. Materiali e Metodi Sono stati analizzati i documenti prodotti dal WOAAH e reperibili sul sito web della stessa organizzazione <https://www.woah.org/> e sono stati valutati i contenuti in merito alla loro ricaduta sulla molluschicoltura e sul commercio dei molluschi.

Risultati e Discussione

L'Organizzazione Mondiale per la Salute Animale (WOAH) consta di un ufficio centrale (Headquarter) a Parigi e di 13 uffici regionali o subregionali (Bruxelles, Mosca, Astana, Tokyo, Bangkok, Beirut, Abu Dhabi, Tunisi, Nairobi, Bamako, Gaborone, Panama, Buenos Aires). L'ufficio di Parigi consta di diversi dipartimenti tra cui quello degli Standard e quello dello Status. Il primo si occupa, tramite un apposito comitato, di scrivere gli standard per la commercializzazione di animali e di alcuni prodotti animali tra gli stati. Tali Standard devono comunque essere ratificati da tutti gli stati nell'Assemblea Generale che si riunisce annualmente. Il dipartimento Status, sempre attraverso un apposito comitato, si occupa di dichiarare uno stato libero o non libero dalle malattie elencate negli Standard Codes. Le informazioni sullo stato di salute di ogni stato per ogni malattia compaiono nel World Animal Health Information System (WAHIS) (2) il Sistema di raccolta dei dati WOAAH. È evidente da quanto esposto che seppure i molluschi bivalvi hanno un basso impatto sulle attività WOAAH, gli standard e i documenti strategici dell'Organizzazione possono avere un impatto, in qualche caso notevole, sulla produzione di molluschi bivalvi. Il fatto che gli stessi standard prendano in considerazione ben 7 malattie dei molluschi bivalvi e che su tali standard si possano costruire regolamenti di produzione e di commercializzazione, permette di evidenziare l'importanza che il WOAAH dà alla produzione di molluschi bivalvi. L'uso di tali standard facilita la lotta contro le malattie che falchiano la molluschicoltura e danno una piattaforma comune alla commercializzazione degli stessi. Il documento WOAAH che più di altri ha un impatto sulla molluschicoltura è sicuramente l'Aquatic Code (3). Documento nato nel 1995, ora presente online nella sua versione in inglese, francese e spagnolo mentre si sta lavorando per avere anche la versione in russo sul sottosito del WOAAH-Europe (<https://rreurope.woah.org/ru/>). Esso consta di 11 capitoli. I capitoli che più interessano la molluschicoltura sono quello sulla qualità dei servizi sanitari, dove si identificano gli standard che i servizi veterinari devono avere. Quello sulla prevenzione e il controllo delle malattie, che spazia dai principi di biosicurezza alla compartimentazione dei territori. Fino ai piani di emergenza in caso di focolai di malattie. Quello sulla regolamentazione degli scambi commerciali tra i paesi, non solo imponendo un certificato sanitario ma anche indicando quali sono i requisiti minimi perché tale certificato possa essere compilato e accettato tra le parti. Infine, essenziale, quello sulle singole malattie in cui per i molluschi bivalvi vengono prese in considerazione le infezioni da: *Abalone herpesvirus*, *Bonamia exitiosa*, *Bonamia ostreae*, *Marteilia refringens*, *Perkinsus marinus*, *Perkinsus olseni*, *Xenohalotus californiensis*. Per ogni malattia si chiariscono nello specifico le condizioni per il commercio internazionale e le azioni per considerare uno stato o una regione libera (free) dalla malattia. Il documento che ha dato un grande impulso alle attività del WOAAH in tutto il settore è stato il WOAAH Aquatic Animal Health Strategy 2021-2025 (4). Esso consta di 4 obiettivi principali tra cui quello più importante è quello sulla Capacity Building. Lo sviluppo della molluschicoltura, come di tutte le attività zootecniche, non può infatti prescindere da uno sviluppo dei servizi di controllo e supporto veterinario dei paesi. La situazione in molti paesi a medio o basso income non è sempre ottimale e se da un lato ciò impedisce un effettivo scambio commerciale con i paesi più avanzati dall'altro impedisce anche un supporto tecnico sanitario da parte delle istituzioni pubbliche agli allevatori e raccoglitori. Un documento che si lega

quindi alla capacity building è il Performance Veterinary Service (PVS) Aquatic Tool (5). Uno strumento che serve per la valutazione delle performance dei servizi sanitari in ambito acquatico. Tale strumento si applica tramite una missione di esperti nel settore nel paese richiedente. Un documento che a prima vista sembra avere meno impatto sulla molluschicoltura è il “One Health Joint Plan of Action” (6). Documento quadripartito (FAO, UNEP, WHO, WOAH) che si occupa di salute unica. Seppure esso si concentra sulle zoonosi ha alcuni obiettivi rivolti all’integrazione delle azioni con impatto ambientale con ricadute sulle attività riguardanti i molluschi bivalvi. Tali obiettivi sono il “Promuovere la consapevolezza, i cambiamenti delle politiche e il coordinamento delle azioni tra le parti interessate per garantire che gli esseri umani, gli animali e gli ecosistemi raggiungano uno stato di salute - e rimangano in quello stato – in funzione di ogni interazione lungo la filiera alimentare” e il “Proteggere e ripristinare la biodiversità, prevenire il degrado degli ecosistemi per sostenere la salute di persone, animali, piante ed ecosistemi e mettere le basi per uno sviluppo sostenibile”. Anche se l’antibiotico resistenza non è un argomento direttamente correlato con la molluschicoltura va ricordato che sempre più spesso ci sono progetti su questo argomento che prevedono anche l’ambiente marino e i molluschi bivalvi come indicatori iniziano a essere ovunque considerati. In ogni documento citato ci sono capitoli riservati sull’antibioticoresistenza.

Bibliografia

- [1] <https://docs.wto.org/dol2fe/Pages/SS/directdoc.aspx?filename=q:/WT/L/272.pdf&Open=True>
- [2] <https://wahis.woah.org/#/home>
- [3] <https://www.woah.org/en/what-we-do/standards/codes-and-manuals/aquatic-code-online-access/>
- [4] <https://www.woah.org/app/uploads/2021/05/en-oie-aahs.pdf>
- [5] <https://www.woah.org/app/uploads/2021/12/pvstoolaquatic2021-fnl.pdf>
- [6] <https://www.woah.org/app/uploads/2022/04/one-health-joint-plan-of-action-final.pdf>

Molluschi bivalvi sentinelle di antibiotico resistenza

F. Leoni

Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche "Togo Rosati"

La resistenza antimicrobica è una delle dieci minacce globali per la salute pubblica che l'umanità deve affrontare [1], un fenomeno complesso che richiede un approccio multidisciplinare "One Health". I molluschi bivalvi sono animali che, per le loro caratteristiche, rappresentano dei bioindicatori dell'ambiente in cui vivono. La relazione presenterà quanto emerso nell'ambito del progetto "ASK network for antimicrobial resistance in seafood as common ground for knowledge exchange" [2]. Verranno presentati i risultati di un lavoro di revisione sistematica e meta-analisi sulla prevalenza della resistenza agli antibiotici in batteri isolati dai molluschi bivalvi, prelevati dall'ambiente, dalla produzione primaria o dalla vendita al dettaglio, inerenti alla resistenza antimicrobica in isolati batterici dell'indicatore di contaminazione fecale *Escherichia coli* [3]. Verranno inoltre presentati i risultati di altri studi sulla resistenza antimicrobica in *E. coli* isolati da molluschi bivalvi.

- [1] WHO. (2021) Global antimicrobial resistance and use surveillance system (GLASS) report 2021, World Health Organization. Available at: <http://www.who.int/glass/resources/publications/early-implementation-report-2020/en/>.
- [2] BRISABOIS Anne, et al. (2019). ASK network for antimicrobial resistance in seafood as common ground for knowledge exchange. <https://doi.org/10.5281/zenodo.3592267>
- [3] Albini, E., Orso, M., Cozzolino, F., Sacchini, L., Leoni, F., and Magistrali, C. F. (2022). A systematic review and meta-analysis on antimicrobial resistance in marine bivalves. *Front. Microbiol.* 13:1040568. doi: 10.3389/fmicb.2022.1040568.

Monitoraggio del fitoplancton potenzialmente tossico e accumulo di biotossine marine in molluschi bivalvi vivi allevati e commercializzati in Sardegna

G. Lorenzoni¹, B.Soro¹, S. Cau¹, I. Arras¹, S. Ledda¹, N. Bardino¹, A.M. Bazzoni², R. Melillo¹, R. Bazzardi¹, G. Piras¹, S. Salza¹, B. Vodret¹, G. Chessa¹, S. Virgilio¹, D. Meloni³, A.G. Mudadu¹

¹ Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sardegna - Sassari, Italy

² ARPAS-Agenzia regionale per la protezione dell'ambiente della Sardegna - Sassari, Italy

³ Università degli Studi di Sassari - Dipartimento di Medicina Veterinaria- Sassari, Italy

Keywords: Fitoplancton, Biotossine, Molluschi bivalvi, Sardegna

Introduzione

Il fitoplancton marino, i protisti fotosintetici e i procarioti che vivono lungo la colonna d'acqua sono i produttori primari degli ecosistemi acquatici, rappresentano la via attraverso la quale l'energia fluisce ai livelli trofici superiori, costituendo la base delle reti alimentari marine e sostenendo le risorse ittiche. Il fitoplancton costituisce negli ambienti acquatici l'equivalente della vegetazione terrestre, che rappresenta il supporto fondamentale per la vita degli animali, compreso l'uomo [1]. Nonostante la sua importanza ecologica, alcune specie di fitoplancton producono composti intracellulari tossici, le "biotossine". Queste tossine possono accumularsi attraverso la catena alimentare, in particolare attraverso gli organismi filtratori come i molluschi bivalvi capaci di filtrare l'acqua in cui vivono e trattenere tutto quello che essa contiene, fitoplancton di cui si nutrono ma anche batteri e virus [1]. La distribuzione dinamica, eterogenea e imprevedibile rende essenziale il monitoraggio diretto delle specie di fitoplancton che producono tossine, strumento indispensabile per la gestione dei rischi da biotossine nelle aree di produzione di molluschi bivalvi vivi [3]. Di conseguenza, per la protezione dei consumatori la legislazione dell'UE richiede che le aree di produzione e di stabulazione dei molluschi bivalvi vivi siano regolarmente monitorate per rilevare la presenza di plancton produttore di tossine nella colonna d'acqua e di biotossine algali nei molluschi bivalvi (Reg. UE 2019/627) [2].

In Sardegna è attualmente in vigore il "Piano regionale di controllo ufficiale sulla produzione e commercializzazione dei molluschi bivalvi vivi" Rev. 2016 e s.m.i. [4]. Le specie algali tossiche appartengono principalmente ai taxa delle Dinophyceae (Dinoflagellati) e delle Diatomeae. Tra le Dinophyceae si riscontrano soprattutto le specie appartenenti ai generi *Alexandrium*, *Dinophysis* e *Prorocentrum* e tra le Diatomeae il genere *Pseudo-nitzschia*.

Le biotossine possono essere suddivise in base alla loro solubilità in idrosolubili e liposolubili; in base al tipo di biointossicazione che determinano si distinguono la sindrome paralitica Paralytic shellfish poisoning (PSP), la sindrome amnesica Amnesic shellfish poisoning (ASP) e la sindrome diarroica Diarrhetic shellfish poisoning (DSP). Le tossine prese in considerazione dalla legislazione della UE in materia di sicurezza alimentare e di cui si effettua routinariamente la ricerca ai fini di sanità pubblica sono: il gruppo delle tossine PSP, le tossine ASP e le Tossine Lipofile (gruppo dell'Acido okadaico, (OA, DTX), Yessotossine (YTXs) e Azaspiracidi (AZA) [1].

Summary

Phytoplankton represent the fundamental life support in aquatic environments. Despite its ecological importance, some species produce toxic intracellular compounds, the so-called "biotoxins". These toxins can accumulate throughout the food chain, particularly in filter-feeding organisms such as bivalve molluscs, and, eventually, reach humans. In 2022, as part of the control activities of potentially toxic phytoplankton and algal biotoxins, different samples from the production, collection, and relaying areas of live bivalve molluscs located in Sardinia were analyzed in the laboratories of the Istituto Zooprofilattico of Sardinia.

Potentially toxic phytoplankton have been investigated in 937 water samples. In addition, 3,738 analyses were performed to determine the presence of algal biotoxins in shellfish samples: 1,228 for PSP toxins, 1,253 for ASP toxins, and 1,257 for lipophilic toxins (groups OA, DTX, YTX, PTX, and AZA). In 2022 the species belonging to the genus *Alexandrium*, potential producers of PSP toxins, determined the accumulation of PSP beyond the legal limit of 800 µg eq STX/kg edible portion (pe) (EU Reg. N. 853/2004) in a single sample collected in January in the Olbia area. The density values found for species belonging to the genera *Dinophysis* and *Prorocentrum* led to the accumulation of DSP-type toxins in concentrations exceeding the limit of 160 µg eq OA/kg pe (EU Reg. N. 853/2004), in the water areas of Oristano, Cagliari and Nuoro. The species belonging to the *Pseudo-nitzschia* genus have been found, even with high densities, in all months of the year and in all monitored water areas. However, no accumulation of ASP toxin in bivalve molluscs was pointed out. According to previous monitoring data, it seems that the blooms and accumulations in the various production sites of Sardinia follow a certain seasonality. Although not very distant from each other, the water areas where the shellfish farms are located, show peculiar characteristics. The results of the present study highlight that the control procedures must be continuous and constant and operationalized in real time.

Materiali e metodi

Nel corso dell'anno 2022 nell'ambito delle attività di controllo delle zone di produzione, raccolta e stabulazione dei molluschi bivalvi vivi della Sardegna, le attività di prelievo dei campioni di acqua di allevamento e di molluschi bivalvi sono state effettuate dai Servizi veterinari delle Aziende Sanitarie Locali (AASSLL) della Sardegna mentre l'attività analitica di ricerca fitoplancton e ricerca biotossine algali è stata effettuata dai Laboratori dell'IZS Sardegna. Sono stati analizzati dal Laboratorio Alimenti di Origine Animale n. 937 campioni di acqua marina per la ricerca di fitoplancton potenzialmente tossico seguendo la procedura operativa specificata nella Norma UNI EN 15204:2006 [1, 3]. Sono stati effettuati, presso il Laboratorio di Bromatologia, complessivamente n. 3.738 accertamenti analitici per la ricerca di biotossine algali in molluschi bivalvi, in particolare n. 1.228 per la ricerca di tossine del tipo PSP mediante analisi High Performance Liquid Chromatography (HPLC) [1, 3]; n. 1.253 per la ricerca di tossine del tipo ASP mediante analisi HPLC e n. 1.257 per la ricerca di Tossine Liposolubili (OAs, DTXs, YTXs, PTXs, AZAs) mediante analisi Liquid Chromatography-tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS) [1, 3].

Risultati e discussione

Nel corso del 2022, nelle acque di allevamento dei molluschi bivalvi della Sardegna, sono stati identificati complessivamente 8 taxa potenzialmente tossici, di cui 7 appartenenti alla classe delle Dinophyceae e 1 a quella delle Diatomeae. Tra le Dinophyceae, le determinazioni hanno portato al riconoscimento di 6 specie *Alexandrium minutum*, *Dinophysis acuminata*, *Dinophysis caudata*, *Dinophysis sacculus*, *Prorocentrum lima* e *Prorocentrum mexicanum*. Le Diatomeae o Baccillariophyceae sono state identificate fino al genere (*Pseudo-nitzschia* spp.). *Pseudo-nitzschia* spp. è un raggruppamento di specie algali molto simili tra loro e difficilmente distinguibili, per la loro identificazione si è giunti fino al livello di genere. Tra le Dinophyceae la specie algale maggiormente riscontrata, presente in tutte le zone acque monitorate della Sardegna, è stata la *D. acuminata*. Tra le Diatomeae, *Pseudo-nitzschia* spp. sono state osservate in prelievi provenienti da tutte le aree campionate senza tuttavia determinare, nei molluschi bivalvi, accumulo di ASP. A fronte della "eccezionale" densità algale della specie *A. minutum* (186.400 cell/L) riscontrata nella località "Su Petrosu", Stagno di Avalè (ASL di Nuoro), non si è verificato alcun accumulo di tossine del gruppo PSP nei molluschi bivalvi; l'episodio, anomalo per l'elevata concentrazione della specie algale e per la rapidità di comparsa e scomparsa, è stato l'unico ad essere stato riscontrato nel mese di luglio nelle acque marine sarde. Nel corso del 2022, la presenza di *A. minutum* specie produttrice di tossine PSP riscontrata nel Golfo di Cugnana p.1 (Olbia) nel mese di dicembre 2021 e proseguita nel mese di gennaio 2022, è stata responsabile dell'accumulo di tossine PSP, oltre il limite di legge di 800 µg eq STX/kg pe previsto dal Reg. CE 853/2004 [5], in un campione di mitili prelevato i primi giorni di gennaio. Nelle zone acque di Olbia, sebbene la presenza di *A. minutum* sia stata riscontrata anche nei siti Peschiera Padrongianus, Seno Cocchiani, Porto Pozzo e San Teodoro, non sono state rilevate tossine con valori superiori al limite di rilevabilità del metodo di screening (in HPLC) di 600 µg eq STX/kg pe.

A fine aprile 2022 la presenza di *D. acuminata* nelle zone acque di Oristano è stata responsabile dell'accumulo di OA, oltre il limite di legge di 160 µg eq OA/kg pe previsto dal Reg. CE 853/2004 [5], nei primi giorni di maggio, in 2 campioni di vongole provenienti rispettivamente dalle stazioni di Terza Peschiera p.2 Marceddi e Stagno di Corru S'Ilttiri p.1. Nel mese di gennaio, la presenza di *D. acuminata* nelle zone acque di Feraxi p.1 (Cagliari), ha sostenuto l'accumulo di tossine appartenenti al gruppo dell'OA, con valori superiori al limite di legge in 2 campioni di mitili. La contemporanea presenza di *D. acuminata* e *P. lima* nel mese di aprile ha sostenuto l'accumulo di tossine del gruppo dell'Acido okadaico, oltre il limite di legge, in un campione di mitili prelevato dalla stazione San Giovanni p.2. (Cagliari). L'accumulo di OA, oltre il limite di legge è stato riscontrato, inoltre, nel mese di gennaio in un campione di vongole prelevato nello Stagno di Avalè località Su Petrosu - Orosei (Nuoro). Sebbene i prelievi effettuati per il fitoplancton risultino essere in numero minore e non sempre effettuati contemporaneamente rispetto ai prelievi dei molluschi bivalvi, da un'osservazione generale emerge che la presenza delle alghe tossiche nel 2022, come del resto negli anni precedenti, è sempre risultata precedente e/o contemporanea all'accumulo di tossine nei molluschi bivalvi. Le fioriture e gli accumuli nei diversi siti produttivi della Sardegna seguono in genere una loro stagionalità. I risultati evidenziano una situazione di rischio sanitario da accumulo di tossine algali in diverse zone acque di allevamento di molluschi bivalvi della regione Sardegna e suggeriscono che le procedure di controllo debbano essere continue, costanti e rese operative in tempo reale.

Bibliografia

- [1] Lorenzoni, G., Bazzoni, A.M., Cangini, M., Dall'Ara, S., Melillo, R., Mudadu, * A.G., Cau, S., Soro, B., Ledda, S., Piras, G., Tedde, T., Salza, S., Arras, I., Porqueddu, G., Meloni, D. 2023. A Year of Bio-Monitoring (2021): Presence of Algae of the Genus *Alexandrium*, *Dinophysis*, *Prorocentrum* and Non-Compliance for Paralytic Toxins and Lipophilic Toxins in Bivalve Mollusks Bred in Sardinia (W Mediterranean Sea) J. Mar. Sci. Eng. 2023, 11, 11. <https://doi.org/10.3390/jmse11010011>
- [2] Monitoring of Toxin-producing Phytoplankton in Bivalve Mollusc Harvesting Areas. Guide to Good Practice: Technical Application UE novembre 2019 https://www.aesan.gob.es/en/CRLMB/web/public_documents/seccion/EURLMB_Guides.htm
- [3] Mudadu, A.G., Bazzoni, A.M., Congiu, V., Esposito, G., Cesarani, A., Melillo, R., Lorenzoni*, G., Cau, Soro, B., Vodret, B., Meloni, D., and Virgilio, S. 2021. Longitudinal Study on Seasonal Variation of Marine Biotoxins and Related Harmful Algae in Bivalve Mollusks Bred in Sardinia (Italy, W Mediterranean Sea) from 2015 to 2020 and Assessment of Potential Public Health Risks J. Mar. Sci. Eng.

2021, 9, 510.

- [4] Piano regionale di controllo ufficiale sulla produzione e commercializzazione dei molluschi bivalvi vivi. Rev. 2016 e s.m.i. <https://www.regione.sardegna.it/j/v/25?s=291638&v=2&c=1250&t=1>
- [5] Regolamento (CE) n. 853/2004 del Parlamento europeo e del Consiglio, del 29 aprile 2004, che stabilisce norme specifiche in materia di igiene per gli alimenti di origine animale <https://eur-lex.europa.eu/IT/legal-content/summary/hygiene-rules-for-food-of-animal>

Presente e futuro del miglioramento genetico applicato all'allevamento dei bivalvi: quali specie, quali caratteri, quali schemi di selezione?

M. Milan

Dipartimento di Biomedicina Comparata e Alimentazione, Università di Padova

Negli ultimi anni la molluschicoltura sta subendo con sempre maggior frequenza eventi di mortalità di massa, spesso associati al cambiamento climatico. I cambiamenti climatici (es. innalzamento delle temperature medie, ondate di calore, acidificazione degli oceani) possono infatti avere effetti diretti sulla fisiologia degli animali o indiretti favorendo la diffusione e proliferazione di patogeni. È pertanto urgente intraprendere misure volte a migliorare la resilienza dei molluschi a diverse fonti di stress ambientali. Tra i possibili interventi, il miglioramento genetico sta riscuotendo sempre maggior interesse nella molluschicoltura. In questo intervento verranno presentate le principali criticità in diverse specie bivalvi di interesse commerciale. Verranno quindi presentati i possibili schemi di selezione genetica volti al miglioramento degli stock, identificandone le principali criticità e i possibili vantaggi. Verrà infine illustrato un progetto volto allo studio dell'ereditabilità della resistenza alle ondate di calore e a infezione da *Perkinsus olseni* nella vongola filippina *Ruditapes philippinarum*.

L'allevamento della vongola verace “mediterranea” (*Ruditapes decussatus*) in ambiente controllato, un esempio di sinergia tra ricerca e aziende”

S. Murgia, S. Serra, M. Trentadue, N. Fois

AGRIS Sardegna, Servizio Ricerca per i Prodotti Ittici - Loc. Bonassai S.S. 291 Sassari-Fertilia - Km. 18,600 – Sassari
smurgia@agrisricerca.it

La Sardegna con circa 15000 ha di acque salmastre (stagni e lagune) è potenzialmente una delle regioni italiane maggiormente vocate per l'allevamento di molluschi bivalvi, in particolare la vongola verace mediterranea *Ruditapes decussatus*.

Fin dal 2010 l'Agenzia AGRIS ha avviato in sinergia con la Cooperativa pescatori di Tortolì e più recentemente (Progetto FLAG Sardegna Orientale) con alcune cooperative della costa orientale sarda un progetto per la riproduzione e successivo allevamento in ambienti controllati della specie suddetta.

Questo allo scopo di razionalizzare le produzioni, finora basate sulla esclusiva raccolta da banco naturale e contribuire alla conservazione della biodiversità.

In questo contesto, il progetto si propone di definire un modello di produzione che mira a valorizzare ulteriormente questi ambienti lagunari attraverso la raccolta di riproduttori selvatici locali di *R. decussatus* da diverse lagune della Sardegna, con l'attuazione di più cicli riproduttivi, tramite l'allevamento degli stadi larvali, post larvali e giovanili e seminando in ambiente naturale o controllato.

Il progetto contribuisce, quindi, al consolidamento e alla diversificazione delle tradizionali pratiche alieutiche già messe in atto nelle lagune, aumentando i livelli di occupazione e valorizzando la produzione di specie autoctone attraverso tecniche totalmente ecocompatibili.

Inoltre, alla luce della recente invasione degli ambienti salmastri italiani da parte del granchio blu *Callinectes sapidus*, specie alloctona che sta causando danni all'ambiente e al comparto dell'allevamento di molluschi, in particolare del genere *Ruditapes*, il progetto sviluppato dall'AGRIS e dalla Cooperativa Tortolì, che prevede tutte le fasi del ciclo di crescita in ambiente controllato, risulta importante sia per la difesa della biodiversità che per la salvaguardia della specie autoctona *R. decussatus*.

Implementazione dell'art. 111 del D.Lgs. 152/2006 sui criteri relativi al contenimento degli impatti sull'ambiente dell'acquacoltura e risvolti per la molluschicoltura

T. Petochi, M. Ciani, E. Ponis, G. Marino

Istituto Superiore per la Protezione e la Ricerca Ambientale (ISPRA)

Il Decreto Legislativo (D.Lgs.) 152/2006, Testo Unico Ambientale che recepisce la Direttiva Quadro sulle Acque 2000/60/CE, ha come obiettivo primario la promozione dei livelli di qualità della vita umana, da realizzare attraverso la salvaguardia ed il miglioramento delle condizioni dell'ambiente e l'utilizzazione accorta e razionale delle risorse naturali. In particolare, l'art. 111 del suddetto D.Lgs. dispone che *“Con decreto del Ministro dell'Ambiente e della tutela del territorio, di concerto con i Ministri delle politiche agricole e forestali, delle infrastrutture e dei trasporti e della attività produttive, e previa intesa con Conferenza permanente per i rapporti tra lo Stato, le regioni e le province autonome di Trento e di Bolzano, sono individuati i criteri relativi al contenimento dell'impatto sull'ambiente derivante dalle attività di acquacoltura e di piscicoltura”*. Sebbene siano passati diversi anni dall'entrata in vigore del D.Lgs., il Decreto Ministeriale (DM) per l'acquacoltura non è stato ancora implementato ma la Legge 17 maggio 2022 n. 60 “Salva Mare” ne prevede l'emanazione entro 6 mesi. A tal fine il Ministero della Sicurezza Energetica (MASE) ha definito un Gruppo di Lavoro interistituzionale con il Ministero dell'Agricoltura, della Sovranità Alimentare e delle Foreste (MASAF), il Ministero delle Infrastrutture e dei Trasporti (MIT), il Ministero delle Imprese e del Made in Italy (MIMIT), il Corpo delle Capitanerie di porto – Guardia costiera, l'Istituto Superiore per la Protezione e la Ricerca Ambientale (ISPRA) e l'Istituto Superiore di Sanità (ISS). Il testo del DM, in corso di valutazione dagli organismi preposti, è stato stilato tenendo conto degli orientamenti strategici per lo sviluppo sostenibile dell'acquacoltura dell'UE e delle attuali politiche di pianificazione spaziale, tutela della biodiversità, salute animale e sicurezza alimentare. Il DM contiene, oltre ai principi, finalità e definizioni, i criteri generali per la localizzazione degli impianti di acquacoltura e per la prevenzione e mitigazione dell'impatto delle attività di allevamento. Prevede alcune misure per il risparmio idrico e riutilizzo dell'acqua, il monitoraggio degli scarichi e delle emissioni degli impianti e la gestione dei residui delle attività. Un articolo del DM è dedicato inoltre alla tutela della biodiversità, ai fini di non arrecare danno a specie e habitat di interesse conservazionistico e ad azioni di ripopolamento per il ripristino di stock di specie minacciate. Alla definizione dei criteri per la localizzazione degli impianti ed al monitoraggio e controllo delle attività di acquacoltura e dei potenziali impatti sono dedicati specifici allegati tecnici per le acque costiere e marine, acque di transizione, acque di fiume e di lago.

Accumulo di acido okadaico nei mitili allevati. Quali i potenziali vantaggi di un modello predittivo per il rischio di bioaccumulo?

D. Pulcini¹, C. Casarotto², P. Fumelli³, M. Martinoli¹, T. Moranduzzo⁴, E. Rossetti⁵

¹ Consiglio per la Ricerca in Agricoltura e l'Analisi dell'Economia Agraria – Centro Zootecnia e Acquacoltura – Monterotondo (RM)

² Istituto Zooprofilattico Sperimentale Delle Venezie – Legnaro (PD)

³ Azienda ULSS 5 POLESANA – Rovigo (RO)

⁴ ColomboSky S.r.l – Roma (RM)

⁵ Consorzio Cooperative Pescatori del Polesine O.P. S.C.Ar.L. – Porto Tolle (RO)

Keywords: Dinoflagellati, *Dinophysis* spp., intelligenza artificiale, mitilicoltura, *Mytilus galloprovincialis*, telerilevamento

Introduzione

Le imprese di maricoltura dovranno affrontare nei prossimi anni le sfide imposte dal cambiamento climatico, con conseguenze sempre più serie sulla possibilità di garantire la disponibilità e la sicurezza alimentare dei prodotti ittici e la sostenibilità economica delle imprese stesse. Le fioriture di alghe tossiche sono in aumento nelle ultime decadi: emblematico il caso dei *bloom* di specie di dinoflagellati del genere *Dinophysis* in Alto Adriatico, al largo del delta del fiume Po, la cui frequenza ha subito un incremento causato dalla crescente eutrofizzazione delle acque costiere [1,2].

Le specie del genere *Dinophysis*, anche a basse densità (<100 cellule·l⁻¹), producono tossine diarroogene, tra cui l'acido okadaico (AO), che può causare una patologia gastrointestinale nota come *Diarrhetic Shellfish Poisoning* (DSP) [3]. Il mitilo mediterraneo (*Mytilus galloprovincialis* L. 1819), ingerendo grandi quantità di questi organismi, può accumulare la tossina nei tessuti e trasferirla all'uomo attraverso il consumo. Per questo motivo la Commissione Europea, al fine di proteggere la salute umana, impone un piano di monitoraggio settimanale delle aree costiere destinate alla produzione di molluschi bivalvi: concentrazioni di AO superiori al limite previsto dalla legge (160 µg·kg⁻¹ di AO equivalenti) impongono la sospensione immediata della raccolta nelle zone di produzione interessate e lo smaltimento del prodotto già raccolto, con notevoli perdite economiche a carico del produttore.

Per ridurre tali perdite ed ottimizzare l'uso delle risorse destinate ai piani di monitoraggio, risulta fondamentale lo sviluppo di sistemi di allerta precoce basati su algoritmi di intelligenza artificiale che, a partire da dati fisico-chimici raccolti da satellite o da essi derivati, permettano di prevedere il rischio di insorgenza di fenomeni di bioaccumulo di tossine nei molluschi. È stato questo l'obiettivo di uno studio recentemente pubblicato sulla rivista *Sustainability* [4], grazie al quale è stato messo a punto un modello previsionale per il rischio di bioaccumulo di AO nel mitilo mediterraneo allevato nelle aree costiere a largo del delta del Po basato su dati ambientali telerilevati e dati di bioaccumulo derivanti dalle attività ufficiali di monitoraggio.

Summary

In the next decades, mariculture farms will face challenges due to climate change, with severe effects on the availability and food security of farmed seafood. Over the last two decades, Harmful Algal Blooms (HABs) have increased in frequency, duration, and severity worldwide: in the Northern Adriatic Sea, in the area off the Po River Delta, *Dinophysis* spp. blooms have increased in frequency in the last years, due to coastal eutrophication [1,2].

Several *Dinophysis* species produce diarrhetic toxins (OA and dinophysistoxins), causing a gastrointestinal illness known as Diarrhetic Shellfish Poisoning (DSP), even at low cell densities (<100 cells·l⁻¹) [3].

The Mediterranean mussel (*Mytilus galloprovincialis* L. 1819) can ingest large quantities of these organisms, accumulating enough toxins to become acutely harmful to humans. To protect human health, the European Commission implemented mandatory monitoring of classified shellfish production areas on a weekly basis. Whenever the OA concentration in shellfish exceeds the established legal limit (equal to 160 µg·kg⁻¹ of OA equivalents), shellfish harvesting activities are compulsorily suspended and the product already collected is seized and dumped, causing severe economic losses for farmers.

To avoid such losses for farmers and to optimize the use of economic resources for monitoring programs, applied research on the development of early warning systems forecasting the risks of OA bioaccumulation in farmed mollusks should be prioritized.

A recent study published on *Sustainability* [4], developed a machine learning (ML) predictive model for OA bioaccumulation in farmed Mediterranean mussels in the coastal area off the Po River Delta based on oceanographic data measured through remote sensing and data derived from the official monitoring activities to predict the bioaccumulation of OA in farmed shellfish.

Materiali e metodi

I dati sulle concentrazioni di AO nei tessuti del mitilo mediterraneo allevato in 167 stazioni al largo del Delta del Po sono stati forniti dal Servizio Veterinario Az ULSS 5 Polesana (Reg. (CE) 627/19) per il periodo 2016-2020, per un totale di 1.486 osservazioni. Le concentrazioni di AO sono state misurate mediante cromatografia liquida/spettrometria di massa, in ottemperanza con quanto previsto dal Reg. (UE) N. 15/2011.

Sulla base del Reg. (CE) N. 853/2004, che stabilisce il limite legale di concentrazione di AO a $160 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$, sono stati classificati come positivi 74 campioni di mitilo. Al fine di disporre di un dataset più bilanciato, il numero di casi positivi nel dataset è stato incrementato classificando come positivi tutti i campioni con una concentrazione di AO superiore al limite di quantificazione del metodo analitico ($\text{LOQ} = 40 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ di AO eq.). Le osservazioni sono state classificate con sistema binario in: "1", positive ($\geq 40 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ di AO eq.), e "0", negative ($< 40 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ di AO eq.). Il dataset è stato ripartito in (1) dataset di *training* (1057 osservazioni, antecedenti al 2019, di cui 155 positive) e (2) dataset di *testing* (429 osservazioni, successive al 2019, di cui 89 positive).

Un totale di 15 parametri fisico-chimici ([Chl], contributo delle Dinofitee al totale della clorofilla, velocità delle componenti Est e Nord del vento, spessore dello strato di rimescolamento della colonna d'acqua, concentrazione di ammoniaca $[\text{NH}_4]$, nitriti $[\text{NO}_3]$, ossigeno disciolto $[\text{O}_2]$, fosfati $[\text{PO}_4]$, rapporto NO_3/PO_4 , precipitazioni giornaliere, salinità, temperatura superficiale dell'acqua, componenti Est e Nord della corrente, pressione superficiale del vento, radianza solare) sono stati registrati nei 45 giorni antecedenti ciascuna osservazione del dataset e, a partire da essi, sono stati calcolati medie, minimi, massimi, varianze, asimmetrie e curtosi settimanali. I valori dei parametri fisico-chimici sono stati ottenuti da satellite (<https://data.marine.copernicus.eu/products>, accesso 29 Marzo 2023) e ottimizzati per ottenere una risoluzione spaziale maggiore combinandoli con un modello oceanografico *ad hoc* (AQUAX, ColomboSky, Roma). Precipitazioni giornaliere e radianza solare sono state ottenute dal modello atmosferico di Copernicus (<https://atmosphere.copernicus.eu>, accesso 29 Marzo 2023).

Data la prevalenza di casi "0" nel dataset (83.6%), nella fase di training dell'algoritmo di Machine Learning (ML), i casi di classe "1" sono stati sovra-campionati (*Synthetic Minority Oversampling Technique*, SMOTE) [5]. Utilizzando il coefficiente di correlazione di Mathews, è stato selezionato l'algoritmo LightGBM [6], ottimale per ottenere le migliori performance previsionali.

I risultati sono stati rappresentati mediante una Matrice di Confusione, la cui precisione (*accuracy*, A) è stata calcolata secondo la seguente formula:

$$A = (\text{Veri Positivi} + \text{Veri Negativi}) / (\text{Veri Positivi} + \text{Veri Negativi} + \text{Falsi Positivi} + \text{Falsi Negativi})$$

Risultati e discussione

La maggior frequenza di casi positivi ("1") è stata registrata nel 2017 (N = 130) e nel 2019 (N = 54), mentre nel 2016 e nel 2018 è stato osservato un minor numero di casi "1", con concentrazioni di AO sempre compresi tra $40 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ e $160 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$. Nel 2020, per la prima volta, i casi positivi si sono registrati in tutte le stagioni dell'anno, e non limitatamente alla tarda estate e all'autunno, come comunemente osservato.

La precisione dell'algoritmo di classificazione per il dataset analizzato è risultata pari all'82%. I Falsi Negativi sono risultati associati a casi di classe "1" con $[\text{AO}] < 100 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$, mentre l'algoritmo ha classificato come Veri Positivi i casi con concentrazione media di tossine pari a $139 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$. Per la natura dei metodi analitici utilizzati per la misura della [AO], non è stato possibile analizzare in dettaglio i Falsi Positivi.

L'algoritmo utilizzato ha permesso di identificare le dieci variabili più significative per la predizione del rischio di bioaccumulo di AO nelle sei settimane antecedenti l'evento. Il parametro più rilevante è risultato il minimo di pressione superficiale del vento tre settimane prima dell'evento di accumulo, seguito dal valore minimo di $[\text{O}_2]$ sei settimane prima dell'evento. Sempre nella terza settimana antecedente l'evento, sono risultati molto influenti nel determinare l'accuratezza del modello il massimo della concentrazione di clorofilla e del rapporto nitrati/fosfati, il minimo della velocità della componente Est del vento e la varianza della temperatura superficiale.

Da interviste ai produttori, è emerso che le perdite di prodotto causate da fioriture abbondanti di dinofitee possono superare il 30% della produzione annua, con conseguenze economiche ed ambientali disastrose. Da stime condotte utilizzando un modello di *Life Cycle Assessment* (LCA) sviluppato appositamente [7] per una mitilicoltura nella stessa area geografica, la perdita del 30% del prodotto potrebbe causare un aumento dell'impronta carbonica del 50%.

Il modello predittivo sviluppato [4], opportunamente validato con un dataset più ampio, potrà essere integrato in strumenti gestionali di semplice utilizzo per i produttori, sempre più indispensabili per ridurre perdite e costi in un contesto di eventi meteo-marini imprevedibili.

Bibliografia

- [1] Sedmak, B., Fanuko, N. (1991). Occurrence of *Dinophysis* spp. and toxic shellfish in the Northern Adriatic. J. Appl. Phycol., 3, 289-294.
- [2] Pistocchi, R., Guerrini, F., Pezolesi, L., Riccardi, M., Vanucci, S., Ciminiello, P., Dell'Aversano, C., Forino, M., Fattorusso, E., Tartaglione, L., et al. (2021). Toxin Levels and Profiles in Microalgae from the North-Western Adriatic Sea - 15 Years of Studies on Cultured Species. Mar. Drugs, 10, 140-162.

- [3] Reguera, B., Riobó, P., Rodríguez, F., Díaz, P.A., Pizarro, G., Paz, B., Franco, J.M., Blanco, J. *Dinophysis* toxins: Causative organisms, distribution and fate in shellfish. *Mar. Drugs*, 12, 394-461.
- [4] Capoccioni, F., Bille, L., Colombo, F., Contiero, L., Martini, A., Mattia, C., Napolitano, R., Tonachella, N., Toson, M., Pulcini, D. (2023). Predictive model for the bioaccumulation of okadaic acid in *Mytilus galloprovincialis* farmed in the northern Adriatic Sea: a tool to reduce product losses and improve mussel farming sustainability. *Sustainability*, 15, 8608.
- [5] Chawla, N.V., Bowyer, K.W., Hall, L.O., Kegelmeyer, W.P. (2002). SMOTE: Synthetic Minority Over-sampling Technique. *JAIR*, 16, 321-357.
- [6] Yun, J., Guangyu, S., Quanche, C., Min, Z., Huixian, Z., Mujeeb, U.R. (2019). A model combining convolutional neural network and LightGBM algorithm for ultra-short-term wind power forecasting. *IEEE Access*, 7, 28309-28318.
- [7] Martini, A., Cali, M., Capoccioni, F., Martinoli, M., Pulcini, D., Buttazzoni, L., Moranduzzo, T., Pirlo, G. (2022). Environmental performance and shell formation-related carbon flows for mussel farming systems. *Sci. Total Environ.*, 831, 154891.

Risposta antivirale e ruolo delle proteine ADAR in molluschi bivalvi

P. Venier

Dipartimento di Biologia, Università degli Studi di Padova – Padova (PD)

Keywords: molluschi bivalvi, ostrica, Malacoherpesviridae, OsHV-1, risposta antivirale, dsRNA editing, ADAR1

Introduzione

I cambiamenti in corso nella biosfera stanno mettendo a rischio produzioni e sicurezza alimentari a livello globale [1]. Eventi climatici graduali o eccezionali, inquinamento, sovrasfruttamento di risorse alieutiche e altre attività umane possono ridurre significativamente le possibilità di vita di specie eduli e favorire nuove specie dominanti (metazoi invasivi, microparassiti, batteri o virus potenzialmente sovrachianti e infine *killer* di una o più specie bersaglio). La complessità dei processi biologici e la diversità di scala spazio-temporale in cui essi si compiono rendono difficile percepire, predire e governare le minacce immediate o future. Ecco perché lo sviluppo di un'acquacoltura sostenibile non dipende solo dalla concertazione entro il settore produttivo e da azioni di governo adeguate alle situazioni da affrontare ma anche da ricerche rigorose fondate in saperi multidisciplinari e tecnologie avanzate che generando nuovi dati accelerino la comprensione di ciò che avviene, offrano risposte anticipate alle sfide poste dall'ambiente che cambia e facciano cogliere nuove opportunità.

Le comunità dei microrganismi marini sostengono la vita nella biosfera e costituiscono una *maggioranza invisibile* estremamente diversificata e dinamica in spazio e tempo (in senso lato, un microbioma include non solo procarioti e microeucarioti quali funghi, alghe e protozoi ma anche virus, plasmidi, elementi genetici mobili e metaboliti, ossia piccole molecole implicate in processi anabolici e catabolici). In questa era di riscaldamento globale ci possiamo aspettare variazioni chimico-fisiche critiche (T°, salinità, O₂ disciolto, contaminanti, ecc.) e cambiamenti cruciali anche nel microbioma dei molluschi allevati. Un caso emblematico di lotta e co-evoluzione ospite-virus è quello dell'Ostreid Herpes Virus 1 (OsHV-1) segnalato nel 1991 in Francia in larve di *Crassostrea gigas* soggette a mortalità [2] e dal 2010 segnalato come OsHV-1 microvariante (μ var) nelle mortalità massive di *C. gigas* in varie regioni del mondo. Fra le tante proteine che definiscono la risposta antivirale, anche i molluschi posseggono enzimi chiamati *Adenosine Deaminase Acting on dsRNA (ADAR)* in grado di modificare RNA transitoriamente a doppia elica e, quindi, di alterare sequenza e funzionalità di RNA endogeni e di RNA virali abbondanti durante infezione [3]. **Nei molluschi bivalvi, l'enzima ADAR1 ha un ruolo pro- o anti-virale? Saperlo ci è utile? Quali spunti applicativi dalle conoscenze finora acquisite?**

Summary

Multiple changes occurring in the biosphere threaten food production and security globally. The complexity of biological processes at different space-time scale makes the perception of problems, their prediction and management more difficult. Multidisciplinary research rooted in advanced technologies can support mollusk aquaculture by filling major gaps in scientific understanding to address environmental challenges and seize new opportunities. In marine ecosystems, the invisible majority (microbiomes in a broad sense) is essential for macroscopic life, but current climate trends can induce critical changes and favor the emergence of old and new killers of marketable mollusks. In this context, the study of Ostreid Herpesvirus type 1 (OsHV1) during infection events has unveiled main features and actions of OsHV-1 and OsHV-1 μ vars as well as the counteractions of *Crassostrea gigas* and other mollusk hosts. Various evolutionary conserved proteins have a role in the antiviral host response: among them, *Adenosine deaminases acting on dsRNA (ADAR)* enzymes convert Adenosine to Inosine in double stranded RNA, a molecular change implying various effects on RNA structure, recognition, degradation and functioning. The knowledge achieved so far on mollusk viruses and molluscan ADARs can be used to improve aquaculture practices and genomic-selection breeding programs.

Materiali e metodi

I metodi utilizzati per tracciare specifiche modificazioni dell'RNA (*RNA editing*) e studiare la proteina ADAR1 in molluschi marini sono quelli della bioinformatica e della biologia molecolare (descritti in dettaglio in Bibliografia). I dati di sequenza ottenuti in molluschi naturalmente o sperimentalmente infettati da OsHV-1 sono stati depositati in database pubblici. Per esempio, l'identificativo GenBank KY271630 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/KY271630.1>) consente di visualizzare ed esportare il genoma completo del OsHV-1 μ Var B, la cui dimensione è stimata in 204897 coppie di basi.

Risultati e discussione

OsHV-1 e OsHV-1 μ var possono infettare diverse specie di molluschi con ampie differenze di mortalità indotta.

In progetti europei successivi (BIVALIFE FP7-266157, VIVALDI H2020-678589) e in collaborazione con IZSVE, UniGe e UniTS abbiamo fatto crescere ostriche concave (e mitili per confronto) da seme a giovanili

in un periodo stagionale critico in acque lagunari: la comparsa di mortalità massiva solo in *C. gigas* e l'analisi sistematica della presenza del DNA dell'OsHV-1 hanno permesso di studiare ulteriormente ostriche virus-positivite con titolo variabile di DNA virale (fino a 8.4×10^4 copie di DNA virale/ng DNA, 2012 e 2016, N=30) [4]. Coltivando in vivo un OsHV-1 isolato dall'area di P. Tolle (iniezione di ostriche sane con un omogenato chiarificato preparato da ostriche infette per nove cicli successivi) è stato possibile scegliere un campione ad alto titolo virale ($1,8 \times 10^8$ copie DNA virale/ μ l), controllarlo in microscopia elettronica e infine sequenziare il genoma di una **microvariante Adriatica** del virus (**OsHV-1-PT**). Il trascrittoma (l'insieme degli RNA cellulari) delle ostriche infette si è rivelato essere duale, composto da RNA di ostrica e di OsHV-1. Benché il ruolo di molte proteine dell'OsHV-1 rimanga sconosciuto, l'analisi degli mRNA virali ha individuato 82 diversi domini proteici virali tra cui quelli di varie proteine di membrana, della DNA polimerasi (ORF 100) e della proteina maggiore del capsido (ORF104). L'annotazione degli mRNA di **ostrica** ha invece indicato **sovraespressione di proteine stimulate da interferone** (nell'uomo tre classi di citochine modulando il sistema immunitario scatenano una risposta antivirale complessa, nei molluschi non c'è evidenza di interferoni), **proteine e peptidi dell'immunità innata** e anche una proteina denominata **Double-stranded RNA-specific adeno-deaminase**.

Le proteine ADAR sono enzimi evolutivamente conservati nei Metazoi (es. in uomo, pesci, molluschi cefalopodi e molluschi bivalvi). La modificazione dell'adenosina in siti specifici e aspecifici dell'RNA (*A to I editing* e *hyper-editing*) è importante nello sviluppo, nella regolazione delle funzioni neurali, per limitare l'autoimmunità e nella risposta immunitaria innata alle infezioni da virus, con effetti antivirali o provirali [3, 5]. Nel dettaglio, uno specifico trascritto ADAR1 è risultato sovraespresso nel trascrittoma di ostriche infettate da OsHV-1. Strategie avanzate di sequenziamento e di analisi del trascrittoma del bivalve a sangue rosso *Scapharca (Anadara) broughtonii* infettato con OsHV-1 hanno confermato la sovraespressione di geni ADAR (in particolare ADAR1) evidenziando anche un significativo *hyper-editing* degli RNA virali. A seconda delle interazioni molecolari che avvengono durante infezione, il virus potrebbe soccombere per disfunzionalità o sfuggire alle azioni difensive dell'ospite (es. minimizzando evolutivamente la quantità di basi Adenina editabili o consentendo l'*hyperediting* di zone funzionalmente non essenziali del genoma). Molte altre sono le proteine espresse da un mollusco in risposta all'infezione virale e la continua lotta per la sopravvivenza contribuisce alla storia evolutiva di una microspecie (il virus) e di una macrospecie (il mollusco). In conclusione, la collaborazione tra ricercatori, esperti, allevatori ed enti di riferimento ha portato a risultati importanti. Il sequenziamento del trascrittoma di bivalvi e gasteropodi infettati da virus della famiglia *Malacoherpesviridae* ci ha rivelato geni e proteine che potrebbero ostacolare la replicazione di forme aggressive di herpesvirus. Le conoscenze su questi virus e sui componenti della risposta antivirale offrono spunti per migliorare le pratiche di allevamento (modulazione della temperatura, *priming* della risposta antivirale, strategie per la selezione di bivalvi geneticamente meno suscettibili ad infezioni e mortalità). Competenze e strumentazioni ad oggi disponibili possono generare utili indicazioni anche sull'adattabilità di specie ai cambiamenti climatici in corso, sulla identità di origine, qualità alimentare e salubrità del prodotto che arriva al mercato e sulle strategie per combattere in modo sostenibile *killer* vecchi e nuovi dei molluschi eduli.

Bibliografia

- [1] Froehlich HE, Gentry RR, Halpern BS. (2018) **Global change in marine aquaculture production potential under climate change**. Nat Ecol Evol. 11:1745-1750; Kijewska A, Koroza A, Grudlewska-Buda K, Kijewski T, Wiktorczyk-Kapischke N, Zorena K, Skowron K. (2023) **Molluscs-A ticking microbial bomb**. Front Microbiol;13:1061223; Tomasetti SJ, Hallinan BD, Tettelbach ST, Volkenborn N, Doherty OW, Allam B, Gobler CJ. (2023) **Warming and hypoxia reduce the performance and survival of northern bay scallops (*Argopecten irradians irradians*) amid a fishery collapse**. Glob Chang Biol. 8:2092-2107. doi: 10.1111/gcb.16575; Mancinelli G, Chainho P, Cienti L, Falco S, Kapiris K, Katselis G, Ribeiro F. **The Atlantic blue crab *Callinectes sapidus* in southern European coastal waters: Distribution, impact and prospective invasion management strategies**. Mar Pollut Bull. 2017;119(1):5-11.
- [2] Renault T, Le Deuff RM, Cochenne N, Maffart P. (1994) **Herpesviruses associated with mortalities among Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, in France – comparative study**. Rev Med Vet.145:735–742; Renault T. (2011) **Viruses Infecting Marine Molluscs**. In: Hurst CJ. (Ed) Studies in Viral Ecology: Animal Host Systems. Wiley-Blackwell, pp. 153-155; Arzul I, Corbeil S, Morga B, Renault T. (2017) **Viruses infecting marine molluscs**. J Invertebr Pathol. 147:118-135.
- [3] Goncharov AO, Kliuchnikova AA, Nasaev SS, Moshkovskii SA. (2019) **RNA Editing by ADAR Adenosine Deaminases: From Molecular Plasticity of Neural Proteins to the Mechanisms of Human Cancer**. Biochemistry (Mosc). 84(8):896-904; Piontkivska et al (2021) **ADAR Editing in Viruses: An Evolutionary Force to Reckon with**. Genome Biol Evol. 13(11):evab240; Niescierowicz K, Prysycz L, Navarrete C, Tralle E, Sulej A, Abu Nahia K, Kasprzyk ME, Misztal K, Pateria A, Pakula A, Bochtler M, Winata C. (2022) **Adar-mediated A-to-I editing is required for embryonic patterning and innate immune response regulation in zebrafish**. Nat Commun. 13(1):5520.
- [4] Domeneghetti S, Varotto L, Civettini M, Rosani U, Stauder M, Pretto T, Pezzati E, Arcangeli G, Turolla E, Pallavicini A, Venier P. (2014) **Mortality occurrence and pathogen detection in *Crassostrea gigas* and *Mytilus galloprovincialis* close-growing in shallow waters (Goro lagoon, Italy)**. Fish Shellfish Immunol. 41(1):37-44; Rosani U, Varotto L, Domeneghetti S, Arcangeli G, Pallavicini A, Venier P. (2015) **Dual analysis of host and pathogen transcriptomes in ostreid herpesvirus 1-positive *Crassostrea gigas***. Environ Microbiol.17(11):4200-12; Rosani U, Young T, Bai CM, Alfaro AC, Venier P. (2019) **Dual Analysis of Virus-Host Interactions: The Case of Ostreid herpesvirus 1 and the Cupped Oyster *Crassostrea gigas***. Evol Bioinform Online.15:1176934319831305; Abbadi M, Zamperin G, Gastaldelli M, Pascoli F, Rosani U, Milani A, Schivo A, Rossetti E, Turolla E, Gennari L, Toffan A, Arcangeli G, Venier P. (2018) **Identification of a newly described OsHV-1 μ var from the North Adriatic Sea (Italy)**. J Gen Virol. 99(5):693-703;
- [5] Rosani U, Bai CM, Maso L, Shapiro M, Abbadi M, Domeneghetti S, Wang CM, Cendron L, MacCarthy T, Venier P. (2019) **A-to-I editing of Malacoherpesviridae RNAs supports the antiviral role of ADAR1 in mollusks**. BMC Evol Biol. 19(1):149; Bai CM, Rosani U, Zhang X, Xi, LS, Bortoletto E, Wegner KM, Wang CM. (2021). **Viral Decoys: The Only Two Herpesviruses Infecting**

Invertebrates Evolved Different Transcriptional Strategies to Deflect Post-Transcriptional Editing. *Viruses* 13, 1971; Rosani U, Bortoletto E, Montagnani C, Venier P. (2022) **ADAR-Editing during Ostreid Herpesvirus 1 Infection in *Crassostrea gigas*: Facts and Limitations.** *mSphere*. 7(2):e0001122.

INDICE PRIMO AUTORE

Asara G.	<i>Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sardegna, Sezione di Oristano</i>	13
Bertasi B.	<i>Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna – Brescia</i>	15
Bille L.	<i>Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie – Legnaro (PD)</i>	17
Bortoletto E.	<i>Università degli studi di Padova, Padova (PD)</i>	19
Casarotto C.	<i>Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie – Legnaro (PD)</i>	21
Chiesa S.	<i>Istituto Superiore per la Protezione e la Ricerca Ambientale (ISPRA) – Roma</i>	76
Ciccarelli C.	<i>ASUR Marche AV5 Ascoli Piceno – San Benedetto del Tronto</i>	23
Colasanto M.T.	<i>Istituto zooprofilattico Sperimentale delle Venezie - Legnaro (PD)</i>	28
De Marco A.	<i>Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie, Università di Bologna, Italia</i>	30
Di Renzo L.	<i>Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Abruzzo e del Molise –Teramo</i>	32
Di Taranto P.	<i>Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Puglia e della Basilicata – Foggia</i>	35
Francavilla M.	<i>STAR*Facility Centre, Department of Agriculture, Food, Natural Resources and Engineering (DAFNE), University of Foggia</i>	37
Franzago E.	<i>Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie – Legnaro (PD)</i>	39
Guarino L.	<i>Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Puglia e della Basilicata – Foggia</i>	42
Iacobucci L.	<i>Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, National Reference Center for Fish, Molluscs and Crustacean Diseases, Legnaro (PD)</i>	44
Lanci L.	<i>Facoltà di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Teramo</i>	47, 49
Latini M.	<i>World Organization for Animal Health, SRR Astana, Kazakhstan</i>	77
Latini S.	<i>Confcooperative FedAgripesca Sardegna - Cooperativa Pescatori Feraxi - Cooperativa Pescatori San Giovanni - CAP Sardegna</i>	51
Leoni F.	<i>Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche “Togo Rosati”</i>	79
Lorenzoni G.	<i>Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sardegna - Sassari, Italy</i>	80
Losasso C.	<i>Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie – Legnaro (PD)</i>	53
Malloggi C.	<i>Fishlab, Dipartimento di Scienze Veterinarie, Università di Pisa-</i>	55
Masotti C.	<i>Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta – Sezione di La Spezia</i>	58
		92

Milan M.	<i>Dipartimento di Biomedicina Comparata e Alimentazione, Università di Padova</i>	83
Murgia S.	<i>AGRIS Sardegna, Servizio Ricerca per i Prodotti Ittici</i>	84
Petochi T.	<i>Istituto Superiore per la Protezione e la Ricerca Ambientale (ISPRA)</i>	85
Pizzurro F.	<i>Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell’Abruzzo e Molise (IZSAM), Teramo (Italy)</i>	60
Pulcini D.	<i>Consiglio per la Ricerca in Agricoltura e l’Analisi dell’Economia Agraria – Centro Zootecnia e Acquacoltura – Monterotondo (RM)</i>	86
Siracusa M.	<i>Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell’Umbria e delle Marche “Togo Rosati”</i>	64
Soro B.	<i>Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sardegna</i>	66
Tondelli L.	<i>Agenzia Regionale per la Protezione dell’Ambiente del Friuli Venezia Giulia (ARPA-FVG)</i>	69
Tosi F.	<i>Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie – Legnaro (PD)</i>	71
Venier P.	<i>Dipartimento di Biologia, Università degli Studi di Padova</i>	89
Vetri A.	<i>Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie – Legnaro (PD)</i>	73

CONTATTI MAIL DEI RELATORI (primo autore)

Relazioni ad invito

Stefano Carboni (FONDAZIONE IMC) s.carboni@fondazioneimc.it

Stefania Chiesa (ISPRAMBIENTE) stefania.chiesa@isprambiente.it

Marco Gerdol (UNITS) mgerdol@units.it

Mario Latini (WOAH) m.latini@woah.org

Francesca Leoni (IZSUM) f.leoni@izsum.it

Pina Lorenzoni (IZS SARDEGNA) pina.lorenzoni@izs-sardegna.it

Massimo Milan (UNIPD) massimo.milan@unipd.it

Sonia Murgia (AGRIS SARDEGNA) smurgia@agrisricerca.it

Tommaso Petochi (ISPRAMBIENTE) tommaso.petochi@isprambiente.it

Domitilla Pulcini (CREA-ZA) domitilla.pulcini@crea.gov.it

Paola Venier (UNIPD) paola.venier@unipd.it

Poster selezionati per presentazione orale

Giovanna Asara (Veterinario Libero Professionista) giannaasara91@hotmail.it

Laura Bille (IZSve) lbille@izsvenezie.it

Enrico Bortoletto (UNIPD) enrico.bortoletto@studenti.unipd.it

Cesare Ciccarelli (Azienda Sanitaria Territoriale Ascoli Piceno) cesare.ciccarelli@sanita.marche.it

Antonina De Marco (UNIBO) antonina.demarco@unibo.it

Ludovica Di Renzo (IZSAM "G. Caporale") l.direnzo@izs.it

Susanna Latini (Confcooperative Sardegna) susanna.latini98@gmail.com

Chiara Malloggi - chiaramalloggi01@gmail.com

Chiara Masotti (IZS Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta) chiara.masotti@izsto.it

Melania Siracusa (IZS Umbria e Marche - Università Politecnica delle Marche) m.siracusa@izsum.it
- m.siracusa@pm.inivpm.it

Alessia Vetri (IZSve) avetri@izsvenezie.it

SIRAM

www.siram-molluschi

