

# XI Convegno SIRAM

Società Italiana di Ricerca Applicata alla Molluschicoltura

“Ricerca il cambiamento, verso un nuovo modello di molluschicoltura resiliente”

## Atti del Convegno

[www.siram-molluschi](http://www.siram-molluschi)



---

**Immagine in copertina:**

**Gli occhi di Cubia** Gli occhi a vivaci colori, sulla prua dei Trabaccoli e dei barchetti da pesca dell'Adriatico, rappresentano una tradizione che, dai tempi degli Egizi, Greci e Romani si è perpetuata nel bacino Mediterraneo e in altri mari fino ai giorni nostri. Con gli occhi la barca può seguire la rotta, rimediare alle incertezze della navigazione e schivare i pericoli.

# ATTI

## XI Convegno SIRAM

Società Italiana di Ricerca Applicata alla Molluschicoltura

Cattolica, 4-5 ottobre 2024

Sede: Casa del Pescatore- Via E. Toti 2, 47841 Cattolica RN

**“Ricerca il cambiamento, verso un nuovo modello di molluschicoltura resiliente”**

---

***Segreteria Scientifica Convegno:***

*Giuseppe Prioli - AMA,*

*Tommaso Petochi - ISPRA,*

*Laura Bille - IZSVe,*

*Manuela Dalla Pozza - IZSVe*

***Segreteria Organizzativa Convegno:***

*Alessandra Silvagni - IZSVe*

*Eleonora Franzago - IZSVe*

*Ester Schiavon - IZSVe*

*Simone Rizzo - 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



COMUNE DI CATTOLICA

# SPONSOR



# PROGRAMMA

# Programma

Venerdì 4 ottobre 2024

## MATTINA

10.00- 10.30            **Registrazione partecipanti**  
10.30- 10.45            **Apertura lavori Giuseppe Prioli**  
                                 **Saluti autorità**

**Chairman: Tommaso Petochi**

10.45- 12.45            **Comunicazioni scientifiche:** Relazioni orali selezionate (*10 minuti ciascuno*)  
12.45- 13.15            Discussione generale sulle relazioni del mattino

13.15- 14.00            *Light Lunch* + sessione poster

## POMERIGGIO

**Workshop “Prospettive per la ripresa del comparto della venericoltura”**

**Chairman: Giuseppe Prioli**

14.00- 14.20            **Edoardo Turolla** (Istituto Delta Ecologia Applicata SRL) – Stato dell’arte e previsioni sul comparto venericoltura.

14.20- 14.40            **Luca Bolognini** (CNR-IRBIM) – Lo studio del granchio blu nel bacino del Mediterraneo.

14.40- 15.00            **Giuseppe Castaldelli- Anna Gavioli** (UNI Ferrara) – Gli impatti del granchio blu atlantico, *Callinectes sapidus*, Rathbun, 1896, sulla produttività secondaria della Sacca di Goro, Delta del Po.

15.00- 15.30            *Coffee break*

15.30- 15.50            **Piergiorgio Fumelli- Dario Pandolfo** (Az. ULSS 3 e 5 Veneto) – Movimentazioni di *Ruditapes philippinarum* e rischi sanitari anche correlati alla situazione emergenziale.

15.50- 16.10            **Emanuele Rossetti – Thomas Turolla** (Consorzio Cooperative Pescatori del Polesine- Consorzio Con.1) – La voce del settore produttivo: evoluzione del fenomeno.

16.10- 16.30            **Tobia Pretto** (IZSVe) – Progetto di ricerca per la valorizzazione della specie alloctona invasiva *Callinectes sapidus* - Rathbun, 1896 (granchio nuotatore detto anche granchio blu) nelle aree marine costiere e di transizione del Nord Adriatico (problematiche di sanità animale e sicurezza alimentare).

16.30- 17.00            **Discussione generale sulle relazioni del pomeriggio**

17.00- 17.15            *Pausa*

17.15- 18.30            **Direttivo e Assemblea Soci**

20.30                    *Cena Sociale*



Sabato 5 ottobre 2024

MATTINA

### Workshop “Produzioni e ambiente”

Chairman: Paola Venier

- 09.00- 09.20        **Giuseppe Arcangeli** (IZSve) – MUSSEL-AID- Un approccio multidisciplinare per mitigare i danni causati dalle mortalità estive e dalle fioriture algali negli allevamenti di mitili (*M. galloprovincialis*) off-shore in Veneto: presentazione del progetto.
- 09.20- 09.40        **Giovanni Coppini** (CMCC- centro euro-mediterraneo sui cambiamenti climatici) – Cambiamenti climatici: ripercussioni per la molluschicoltura.
- 09.40- 10.00        **Francesca Carella** (UNINA) – Il declino della *Pinna Nobilis* nel bacino del Mar Mediterraneo.
- 10.00- 10.20        **Rossana Sussarellu** (IFREMER) – Fattori ambientali e impatti sui molluschi bivalvi: l'ostrica come specie modello.
- 10.20- 10.40        **Alessia Vetri** (IZSve) – Case study sulla mortalità di mitili avvenuta nel corso del 2023 nell'Adriatico.
- 10.40- 11.00        **Discussione della sessione**
- 11.00- 11.30        **Coffee break**

Chairman: Francesca Barchiesi

- 11.30- 11.50        **Marina Chiappi** (CNR-IRBIM) – È possibile trasformare un'invasione biologica in un'opportunità commerciale? Il caso di *Anadara* spp. nel Mar Adriatico.
- 11.50- 12.10        **Francesco Regoli** (Università Politecnica delle Marche) – Problematiche dei banchi naturali del mitilo marchigiano (mosciolo selvatico di Portonovo).
- 12.10- 12.30        **Barbara Mikac** (UNIBO) – Nuove specie aliene associate agli allevamenti di mitili ed ostriche nel Mediterraneo.
- 12.30- 12.50        **Tommaso Petochi** (ISPRA) – Ricostruzione di banchi naturali di ostrica piatta *Ostrea edulis* in Adriatico (progetto PNRR MER- Marine Ecosystem Restoration): la molluschicoltura a servizio dell'ambiente.
- 12.50- 13.10        **Ludovico Ferro** (UNIPD) – Ricerca sociale sul “lavoro in molluschicoltura”.
- 13.10- 13.30        **Discussione della sessione**
- 13.30                **Chiusura convegno**

# ABSTRACT PRESENTATI

- 1. Sistemi di Early Warning del rischio biotossicologico: valutazione comparata della loro efficienza ed efficacia**  
*A. Antonini, C. Ciccarelli*
- 2. Biotossine Marine nei mitili della costa Marchigiana: valutazione dell'analisi del fitoplancton come strumento previsionale degli eventi tossici**  
*S. Bacchiocchi, S. Accoroni, M. Siracusa, G. Diomedi, F. Neri, T. Romagnoli, C. Totti, S. Mazza, C. Cucchi, M. Cusumano, E. Calandri, F. Barchiesi, A. Piersanti*
- 3. Progetto BlueBoost: culture of a wide range of low trophic species to boost sustainable production of Blue Food and reduce environmental footprint**  
*G. Brundu, F. Capoccioni, A. Chindris, M. Corrias, C. Frongia, P. Graham, A. Martini, D. Pulcini, S. Carboni*
- 4. Valutazione dello stato della perkinsosi (*P. olsenii*) nel mitilo mediterraneo (*Mytilus galloprovincialis*) della Regione Campania**  
*F. Carella, L. Troise, L. D'Angelo, E. Di Lecce, G. Paduano, M. G. Lucibelli, F. Di Nocera*
- 5. Sistemi informativi innovativi per la visualizzazione dei dati sanitari delle zone di produzione dei molluschi bivalvi nella Regione Veneto**  
*C. Casarotto, M. Bassan, M. Trolese, E. Franzago, E. Schiavon, N. Ferrè, G. Manca, M. Dalla Pozza, G. Arcangeli, L. Bille*
- 6. Movimentazione Traces di *Mytilus galloprovincialis* dall'Area Parco Naturale del Monte San Bartolo al Golfo di Valencia: esperienza dell'AST PESARO URBINO**  
*E. Cordovani, A. M. Vecchio, S. Novelli, A. Massi*
- 7. Alteration in biometric and byssus performances in the mediterranean mussel, *mytilus galloprovincialis*, exposed to prolonged heat waves**  
*A. De Marco, V. A. Baldassarro, V. Burato, L. Calzà, L. Giardino, D. Montroni, G. Falini, L. Parma, A. Bonaldo*
- 8. Analisi dei sierotipi di *Salmonella* spp. isolata nelle aree di produzione dei molluschi bivalvi della Regione Marche: confronto con i sierotipi identificati nelle altre matrici alimentari e non**  
*C. De Simoni, C. Ciccarelli*
- 9. Analisi microbiologiche su campioni ufficiali di molluschi bivalvi e studio delle caratteristiche di antibiotico-resistenza degli isolate**

*P. Di Taranto, G. Normanno, G. Castelli, I. Ciuffreda, C. Pedarra, S. Faleo, A. Didonna, G. Occhiochiuso, L. D'Attoli, P. Selicato, V. Rondinone, L. Pace, D. Galante, V. Manzulli, L. Serrecchia, D. Farina, C. Ortello, A. Scarinci, D. Belluscio, L. Del Sambro, L. Capozzi, A. Parisi*

**10. Monitoraggio di patogeni in letti naturali di ostrica piatta (*Ostrea edulis*) nel Mar Adriatico occidentale**

*C. D'Onofrio, T. Pretto, L. Cortinovis, P. Berto, F. Tosi, N. Lago, G. Arcangeli, T. Petochi, S. Raicevich, M. Ciani, G. Prioli, A. Vetri*

**11. Studio integrato dell'area marina del Golfo di Pozzuoli attraverso analisi meteo-oceanografiche e monitoraggio della contaminazione da IPA**

*M. Esposito, Y. Cotroneo, L. Fortunato, V. Capozzi, T. Bruno, G. Aulicino, L. Gifuni, P. de Ruggiero, S. Canzanella, P. Gallo, F. Conversano*

**12. Aggiornamento della Banca Dati Nazionale (BDN) degli stabilimenti di molluschi sulla base della nuova normativa in sanità animale (Reg. UE 2016/429 - AHL)**

*E. Franzago, G. A. Santarelli, W. Di Donato, A. Maroni Ponti, A. Marsella, S. Rizzo, E. Schiavon, L. Bille, A. Toffan, M. Dalla Pozza, A. Sorgente*

**13. Vongole (*Chamelea gallina*) della costa del Piceno: andamento su base mensile della contaminazione microbiologica da *E. coli* dal 2002 al 2023**

*S. Gentili, C. Ciccarelli*

**14. Tetrodotossine nei molluschi bivalvi: primi casi di positività in Emilia-Romagna**

*D. Ippoliti, D. Lenzo, T. Vollaro, M. Cangini, S. Dall'Ara, A. Calfapietra, F. Pino, S. Milandri*

**15. Monitoraggio ambientale dell'ecosistema marino presso mitilocolture abruzzesi: confronto tra due diversi sistemi di rilevazione di dati sito-specifici**

*L. Lanci, F. Mosca, P. G. Tiscar*

**16. DNA mitocondriale di *Callinectes sapidus*: storia evolutiva e una sister species ancora da descrivere**

*C. Locci, I. Azzena, N. Pascale, A. Ciccozzi, I. A. Giantsis, D. K. Papadopoulos, A. Lattos, F. Orrù, C. M. Puzzi, F. Scarpa, M. Casu, D. Sanna*

**17. Monitoraggio delle sostanze perfluoroalchiliche (PFAS) nei molluschi bivalvi della costa Italiana: i risultati dei primi due anni (2023- 2024)**

*E. Lucidi, T. Tavoloni, A. Stramenga, M. Ciriaci, F. Griffoni, F. Pardi, P. Palombo, F. Barchiesi, A. Piersanti*

**18. Le microplastiche in vongole e fasolari commercializzati in Sardegna**

*G. Muresu Ibba, E. Zanardi, F. Sardu, A. Poeta*

- 19. La selezione genetica come strumento per migliorare la resilienza della molluschicoltura Europea contro gli effetti del cambiamento climatico: il progetto ShellFishBoost.**  
*L. Peruzza, M. Milan, consorzio ShellFishBoost, L. Bargelloni*
  
- 20. La determinazione dell'Arsenico totale nei molluschi bivalvi allevati a sud della foce del Po (Mare Adriatico)**  
*S. Rubini, D. Accurso, G. Minkoumba Sonfack, M. Munari, G. Dell'Orfano, P. Rizzi, E. Baldini, S. Manfredini, S. Vertuani*
  
- 21. *Pinna nobilis*: Storia evolutiva e nuove evidenze genetiche per una specie in pericolo di estinzione**  
*D. Sanna, I. Azzena, C. Locci, N. Pascale, A. Ciccozzi, P. Ankon, P. Kružić, C. Manfrin, A. Pallavicini, S. Ciriaco, M. Segarich, E. Batistini, F. Scarpa, Marco Casu*
  
- 22. Valutazione della variabilità genetica di *Callinectes sapidus* Reovirus 1 (CsRV1) nel granchio blu: implicazioni per il monitoraggio e la gestione**  
*F. Scarpa, M. Perra, A. Ciccozzi, I. Azzena, C. Locci, N. Pascale, M. Campolmi, D. Sanna, M. Casu*
  
- 23. Piano d'azione Regionale per la gestione del granchio blu in Sardegna**  
*F. Scarpa, I. Azzena, C. Locci, N. Pascale, M. Campolmi, D. Sanna, M. Casu*
  
- 24. Panoramica legislativa in materia di biosicurezza in molluschicoltura: novità dall'Europa al contesto nazionale**  
*E. Schiavon, E. Franzago, S. Rizzo, L. Bille, A. Toffan, A. Marsella, A. Fabris, G. Prioli, M. Dalla Pozza*
  
- 25. Dal laboratorio alla tavola: esperimenti di cucina su molluschi bivalvi sperimentalmente contaminati per abbattere il rischio microbiologico**  
*G. Talevi, G. Angelico, S. Nardi, F. Piangerelli, S. Di Lullo, S. Pieralisi, E. Rocchegiani, F. Barchiesi, A. Antognini, C. Baldi, C. Spinsanti, D. Ottaviani*
  
- 26. Biotossine marine emergenti: quattro anni di monitoraggio delle Immine Cicliche (ICs) in aree di produzione molluschi dell'Emilia-Romagna**  
*T. M. Vollaro, D. Ippoliti, D. Lenzo, S. Dall'Ara, M. Cangini, A. Calfapietra, F. Pino, S. Milandri*

# ABSTRACT

# Sistemi di Early Warning del rischio biotossicologico: valutazione comparata della loro efficienza ed efficacia

A. Antonini<sup>1</sup>, C. Ciccarelli<sup>2</sup>

<sup>1</sup>) Azienda Sanitaria Territoriale Ascoli Piceno, specialista ICPPA

<sup>2</sup>) Azienda Sanitaria Territoriale Ascoli Piceno

**Keywords:** Biotossine algali, Valutazione del Rischio, Early Warning, Efficienza, Efficacia

## Introduzione

Il Reg. UE/2019/627 [4], all'articolo 61 par. 4, prevede che il monitoraggio delle biotossine nelle aree di produzione di molluschi bivalvi abbia una frequenza settimanale, modulabile in base ad una valutazione del rischio. Il Centro Ricerche Marine (CRM) di Cesenatico, laboratorio nazionale di riferimento per le biotossine marine, ha messo a punto una procedura per la valutazione del rischio biotossicologico che prevede, tra gli elementi cardine, l'adozione di un sistema di Early Warning. In questa ottica, già dal 2023, l'Azienda Sanitaria Territoriale Ascoli Piceno (AST-AP) ha implementato un sistema di Early Warning [3] che, con frequenza settimanale, prevede la valutazione di una serie di dati epidemiologici, di tipo analitico ed anamnestico per giungere ad una valutazione di probabilità che, entro la seconda settimana successiva, si verifichi il superamento del limite massimo ammissibile (Lma) per ognuna delle biotossine prese in considerazione dalla normativa comunitaria. Se la probabilità calcolata, utilizzando il Fattore di Bayes (BF) [5] è inferiore al Valore predittivo di riferimento (VPR) scelto, il campionamento segue la frequenza settimanale o maggiore (frequenza di Warning), altrimenti la frequenza è quindicinale (frequenza ridotta).

L'algoritmo di questo processo decisionale è riportato nella Figura 1. Per garantire la corretta e completa interpretazione dei dati epidemiologici e per ridurre il livello di rumore del giudizio clinico [6], il sistema ha previsto la esatta definizione dei dati che alimentano il processo, le relative fonti ed i criteri di valutazione, come riassunti nelle Tabella 1 e Tabella 2; la Tabella 3 riepiloga i parametri di riferimento utilizzati.

Questo studio, utilizzando i dati analitici ed anamnestici di archivio per il periodo dal marzo 2012 al maggio 2024, intende eseguire una valutazione dell'efficienza e dell'efficacia del sistema di Early Warning attraverso un'analisi retrospettiva dell'esattezza delle previsioni ottenute e determinandone la *sensibilità*, intesa come capacità di riconoscere correttamente i periodi a frequenza ridotta, e la *specificità*, intesa come capacità di anticipare gli eventi nei quali viene superato il limite massimo ammissibile per ciascuna biotossina.

## Summary

The aim of this study was to assess the efficiency and effectiveness of the Early Warning system for biotoxins implemented by AST Ascoli Piceno. The research was conducted through a retrospective analysis of the accuracy of the obtained forecasts, thus determining their sensitivity, intended as the ability to correctly recognise reduced frequency monitoring periods, and specificity intended as the ability to anticipate events in which the maximum permissible limit for each biotoxin is exceeded. Analytical and historical data from the period from March 2012 to May 2024 were used for the analysis, and tests were made with multiple retrospective evaluations by modulating the system benchmarks. The obtained results allowed us to conclude that the best performances, in terms of balance between effectiveness and efficiency, are obtained using the Bayes Factor, the value of LoQ as Cut Off and the value of 0.90 for the predictive reference value.

## Materiali e metodi

Per lo studio sono stati utilizzati i risultati analitici del monitoraggio per biotossine e fitoplancton tossico e, per la clorofilla, i dati forniti online dal sistema Copernicus; per i dati anamnestici sono stati utilizzati l'archivio dei provvedimenti temporanei per i molluschi bivalvi, le elaborazioni epidemiologiche prodotte [2] e l'archivio d'ufficio delle malattie a trasmissione alimentare. La valutazione retrospettiva è stata limitata al solo acido Okadaico (OA) e per i mitili in quanto è stata l'unica biotossina che nel periodo dal marzo 2012 al maggio 2024 ha dato luogo a superamenti del Lma, rendendo così possibili i calcoli. A Partire da questi dati è stata simulata l'applicazione del sistema di Early Warning in tutti i casi in cui erano disponibili risultati analitici ad intervallo non superiore a 17 giorni, confrontando poi la previsione del sistema, basata sul primo risultato con il secondo risultato. Gli esiti di ciascun confronto sono stati classificati in una tabella 2x2 ed i valori della sensibilità e specificità sono stati determinati, secondo l'esempio riportato nella Tabella 4.

Sono state fatte più valutazioni retrospettive distinte modulando i parametri di riferimento VPR, Cut Off e BF, come elencati nella Tabella 5; Inoltre è stata fatta anche la valutazione retrospettiva del criterio di Early Warning semplificato, suggerito dal CRM [1], che prevede l'utilizzo del solo Cut Off, pari a metà del Lma, ma non prevede l'utilizzo di altri dati. Tutti i calcoli sono stati eseguiti su foglio di calcolo Excel 2016.

## Risultati e discussione

La tabella 5 riassume i valori della sensibilità e della specificità ottenuti per ciascuna delle opzioni prese in considerazione. Se la *sensibilità* del sistema di Early Warning misura la sua capacità di riconoscere correttamente i periodi in cui applicare la frequenza ridotta; quindi valori più elevati consentono di contenere i costi, in termini di risorse umane ed economiche, necessari per l'esecuzione dei campioni e delle analisi di laboratorio e migliorano quindi l'*efficienza* del monitoraggio.

La *specificità* del sistema di Early Warning, invece, rappresenta la capacità di anticipare gli eventi negativi, nei quali viene superato il limite massimo ammissibile per ciascuna biotossina, attraverso l'attivazione della frequenza di Warning: ai suoi valori più elevati corrisponde una migliore capacità di evitare o ridurre l'immissione sul mercato di molluschi bivalvi potenzialmente pericolosi. Essa misura quindi l'*efficacia* del monitoraggio. Possono valere quindi le equivalenze: *sensibilità=efficienza* e *specificità=efficacia*.

Da queste premesse, osservando la tabella 5, è facile riconoscere come l'utilizzo del BF nella valutazione di probabilità, rispetto al non utilizzo (BF=1) migliori le performances del sistema, in termini di efficacia e di efficienza; lo stesso può dirsi per l'utilizzo del Cut Off= LoQ rispetto al Cut Off=Lma/2. La scelta del VPR=0.95 invece, se da una parte incrementa l'efficacia, che in alcuni casi raggiunge il valore massimo, dall'altra riduce anche l'efficienza, in quanto aumenta il numero dei casi in cui viene attivata, senza necessità, la frequenza di Warning.

In conclusione appare evidente come il migliore equilibrio tra efficienza ed efficacia venga raggiunto con l'opzione **BF LoQ** basata sull'utilizzo del BF, il Cut Off=LoQ e il VPR=0.90, cioè i parametri attualmente utilizzati nel sistema adottato dall'AST-AP. Inoltre da un confronto con il sistema semplificato come suggerito dal CRM, dimostra un'efficienza leggermente inferiore (0.82 contro 0.95) ma un'efficacia nettamente superiore (0.87 contro 0.50).

## Bibliografia

[1] AA.VV. (2024) Procedura operativa per una gestione uniforme del Piano di monitoraggio delle biotossine marine e del fitoplancton tossico nelle zone di produzione e stabulazione dei molluschi bivalvi per la rimodulazione della frequenza di campionamento: Valutazione del rischio. Rev. del 18/06/2024. URL: [https://www.centroricerchemarine.it/public/upl\\_images/epweb3/P.O.-%20VdR\\_rev.18-06-2024.pdf](https://www.centroricerchemarine.it/public/upl_images/epweb3/P.O.-%20VdR_rev.18-06-2024.pdf)

[2] 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 IX Convegno Nazionale SIRAM, Trieste.

[3] Ciccarelli C., Semeraro A. M., Di Trani V., Antonini A., Ciccarelli E. (2024) *Sistema di Early Warning del rischio biotossicologico nel monitoraggio delle aree di produzione di molluschi bivalvi vivi adottato dalla AST Ascoli Piceno*. Atti del X Convegno Nazionale SIRAM – Cagliari 2023.

[4] 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.

[5] 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>

[6] 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](https://ia904606.us.archive.org/11/items/ar_20211024/BOOKS.YOSSR.COM-Noise-A-Flaw-in-Human-Judgment.pdf)

Figura 1: algoritmo delle decisioni del sistema di Early Warning

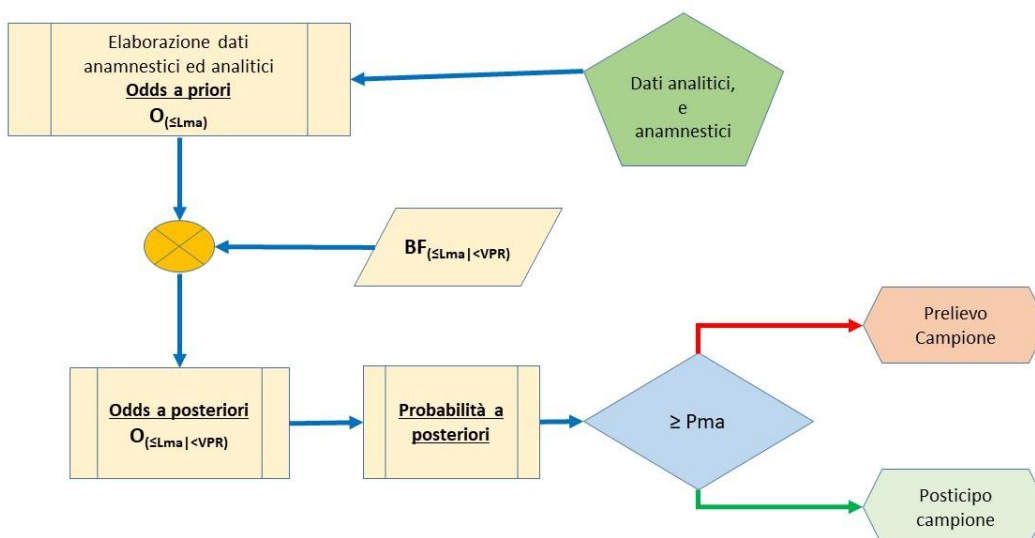


Tabella 1: dati analitici, fonti e valori utilizzati per determinare Odds a priori  $O_{(<Lma)}$

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 $\geq LoQ$ (Cut Off)	0
		L'ultimo risultato disponibile risale alla settimana precedente e il suo valore è $< LoQ$ (Cut Off)	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	<a href="https://data.marine.copernicus.eu/">https://data.marine.copernicus.eu/</a> (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 <sup>3</sup>	5
		Trend della Clorofilla stazionario: nell'ultima settimana la differenza è $\leq 0.1$ mg/m <sup>3</sup>	1
		Trend della Clorofilla in aumento: nell'ultima settimana la differenza in positivo è $> 0.1$ mg/m <sup>3</sup>	0.5

Tabella 2: 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 province 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 3: parametri di riferimento utilizzati

biotossina	UM	Lma	LoQ	Cut off	BF (mitili)	BF (altre specie)	VPR
Saxitossina (STX)	µg eq STX diclor/kg	800	600	LoQ	1	1	0.90
Ac. Domoico (DA)	mg/kg	20	0.2	LoQ	1	1	0.90
Ac. Okadaico (OA)	µg/kg	160	40	LoQ	2.838	1	0.90
Azaspiracid (AZA)	µg/kg	160	30	LoQ	1	1	0.90
Yessotossina (YTX)	mg/kg	3.75	0.2	LoQ	1	1	0.90

Tabella 4: tabella tipo 2x2 utilizzato per la classificazione di ciascun risultato ottenuto nelle valutazioni retrospettive

	≥VPR	<VPR		
≤Lma	a	c	sensibilità	<b>a/(a+c)</b>
>Lma	b	d	specificità	<b>d/(d+b)</b>

Tabella 5: combinazioni di parametri utilizzati nelle valutazioni retrospettive per l'acido Okadaico nei mitili e risultati ottenuti

Opzioni	Cut Off	BF	VPR	sensibilità	specificità
BF LoQ	LoQ	2.838	0.90	0.82	0.83
BF LoQ	LoQ	2.838	0.95	0.76	0.83
noBF LoQ	LoQ	1	0.90	0.72	0.83
noBF LoQ	LoQ	1	0.95	0.43	1
BF Lma/2	Lma/2	1.462	0.90	0.77	0.67
BF Lma/2	Lma/2	1.462	0.95	0.59	1
noBF Lma/2	Lma/2	1	0.90	0.73	0.83
noBF Lma/2	Lma/2	1	0.95	0.38	1
limite Lma/2	Lma/2	Metodo CRM		0.95	0.50

# Biotossine Marine nei mitili della costa Marchigiana: valutazione dell'analisi del fitoplancton come strumento previsionale degli eventi tossici

S. Bacchiocchi<sup>1,2</sup>, S. Accoroni<sup>3</sup>, M. Siracusa<sup>1,2</sup>, G. Diomedì<sup>1,2</sup>, F. Neri<sup>3</sup>, T. Romagnoli<sup>3</sup>, C. Totti<sup>3</sup>, S. Mazza<sup>1,2</sup>,  
C. Cucchi<sup>4</sup>, M. Cusumano<sup>4</sup>, E. Calandri<sup>2</sup>, F. Barchiesi<sup>2</sup>, A. Piersanti<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>) Unità Operativa Specialistica - Laboratorio Contaminanti Organici, Inorganici e Biotossine Algali - Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche "Togo Rosati" - Via Cupa di Posatora 3, 60131 Ancona (AN)

<sup>2</sup>) CRN 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)

<sup>3</sup>) Università Politecnica delle Marche - Dipartimento di Scienze della Vita e dell'Ambiente – Via Brecce Bianche, 60131 Ancona (AN)

<sup>4</sup>) U.O.C. SIAOA - AST Ancona Marche Area Vasta 2 - Via Cristoforo Colombo, 60131 Ancona (AN)

**Keywords:** Acido okadaico, Yessotossine, LC-MS/MS, Fitoplancton

## Introduzione

Le Biotossine Marine Lipofiliche (BML) sono tossine marine prodotte dal metabolismo di numerose specie di microalghe unicellulari appartenenti per lo più alle dinoflagellate che, accumulandosi lungo la catena trofica, diventano una minaccia per l'uomo e per l'acquacoltura. Tre sottogruppi di BML, l'acido okadaico e dinofisitossine (AO e DTXs), le yessotossine (YTXs) e gli azaspiracidi (AZAs), sono attualmente regolamentati a livello europeo con dei valori soglia rispettivamente di 160 µg AO eq. kg<sup>-1</sup>, 3.75 mg YTX eq. kg<sup>-1</sup> e 160 µg AZA eq. kg<sup>-1</sup> [1]. Il Mar Adriatico, su cui si affaccia la regione Marche, una delle aree più importanti del Mediterraneo per quanto riguarda la produzione di molluschi bivalvi, è interessato in maniera ricorrente da fioriture di alghe tossiche. Negli ultimi decenni si sono verificati numerosi episodi di contaminazione da BML nei mitili, con prevalenza di YTXs e AO [2-3], che hanno causato problemi sanitari e gravi perdite economiche a carico degli operatori della molluschicoltura. I controlli ufficiali effettuati delle autorità competenti per monitorare il fenomeno [4] hanno come principale strumento di previsione degli eventi tossici il conteggio del numero di cellule di specie potenzialmente produttrici di biotossine presenti nella colonna d'acqua. Tale approccio non si è tuttavia rivelato sempre efficace anche perché complicato dal fatto che più specie algali tossiche possono essere presenti contemporaneamente e che la loro effettiva biodisponibilità per i molluschi non è sempre proporzionale alla loro abbondanza cellulare assoluta. È oramai noto come da un lato grandi fioriture di fitoplancton non sempre portino ad eventi tossici e, dall'altro, dinoflagellate come ad esempio *Dinophysis* spp. possano causare danni anche a basse concentrazioni (poche centinaia di cellule per litro) [5]. Lo scopo del presente lavoro è quello di mettere in relazione le abbondanze cellulari assolute e relative delle specie fitoplanctoniche tossiche in un'area della costa marchigiana con gli eventi di accumulo di AO e YTXs nei mitili allevati nella stessa zona. Il fine ultimo è quello di approfondire la conoscenza dei trend temporali di accumulo delle BML nei mitili e migliorare il potere predittivo di questi ultimi mediante il monitoraggio del fitoplancton tossico, implementando quindi sistemi di early warning sempre più efficaci non solo per la tutela della salute pubblica ma anche a supporto dell'attività di molluschicoltura.

## Summary

Lipophilic Marine Biotoxins (LMB) are marine toxins produced by numerous species of unicellular dinoflagellate microalgae which, accumulating through the trophic chain, become a threat to humans and aquaculture activity. Three subgroups of LMB, Okadaic acid and Dinophysitoxins (OA and DTXs), Yessotoxins (YTXs) and Azaspiracids (AZAs), are currently regulated in Europe with Maximum Permitted Levels of 160 µg OA eq. kg<sup>-1</sup>, 3.75 mg YTX eq. kg<sup>-1</sup> and 160 µg AZA eq. kg<sup>-1</sup> [1]. The Adriatic Sea is highly exploited for bivalve mollusks production but frequently experienced toxic algae blooms. In the last decades, numerous OA and YTXs contaminations in mussels have occurred [2-3], causing health problems and serious economic losses for shellfish farming operators. The official controls by the competent authorities [4] have quantitation of toxic phytoplankton in the water column as main tool for predicting and mitigating toxic events. This approach has not always proven effective also because multiple toxic algal species can be present at the same time and their actual bioavailability for mollusks is not necessarily related to their absolute cellular abundance. It is now known that large phytoplankton blooms do not always lead to toxic events and, on the other hand, dinoflagellates such as *Dinophysis* spp. can cause damage at a concentration of only a few hundred cells per liter. The aim of the present work is to highlight the relationships between the absolute and relative cell abundances of toxic algal species present in a coastal area of the Marche Region and the accumulation trends of OA and YTXs in mussels farmed in the same area, during the period 2021-2023. The scope was to deepen the knowledge of OA and YTXs accumulation trends in mussels, improve the predictive power of toxic phytoplankton monitoring and, therefore, implement more effective early warning systems not only for the public health protection but to support the shellfish farming too.

## Materiali e Metodi

Per le finalità del presente studio sono stati utilizzati 70 campioni di mitili prelevati nell'ambito del piano di monitoraggio regionale dai Servizi Veterinari dell'AST di Ancona nel triennio 2021 - 2023 nell'area di produzione di Senigallia. 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, 5<sup>th</sup> ed. January 2015" [6]. Campioni di acqua di mare per l'analisi del fitoplancton sono stati raccolti presso la stazione costiera di Senigallia del transetto LTER Ancona-Susak con frequenza mensile tramite bottiglie Niskin seguendo le Intergovernmental Oceanographic Commission guidelines [7].

Per l'identificazione e il conteggio del fitoplancton è stato utilizzato un microscopio rovesciato (ZEISS Axiovert 135) dotato di contrasto di fase, seguendo il metodo Utermöhl [8]. Il conteggio è stato effettuato ad un ingrandimento di 400x, lungo transetti o in campi visivi casuali, a seconda dell'abbondanza cellulare, al fine di contare un minimo di 200 cellule. Inoltre, metà della camera Utermöhl è stata analizzata a un ingrandimento di 200x per una stima più precisa dei taxa microfitoplanctonici meno abbondanti.

Lo studio delle relazioni tra i valori di contaminazione da BML nei mitili e di abbondanza cellulare assoluta e relativa delle specie algali tossiche presenti nella popolazione fitoplanctonica sono stati effettuati tramite la correlazione di Spearman. Per le analisi è stata utilizzata la versione 4.1.1 del software R.

## Risultati e discussione

Nel triennio in esame, come atteso, AO e YTXs sono risultati predominanti nel profilo tossico dei mitili della costa marchigiana, confermando quanto già noto per questa e altre aree del Mar Adriatico [2-3]. I periodi di maggiore accumulo si sono registrati in autunno-inizio inverno e primavera per entrambi i gruppi di tossine con lo sfioramento (251  $\mu\text{g}$  OA eq.  $\text{kg}^{-1}$ ) nel caso dell'AO del limite di legge nel novembre 2021 ed il massimo accumulo di YTXs (0.219 mg YTX eq.  $\text{kg}^{-1}$ ) registrato invece nel Novembre del 2022. Anche questo trend era già stato descritto in passato [2] ed è coerente con la dinamica del fitoplancton in Adriatico che vede due picchi di fioritura di dinoflagellate proprio in queste stagioni. Nel 2021 tuttavia si è verificato un accumulo sia di AO (182  $\mu\text{g}$  OA eq.  $\text{kg}^{-1}$ ) che di YTXs (0.127 mg YTX eq.  $\text{kg}^{-1}$ ) già a metà agosto, in un periodo insolito considerando i dati storici [2]. Nel fitoplancton sono state rilevate specie note per produrre OA (*Dinophysis/Phalacroma* spp. *Prorocentrum* sp. e *P. lima*) e YTX (*Gonyaulax spinifera*, *Lingulodinium polyedra*, *Protoceratium reticulatum*). Tuttavia, in questi tre anni di studio non è stata osservata una correlazione significativa tra le abbondanze assolute e/o relative di queste specie e i livelli di tossine, come invece rilevato negli anni precedenti [9]. I risultati finora ottenuti, confermano l'importanza di aumentare la capacità predittiva dell'analisi del fitoplancton come strumento di early warning degli eventi tossici, attraverso l'approfondimento della correlazione con gli aspetti legati ai trend temporali dell'accumulo delle BML nei molluschi bivalvi marini.

## 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.; Gorbì, 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. *Toxicol.* 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] Bernardi Aubry, F.; Berton, A.; Bastianini, M.; Bertaggia, R.; Baroni, A.; Socal, G. Seasonal dynamics of *Dinophysis* in coastal waters of the NW Adriatic Sea. *Bot. Mar.* 2000, 43, 423–430
- [6] EU-Harmonised standard operating procedure for determination of lipophilic marine biotoxins in molluscs by LC-MS/MS 5<sup>th</sup> ed., 2015. Available online: [https://www.aesan.gob.es/en/CRLMB/web/public\\_documents/seccion/other\\_crlmb\\_standard\\_operating\\_procedures.htm](https://www.aesan.gob.es/en/CRLMB/web/public_documents/seccion/other_crlmb_standard_operating_procedures.htm)
- [7] Reguera B., Alonso R., Moreira A., Méndez S., Dechraoui-Bottein M.Y. (2016). Methods for sampling benthic microalgae. Guide for designing and implementing a plan to monitor Toxin-producing microalgae. 2nd (Eds), 59, IOC of UNESCO and IAEA, Paris and Vienna, pp. 19-29 *IOC Manuals and Guides*.
- [8] Elder L., Elbrächter M. (2010). "The Utermöhl method for quantitative phytoplankton analysis," in *Microscopic and Molecular Methods for Quantitative Phytoplankton Analyses* eds Karlson B., Cusack A., Bresnan E. (Paris: UNESCO) 13–20.
- [9] Accoroni S, Cangini M, Angeletti R, Losasso C, Bacchiocchi S, Costa A, Taranto AD, Escalera L, Fedrizzi G, Garzia A, Longo F, Macaluso A, Melchiorre N, Milandri A, Milandri S, Montresor M, Neri F, Piersanti A, Rubini S, Suraci C, Susini F, Vadrucci MR, Mudadu AG, Vivaldi B, Soro B, Totti C, Zingone A. (2024). Marine phycotoxin levels in shellfish-14 years of data gathered along the Italian coast. *Harmful Algae*.

# Progetto BlueBoost: culture of a wide range of low trophic species to boost sustainable production of Blue Food and reduce environmental footprint

G. Brundu<sup>1</sup>, F. Capoccioni<sup>2</sup>, A. Chindris<sup>1</sup>, M. Corrias<sup>1</sup>, C. Frongia<sup>1</sup>, P. Graham<sup>1</sup>, A. Martini<sup>2</sup>, D. Pulcini<sup>2</sup>, S. Carboni<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Centro Marino Internazionale – IMC, Loc. Sa Mardini 09170, Torregrande, Oristano, Italy

<sup>2</sup> Centro di ricerca Zootecnia e Acquacoltura, Consiglio per la Ricerca in Agricoltura e l'Analisi dell'Economia Agraria (CREA), 00015, Monterotondo (Rome), Italy

**Keywords:** IMTA, LCA, molluschi bivalvi, ostriche, cozze

## Introduzione

L'Europa è il più grande importatore mondiale di prodotti ittici e nel 2022 la produzione è stata sufficiente a coprire meno del 30% del consumo locale [1]. Con la chiara ambizione di aumentare la produzione da acquacoltura sostenibile, negli ultimi anni l'UE ha adottato linee guida strategiche per lo sviluppo di un settore più competitivo e in linea con la Blue Economy [2]. Parte integrante di questa strategia consiste nel potenziare la produzione di specie a basso livello trofico come ad esempio i molluschi bivalvi, e sviluppare nuovi metodi di allevamento in grado di aumentare la sostenibilità produttiva, come i sistemi di acquacoltura multitrofica integrata (IMTA). I sistemi IMTA hanno diversi vantaggi rispetto all'acquacoltura monospecifica tradizionale, sia in termini di volumi prodotti che di redditività, in quanto le specie a basso livello trofico non richiedono l'impiego di mangimi [3] e di conseguenza l'investimento aggiuntivo è potenzialmente basso. Potenzialmente, oltre alla produzione di cibo (servizi di approvvigionamento), i sistemi IMTA forniscono anche altri servizi ecosistemici (definiti servizi ecosistemici di supporto alla vita, di regolazione e culturali). Ad esempio, le specie allevate nei sistemi IMTA partecipano al ciclo dei nutrienti e permettono di ridurre il carico di elementi eutrofizzanti (azoto e fosforo) nell'area di allevamento, in quanto i rifiuti prodotti (mangime non utilizzato, feci) da specie di livello trofico più alto rappresentano risorse (alimento) per le specie di livello trofico più basso. Attualmente, i benefici ambientali e i guadagni sociali derivanti dall'allevamento di specie a basso livello trofico in sistemi IMTA sono stati studiati prevalentemente su scala sperimentale o pilota. Per poter valutare questi vantaggi, anche a scala commerciale, è necessario valutare l'impronta ambientale (uso di energia, terra, acqua, emissioni di gas serra e nutrienti) non solo del prodotto finale, ma anche dell'intera filiera produttiva tramite l'approccio *Life Cycle Assessment* (LCA), un metodo raccomandato dall'UE per la quantificazione dei potenziali impatti associati alla produzione di beni o servizi lungo tutto il loro ciclo di vita [4].

In questo contributo presentiamo il progetto BlueBoost "Culture of a wide range of low trophic species to boost sustainable production of Blue Food and reduce environmental footprint" nell'ambito del finanziamento SBEP (Sustainable Blue Economy Partnership), che ha lo scopo di i) contribuire allo sviluppo dei sistemi IMTA e all'allevamento di specie a basso livello trofico insieme a specie già consolidate per diversificare e aumentare la produzione, ii) descriverne e quantificarne i benefici ambientali ed economici.

## Summary

Although the environmental and associated societal benefits of shellfish aquaculture and Integrated Multi Trophic Aquaculture (IMTA) are acknowledged, they have been not quantified and valued extensively. In this study, we present the BlueBoost project, which aims to address the increasing aquaculture industry's uptake of technologies for the culture of low trophic species together with established fed species, as well as to describe and quantify the environmental and economic benefits of IMTA. Six IMTA systems with a wide range of species and different production systems will be developed in Mediterranean Sea and Brazil. For each IMTA system, a Life Cycle Assessment (LCA) will evaluate the environmental impact (e.g. use of energy, land, water and greenhouse gas or nutrient emissions) of products and supply chains, and a comparison between monoculture and IMTA will be done. At the same time, an economic analysis will shed light on the viability of IMTAs, their investment requirements and economic performance relative to those of monoculture aquaculture.

## Materiali e metodi

Le attività del progetto, iniziato ad Aprile 2024, prevedono la realizzazione di sei sistemi IMTA su scala commerciale e pilota, quattro dei quali interessati dall'allevamento di molluschi bivalvi come specie a basso livello trofico. Questi quattro sistemi avranno caratteristiche molto differenti tra loro, sia per localizzazione geografica, sia per caratteristiche ambientali del sito e varietà di specie allevate. Due sistemi IMTA verranno realizzati nel bacino del Mediterraneo: nel Golfo di Oristano in Sardegna (Italia) e nel delta del fiume Ebro (Spagna). Altri due IMTA saranno sviluppati in Brasile, a Rio Grande del Sud e nella baia di Itapocoroy (Santa Catarina). L'impianto del Golfo di Oristano sarà costituito da gabbie galleggianti a mare per l'allevamento di spigole (*Dicentrarchus labrax*), orate (*Sparus aurata*) e ombrine (*Argyrosomus regius*), e ceste sospese per l'allevamento di ostrica piatta (*Ostrea edulis*), di cui una parte deriverà da seme prodotto nello schiuditoio sperimentale del IMC. Uno studio idrodinamico preliminare sui movimenti delle masse d'acqua e di dispersione

delle particelle sospese attorno al sistema IMTA ha consentito di identificare la migliore direzione per il posizionamento delle ostriche rispetto ai pesci e massimizzare la connettività fisica tra le specie. Il sistema IMTA in Spagna prevede esclusivamente specie a basso livello trofico allevate in stagni salmastri a terra, nei quali i reflui di muggine (*Mugil cephalus*) verranno utilizzati per la coltivazione di microalghe, che a loro volta verranno utilizzate come alimento per ostriche (*O. edulis*) e vongole filippine (*Ruditapes philippinarum*). Il sistema IMTA di Rio Grande prevede l'allevamento in vasche a terra di gamberi (*Litopenaeus vannamei*) utilizzando la tecnologia biofloc, integrati con muggini (*Mugil liza*), ostriche (*Crassostrea gasar*), macroalghe (*Ulva sp.*), piante alofile (*Salicornia neii*) e cetrioli di mare (*Holothuria grisea*). Il quarto sistema di Santa Catarina sarà costituito da gabbie galleggianti in mare per l'allevamento di sardine (*Sardinella brasiliensis*) e muggini (*M. liza*), le quali verranno affiancate da sistemi *long line* per l'allevamento di cozze (*Perna perna*) e reti tubulari di macroalghe (*Kappaphycus alvarezii*) attorno al perimetro.

Durante diversi cicli di allevamento verrà monitorata la crescita e sopravvivenza degli animali allevati, la qualità del prodotto ottenuto, nonché il potenziale riutilizzo di macroalghe e piante come alimento per pesci e gamberi. Verranno raccolti i dati dei principali parametri ambientali dell'acqua nei diversi siti di allevamento sia attraverso misurazione *in situ* che tramite dati satellitari. Verranno inoltre raccolti dati e informazioni per ciascun impianto IMTA sul flusso dei nutrienti (carbonio, azoto e fosforo) tra le specie allevate, a partire dal mangime necessario per l'allevamento delle specie ad alto livello trofico, fino ai bivalvi e alle specie autotrofe (macroalghe e piante). In alcuni casi, tali stime verranno confermate da analisi degli isotopi stabili (IMTA del Golfo di Oristano).

Per ogni sistema IMTA verrà effettuata una prima analisi LCA per la fase di monocoltura e quindi antecedente l'integrazione con le specie a basso livello trofico. I risultati costituiranno la base per effettuare comparazioni con le fasi successive in cui verranno inserite le specie a basso livello trofico. I dati per l'analisi LCA verranno raccolti tramite questionari, visite dei siti produttivi, interviste ed eventualmente integrati con informazioni provenienti da banche dati e letteratura scientifica esistenti. Per la valutazione dell'efficienza di ritenzione dei nutrienti da parte delle specie a basso livello trofico si utilizzerà il bilancio di massa a partire da dati ottenuti tramite analisi di laboratorio sui contenuti di azoto, fosforo e carbonio nei mangimi e negli animali allevati, la quantità di mangime somministrato (consumato e non), il tasso di conversione alimentare (*Food Conversion Ratio*) e la densità di allevamento. Verrà effettuata anche un'analisi di fattibilità economica di ciascun sistema IMTA, basata sui dati di produzione, il reddito netto, i rapporti costi-benefici e l'investimento necessario. Come per l'LCA, i risultati dell'analisi economica verranno comparati con quelli stimati negli stessi impianti monospecifici prima dell'integrazione con specie a basso livello trofico.

## Risultati e discussione

A pochi mesi dall'avvio delle attività progettuali, i sistemi di allevamento IMTA sono in prevalenza ancora in fase di realizzazione. In particolare, nel sistema IMTA nel Golfo di Oristano, in stato di realizzazione più avanzato rispetto ad altri sistemi, è stato già effettuato uno studio idrodinamico del sito, che ha evidenziato la mancanza di una corrente marina direzionale preferenziale attorno all'impianto. Sulla base di questi risultati è stato scelto di posizionare i sistemi di allevamento di ostriche in direzione sud-est rispetto alle gabbie dei pesci, quindi a valle della direzione del vento dominante (maestrale). La semina delle giovani ostriche è stata effettuata nel mese di maggio. Crescita e sopravvivenza degli animali vengono attualmente monitorati con cadenza mensile. Una seconda parte di seme di ostrica è stato prodotto nei laboratori del IMC ed è attualmente in fase di crescita in attesa di essere trasferito nel sistema IMTA non appena gli animali avranno raggiunto la taglia di semina. Campioni di ostriche, feci di pesci, mangime e macroalghe sono stati raccolti a giugno e sono in fase di analisi per gli isotopi stabili. Ulteriori altri campioni già raccolti verranno analizzati nei prossimi mesi per la misurazione della quantità di nutrienti nei tessuti, principalmente azoto e fosforo, e di carbonio nella conchiglia. La raccolta dei dati necessari per la realizzazione del modello LCA è in corso e i dati verranno validati in autunno durante una visita programmata agli impianti.

## Bibliografia

[1] FAO (2024). The State of World Fisheries and Aquaculture (SOFIA).

[2] European Commission, Strategic guidelines for a more sustainable and competitive EU aquaculture 2021-2030.

[3] Krause G., Le Vay L., Buck B.H., Costa-Pierce B.A., Dewhurst T., Heasman K.G., Nevejan N., Nielsen P., Nielsen K.N., Park K., Schupp M.F., Thomas J.-B., Troell M., Webb J., Wrange A.L., Ziegler F., Strand Å. (2022) Prospects of Low Trophic Marine Aquaculture Contributing to Food Security in a Net Zero-Carbon World. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 6, Article 875509.

[4] <https://eplca.jrc.ec.europa.eu/>.

# Valutazione dello stato della perkinsosi (*P. olseni*) nel mitilo mediterraneo (*Mytilus galloprovincialis*) della Regione Campania

F. Carella<sup>1</sup>, L. Troise<sup>1</sup>, L. D'Angelo<sup>1</sup>, E. Di Lecce<sup>1</sup>, G. Paduano<sup>2</sup>, M. G. Lucibelli<sup>2</sup>, F. Di Nocera<sup>2</sup>

<sup>1</sup>) Dipartimento di Biologia, Università degli Studi di Napoli "Federico II", Via Cinthia, Complesso di MSA, Napoli, Italia;

<sup>2</sup>) Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Mezzogiorno, Portici (Na), Italia

**Key words:** *Perkinsus*; malattie bivalvi; dinoflagellati

## Introduzione

Negli ultimi 30 anni sono aumentate fortemente le descrizioni delle "Malattie Transfrontaliere degli Animali Acquatici (TAADS)" responsabili dell'introduzione, insediamento e diffusione di agenti patogeni in nuove aree geografiche. Di esse fanno parte i patogeni del genere *Perkinsus*, uno degli esempi più rilevanti di parassiti degli ambienti marini. La Perkinsosi è, infatti, riportata in più di 30 specie di molluschi bivalvi ed è responsabile di grandi perdite nel settore dell'acquacoltura. Ad oggi, sono state segnalate sette specie appartenenti al genere *Perkinsus*: *P. marinus*, *P. olseni*, *P. chesapeaki*, *P. mediterraneus*, *P. qugwadi*, *P. honshuensis* e *P. beihaiensis*. Di esse, solo *P. olseni* e *P. marinus* sono malattie notificabili secondo il WOA (World Organization for Animal Health) e riportate principalmente in veneridi ed ostreidi. Recentemente, sono aumentate le segnalazioni di perkinsosi nei mitili, con descrizioni di infezioni legate alla specie *P. beihaiensis* in *M. galloprovincialis* in Giappone (Itoh et al., 2019) e di *P. olseni* in *M. chilensis* in Argentina (Vazquez et al., 2022). La prima segnalazione di *P. olseni* nel Mar Mediterraneo è avvenuta fra il 2019-2021 nella Regione Campania, in mitili appartenenti ad allevamenti e banchi naturali (Carella et al., 2023).

## Summary

In recent years, there has been an increasing rate of occurrence of new diseases in aquatic species. Pathogens of the genus *Perkinsus* are one of the most relevant examples of invasive parasites of marine environments, described in more than 30 species of bivalve molluscs in various geographical areas, and responsible for large losses in the aquaculture sector. Following the first description of *P. olseni* in farms and natural banks in the bivalve *Mytilus galloprovincialis* in the Campania Region in 2019, a monitoring study was performed from October 2022 to March 2023 on 11 farms from the North to the South of the Region. For this study, molecular diagnostics of the ITS region of the rDNA (ITS1, 5.8S and ITS2) was performed followed by sequence analysis of the positive samples. Furthermore, a systematic seasonal study was conducted on one of the infected plants (Nisida) in order to define its prevalence and the effect on mussel populations over time. In this farm, in order to define the most sensitive diagnostic approach in the detection of the presence of perkinsosis, different methods were used: histopathology, RFTM and Real time PCR. The analyses conducted in the Campania Region show a prevalence of 63% of *P. olseni*, with 7 mussel farms tested positive out of the 11 considered. The histopathological examination on the Nisida farm revealed inflammatory lesions represented by numerous hemocyte capsules at the level of the digestive gland and gonad. The comparison between the different diagnostic techniques used showed that RFTM and qPCR are the most effective methods for the detection of perkinsosis. The intensification of farming and changes in environmental conditions could favor the progression of the disease. Further studies are needed considering the high economic value of mussels for the local aquaculture sector.

## Materiali e Metodi

A seguito alla prima descrizione di *P. olseni* in allevamenti e banchi naturali nel bivalve *Mytilus galloprovincialis* nella Regione Campania nel 2019, è stato condotto da Ottobre 2022 a Marzo 2023 un monitoraggio su 11 allevamenti dalla zona Nord a Sud della Regione. Per tale studio è stata effettuata diagnostica molecolare della regione ITS dell'rDNA (ITS1, 5.8S e ITS2) seguita da analisi delle sequenze dei campioni risultati positivi. Inoltre, a partire dal suo primo ritrovamento, è stato condotto uno studio sistematico stagionale su uno degli impianti nella zona di Napoli (Nisida) per definirne la prevalenza e l'effetto sui mitili nel tempo. In tale allevamento, allo scopo di definire l'approccio diagnostico più sensibile nella rilevazione della presenza della perkinsosi, sono state impiegate diverse metodiche: istopatologia, RFTM e Real time PCR.

## Risultati e Discussione

Le analisi condotte sul territorio campano mostrano una prevalenza del 63% di *P. olseni*, con 7 impianti di mitilicoltura risultati positivi degli 11 monitorati.

L'esame istopatologico sull'impianto di Nisida ha rilevato lesioni di natura infiammatoria rappresentata da numerose capsule emocitarie a livello di ghiandola digerente e gonade. Il confronto fra le diverse tecniche diagnostiche impiegate ha mostrato che RFTM e qPCR risultano essere le metodiche più efficaci per l'individuazione della perkinsosi. L'intensificazione degli allevamenti e i cambiamenti delle condizioni

ambientali potrebbero favorire la progressione della malattia. Ulteriori studi sono necessari considerando l'elevato valore economico dei mitili per il settore dell'acquacoltura locale.

## Bibliografia

[1] Carella F, Fernandez Tejedor M, Villari G, Andree KB and 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.* 10:1116837. doi: 10.3389/fmars.2023.1116837.

[2] Itoh, N., Komatsu, Y., Maeda, K., Hirase, S., and Yoshinaga, T. (2019). First discovery of *perkinsus beihaiensis* in Mediterranean mussels (*Mytilus galloprovincialis*) in Tokyo bay, Japan. *J. Invertebr. Pathol.* 166, 107226. doi: 10.1016/j.jip.2019.107226.

[3] Vazquez, N., Itoh, N., and Cremonte, F. (2022). First record of *Perkinsus olseni* in cultured mussels (*Mytilus chilensis*) in the Beagle channel. *Southwestern Atlantic Ocean Aquaculture* 550, 737893. doi: 10.1016/j.aquaculture.2022.737893.

# Sistemi informativi innovativi per la visualizzazione dei dati sanitari delle zone di produzione dei molluschi bivalvi nella Regione Veneto

C. Casarotto<sup>1</sup>, M. Bassan<sup>1</sup>, M. Trolese<sup>1</sup>, E. Franzago<sup>1</sup>, E. Schiavon<sup>1</sup>, N. Ferrè<sup>1</sup>, G. Manca<sup>1</sup>, M. Dalla Pozza<sup>1</sup>, G. Arcangeli<sup>1</sup>, L. Bille<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie – Legnaro (PD)

**Keywords:** sistema informativi, visualizzazione dati, zone di produzione molluschi

## Introduzione

I molluschi bivalvi (MB) essendo organismi filtratori, possono accumulare sostanze potenzialmente dannose per l'uomo come microrganismi patogeni, contaminanti chimici e/o tossine che vengono prodotte da microalghe. Per prevenire, eliminare o ridurre tali rischi, l'Autorità Veterinaria Locale Competente (AVCL) attua un costante monitoraggio igienico-sanitario in conformità con la normativa europea che identifica i limiti riguardante i parametri microbiologici, biotossicologici e chimici.

La raccolta di MB può avvenire solo in zone di produzione classificate. La classificazione avviene in seguito ad uno studio sanitario che porta alla valutazione dell'impatto delle potenziali fonti di contaminazione fecale e ne stabilisce i punti rappresentativi da utilizzare per il piano di campionamento da implementare. Le attività di monitoraggio sono obbligatorie e vengono effettuate a intervalli regolari. Se i risultati dei controlli rilevano una non conformità, l'Autorità competente locale (ACL) può limitare o sospendere la raccolta dei molluschi bivalvi fino a quando i requisiti sanitari richiesti a livello legislativo non tornano ad essere soddisfatti.

Essendo l'Italia il terzo produttore europeo di molluschi bivalvi, è fondamentale dotare le autorità competenti locali di strumenti adeguati per gestire efficacemente le attività di monitoraggio. Questo obiettivo può essere raggiunto mediante la messa a disposizione di sistemi informativi che permettano di raccogliere, validare e visualizzare i dati sanitari relativi alle zone di produzione.

Per supportare le attività di monitoraggio delle ACL durante i controlli ufficiali, il Fondo Europeo per gli Affari Marittimi e la Pesca (FEAMP) ha finanziato il progetto n. 04/INP/20/VE che ha coinvolto il Laboratorio di epidemiologia applicata all'ambiente acquatico e l'Ufficio GIS dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie (IZSVE) nello sviluppo ed implementazione di alcuni sistemi informativi innovativi.

## Summary

European legislation on food safety currently requires the monitoring and control of all classified bivalve mollusc (BM) production areas to ensure product compliance. When control results reveal non-compliance, the Local Veterinary Competent Authority (LVCA) issues a measure to restrict or suspend harvesting activities in the affected production area. Therefore, it is crucial that the LVCA has access to near-real-time information on the health status, laboratory test results, and spatial distribution of production areas. As part of a project funded by the European Maritime and Fisheries Fund (no. 04/INP/20/VE), three information technology (IT) tools have been developed to assist the LVCA in their daily control activities. These IT tools also indirectly help ensure a safe product for the final consumer by supporting food safety control activities.

## Materiali e metodi

Il primo passo del progetto ha visto lo studio e lo sviluppo di uno schema concettuale per l'acquisizione e la visualizzazione dei dati provenienti da diversi siti web. A seguito dell'approvazione dello schema concettuale, si è provveduto alla realizzazione di uno studio delle caratteristiche del software (SW) con lo scopo di descrivere le specifiche tecniche necessarie per la realizzazione del sistema informativo per la gestione delle informazioni d'interesse veterinario in riferimento alle zone di produzione dei MB.

La prima fonte dati identificata è stata la banca dati zootecnica nazionale (<https://www.vetinfo.it/>) la quale fornisce informazioni anagrafiche e produttive riguardanti gli allevamenti (es. proprietario e tipo di allevamento) e le zone di produzione. La seconda fonte di dati è stato il sistema di gestione dei laboratori dell'IZSVE, che archivia i risultati delle analisi di laboratorio eseguite nell'ambito del monitoraggio igienico sanitario delle zone di produzione. L'ultima fonte dati è stato il software QVeNet, in uso dal 2013 alle ACL per la compilazione online dei verbali di campionamento dei molluschi e contestuale preaccettazione dei campioni presso i laboratori IZSVE.

I dati provenienti dalle tre diverse fonti, sono stati processati in moduli da integrare all'interno del sistema del *Data Warehouse* dell'IZSVE (DWH). DWH è un'infrastruttura che aggrega dati provenienti da diverse origini in un unico archivio di dati centralizzato e coerente, che supporta le analisi statistiche/epidemiologiche.

L'integrazione è stata implementata attraverso i processi ETL (*Extract Transform Load*), che permettono di raccogliere i dati da più fonti, elaborarli e riunirli in modo da poterli poi riutilizzare in specifici *dataset*.

L'implementazione dei moduli all'interno del DWH è stata realizzata da una società privata specializzata nello sviluppo di sistemi informativi.

Sulla base dei *dataset* sono state poi create una serie di viste logiche, ossia tabelle virtuali utilizzate per l'integrazione delle informazioni come:



- CLASSIFICAZIONE: elenco delle specie e relativa classificazione nelle singole zone di produzione;
- ZONE: elenco delle zone di produzione;
- ALLEVAMENTI: elenco dei siti di produzione esistenti, inclusi i dati geometrici;
- CAMPIONI: elenco dei campioni raccolti dal gennaio 2021 ad oggi, analisi effettuate e relativi esiti.

## Risultati e discussione

Il progetto ha portato alla creazione di due sistemi informativi ad uso esclusivo delle ACL e del personale dell'IZSve coinvolto nella filiera dei molluschi bivalvi.

Il primo è “**Bivaiclass**” (<https://bivaiclass.izsvenezie.it>), portale che, attraverso una serie di moduli, permette di visualizzare per ogni zona di produzione informazioni sul numero e le caratteristiche degli allevamenti presenti, le specie classificate, i campionamenti effettuati e il numero e altre informazioni di base relative ai punti rappresentativi, ossia quel o quei punti che sulla base delle informazioni disponibili sono stati identificati come quelli più esposti al rischio di contaminazione di origine fecale. Tali informazioni possono essere visualizzate anche in mappe attraverso un visore GIS.

Le sezioni presenti nel portale sono:

- *Homepage*: Pagina per il login con le credenziali nell'area riservata.
- *Elenco delle zone di produzione*: elenco di tutte le zone di produzione della Regione Veneto in cui sono allevati o raccolti i MB.
- *Elenco degli allevamenti*: Selezionando una singola area di produzione, viene visualizzato l'elenco degli allevamenti afferenti, insieme alle informazioni specifiche che li descrivono, come il codice di identificazione univoco, il tipo di produzione (ad esempio: ingrasso) e le specie allevate.
- *Mappa interattiva*: E' possibile cliccare sugli elementi rappresentati e viene di conseguenza visualizzata una finestra pop-up che fornisce la visualizzazione delle informazioni geografiche pertinenti.
- *Elenco dei campioni e risultati*: In questa sezione sono consultabili le informazioni relative alle attività di campionamento ufficiale come la data, le specie campionata, alcuni dati ambientali rilevati in fase di campionamento, analisi svolte e relativo esito.
- *Punti fissi di campionamento*: La pagina mostra l'elenco dei punti rappresentativi della zona di produzione individuati a seguito dello studio sanitario.

Il secondo sistema informativo realizzato è denominato “**Geomolluschi**”. Si tratta di un webGIS per la gestione e pubblicazione di mappe ed informazioni relative alle zone di produzione e allevamenti di molluschi. È stato realizzato utilizzando ArcGIS Online, un modello SaaS (*Software-as-a-Service*) scalabile e protetto ospitato da ESRI. Attraverso tale sistema *web-oriented* è possibile visualizzare ed interrogare dati sanitari e geografici, oltre ad informazioni sui campionamenti per la sicurezza alimentare. Sono disponibili funzionalità di zoom per focalizzarsi su specifiche aree della mappa, di modifica dello sfondo, di visualizzazione di temi con altre fonti di dati (es: mappa ittica regionale). La mappa che viene mostrata nel sito web mostra diversi elementi rappresentati con colori e forme differenti, definiti da una legenda. Se selezionati, da tali elementi si apre una finestra con varie informazioni. Nel lato destro della schermata, è presente un menu dove i campionamenti ufficiali sono suddivisi in macro-categorie (microbiologico, fitoplancton, biotossine, metalli pesanti e altro). Se selezionati, sulla mappa compaiono contatori che mostrano il numero di campioni prelevati in ciascuna area. È possibile anche generare grafici dai dati visualizzati, come dei diagrammi a torta.

## Conclusioni

Per supportare efficacemente le attività di controllo routinarie delle zone di produzione dedicate alla molluschicoltura, gli strumenti devono essere efficienti, monitorati e aggiornati continuamente sulla base delle esigenze degli utenti. Grazie all'aggregazione e alla razionalizzazione dei dati, tali strumenti costituiscono un valido supporto nella revisione periodica della classificazione delle zone di produzione e in tutte le valutazioni necessarie per assicurare un prodotto sicuro per il consumatore finale.

## Bibliografia

- [1] EU Commission (2019). 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.
- [2] 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. [http://europa.eu.int/eurlex/pri/de/oj/dat/2004/l\\_139/l\\_13920040430de00550205.pdf](http://europa.eu.int/eurlex/pri/de/oj/dat/2004/l_139/l_13920040430de00550205.pdf), 30.4.04.
- [3] EU Commission. (2023). Commission regulation (EC) No 915/2023 of 25 April 2023 on maximum levels for certain contaminants in food and repealing Regulation (EC) No 1881/2006. Official Journal of the European Union, OJ L 119, 5.5.2023, p. 103–157.
- [4] FAO (2020). Fishery and Aquaculture Statistics, Aquaculture production, yearbook 2019. Available at: [https://www.fao.org/fishery/static/Yearbook/YB2019\\_USB\\_card/navigation/index\\_content\\_aquaculture\\_e.htm](https://www.fao.org/fishery/static/Yearbook/YB2019_USB_card/navigation/index_content_aquaculture_e.htm)
- [5] Manca, G., Boaretto, E., Bille, L., Dalla Pozza, M., Marangon, S. (2018). The shellfish monitoring plans Information System for automatic communication between Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie (IZSve) and the Local Public Services in the northern-east of Italy. Proceedings of the 9th International Multi-Conference on Complexity, Informatics and Cybernetics (IMCIC 2018). 16-17.

# Movimentazione Traces di *Mytilus galloprovincialis* dall'Area Parco Naturale del Monte San Bartolo al Golfo di Valencia: esperienza dell'AST PESARO URBINO

E. Cordovani<sup>1</sup>, A.M. Vecchio<sup>1</sup>, S. Novelli<sup>1</sup>, A. Massi<sup>1</sup>

<sup>1</sup>) Azienda Sanitaria Territoriale Pesaro Urbino - ASTPU

**Keywords:** TRACES, *Mytilus galloprovincialis*, reimmersione, mitilicoltura

## Introduzione

Ogni anno un numero elevato di animali vivi e prodotti agroalimentari vengono movimentati all'interno dell'Unione Europea (UE) sollevando la questione di come ai cittadini possa essere garantita la sicurezza alimentare del cibo che raggiunge i loro piatti. TRACES (*TRAdE Control and Export System*) è uno strumento di gestione rappresentato da una piattaforma *online* della Commissione europea che traccia e permette la certificazione zoonosanitaria e fitosanitaria di animali, prodotti di origine animale, alimenti, mangimi e piante commercializzati all'interno dell'UE e per l'import/export verso Paesi terzi. L'obiettivo del sistema TRACES è razionalizzare il processo di certificazione e tutte le relative procedure di ingresso/uscita offrendo un flusso di lavoro completamente digitalizzato e privo di supporti cartacei, in linea con la priorità strategica della Commissione europea "*Un'Europa pronta per l'era digitale*". La Commissione europea, con questo strumento, ha intrapreso ampie azioni per garantire la sicurezza della filiera agroalimentare permettendo alle Autorità nazionali e alle parti negoziali di accelerare le procedure amministrative e di facilitare lo scambio di informazioni e la tracciabilità dei movimenti delle merci [1]. Oggi TRACES è uno strumento indispensabile utilizzato in circa 90 Paesi, con oltre 113.000 utilizzatori in tutto il mondo per il rilascio di certificati sanitari e fitosanitari e di documenti ufficiali. All'interno della piattaforma gli attori coinvolti generano documenti commerciali e le Autorità nazionali monitorano e garantiscono che gli scambi rispettino i requisiti e le condizioni definiti dalla Legislazione europea. Tale strumento accresce la lotta contro le frodi alimentari garantendo maggiore trasparenza, rintracciabilità e sicurezza alimentare e promuovendo la cooperazione e il coordinamento rafforzato tra gli *stakeholder*. TRACES è soggetto alle norme e ai requisiti stabiliti dal Regolamento (UE) 2017/625 [2] del Parlamento europeo e del Consiglio (regolamento sui controlli ufficiali) che stabilisce che TRACES è integrato come una delle componenti del sistema di gestione delle informazioni per i controlli ufficiali (IMSOC) e dal Regolamento di esecuzione (UE) 2019/1715 [3] della Commissione (regolamento IMSOC) che stabilisce norme per il funzionamento del sistema di gestione delle informazioni per i controlli ufficiali e dei suoi componenti di sistema (TRACES, iRASFF, ADIS, EUROPHYT). Il sistema TRACES è gestito dal gruppo TRACES – IMSOC, unità G.4 – Controlli ufficiali della DG SANTE.

## Summary

From December 2021 to August 2024, 1,824,300 kg of the juvenile *Mytilus galloprovincialis* species were moved from the "Area marina del Parco Naturale del Monte San Bartolo" located in the province of Pesaro Urbino (Marche Region) for subsequent re-immersion in the Gulf of Valencia (Spain), using EU\_INTRA certificates generated by the TRACES system (TRAdE Control and Export System). In 2023, a concentration and a significant increase (up to + 280%) in movements was noticed in the summer-autumn period (June-July and October-November) compared to the previous year. The year 2024, however, saw a reversal of the trend until the complete stop of movements. Considering the peculiarity of mussel farming and shifting, which occurs through the movement of entire mussel socks with their own microhabitat, specific ecological characteristics of the farming area and a rich phyto-zooplanktonic biodiversity, further investigations are desirable to establish possible changes induced in the destination marine habitat.

## Materiali e Metodi

I dati utilizzati nello studio sono stati estratti dal portale IMSOC, accedendo con credenziali AST PU al sistema TRACES, attraverso l'applicativo hub QlikSense disponibile nella sezione Analytics. La selezione dei dati è stata affinata selezionando EU\_INTRA Rolling TNTDW, che contiene le informazioni relative a certificati per la movimentazione di animali e determinati prodotti in EU, scegliendo l'App Animals/Products e successivamente Certification Date Calendar, adottando infine i seguenti filtri: anni (dal 01/12/2021 al 31/08/2024), stato del certificato: valido, luogo di spedizione: Italia, luogo di carico: Italia, paese di destinazione: Spagna, Commodity group: live molluscs, specie: *Mytilus galloprovincialis*.

## Risultati e Discussione

Lo studio ha riguardato le certificazioni TRACES emesse da Dirigenti Veterinari afferenti alla Unità Operativa Complessa (U.O.C) Igiene degli Alimenti di Origine Animale e Unità Operativa Semplice (U.O.S.) Prodotti della pesca e MEL del Dipartimento di Prevenzione dell'Azienda Sanitaria Pesaro Urbino - ASTPU (ex AV1 ASUR Marche) – Regione Marche.

Nel periodo considerato, che va dal 1 dicembre 2021 al 31 agosto 2024 sono stati sottoposti a valutazione un numero pari a 166 certificati (INTRA.EU) per la movimentazione di mitili allevati, allo stadio giovanile, della specie *Mytilus galloprovincialis*. I mitili provengono da alcuni tra gli impianti di mitilicoltura classificati (zone di produzione/stabulazione) di tipo A ai sensi del Reg. (UE) 627/2019 [4] presenti nell'Area marina del Parco Naturale del Monte San Bartolo che si estende da Gabicce Mare a Pesaro, mentre il paese di destinazione è la Spagna, nello specifico alcuni allevamenti presenti nel Golfo di Valencia (Fig. 1). I mitili dopo essere stati reimmersi e una volta raggiunta la taglia commerciale vengono immessi nel mercato come alimenti per il consumo umano. Dall'analisi dei dati è emerso che sono stati trasferiti mitili per un totale di 1.824.300 kg (Fig. 2).

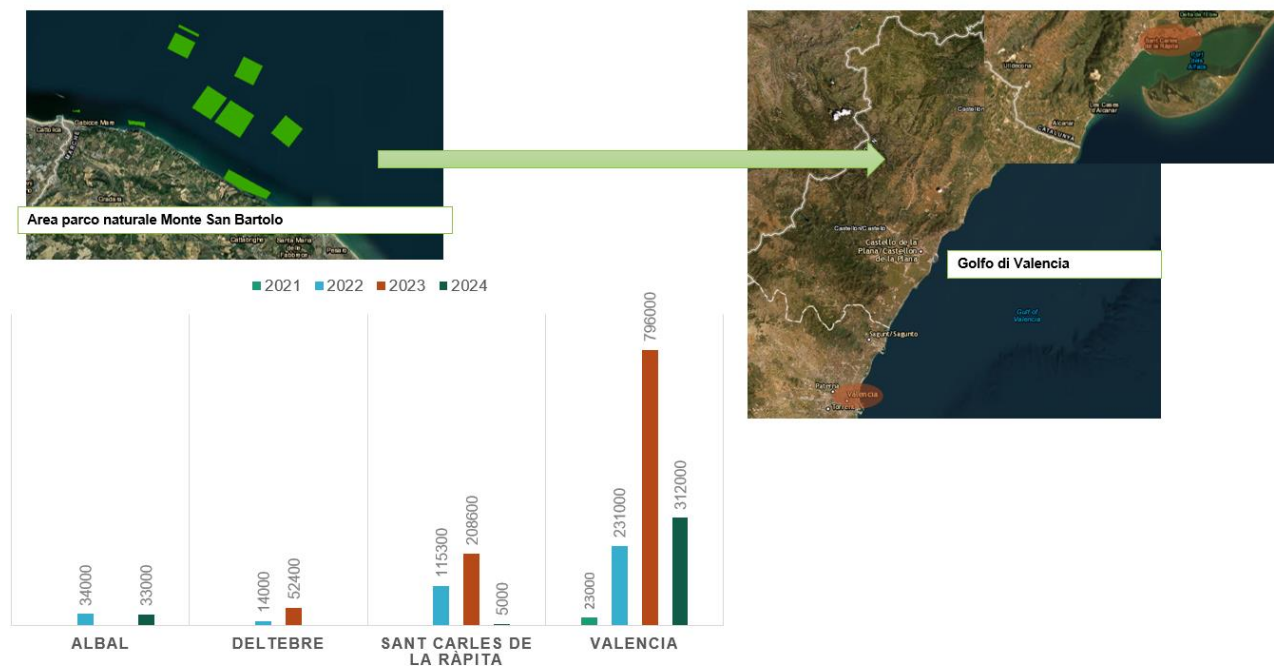


Fig.1: Particolare dello spostamento dei mitili dal luogo di origine a quello di destino espresso in Kg e riferito agli anni oggetto di valutazione.

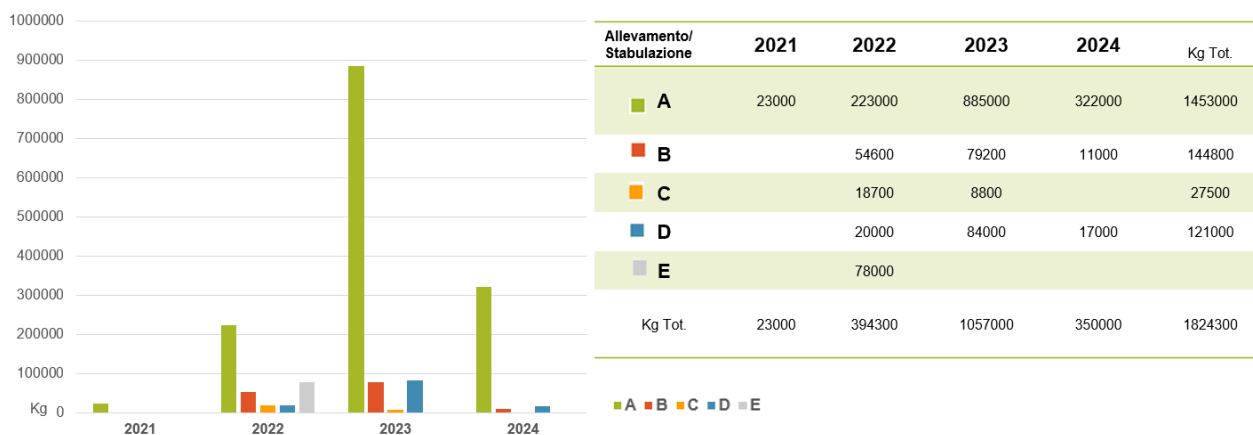


Fig.2: quantitativi di mitili movimentati negli anni di riferimento dagli allevamenti di origine

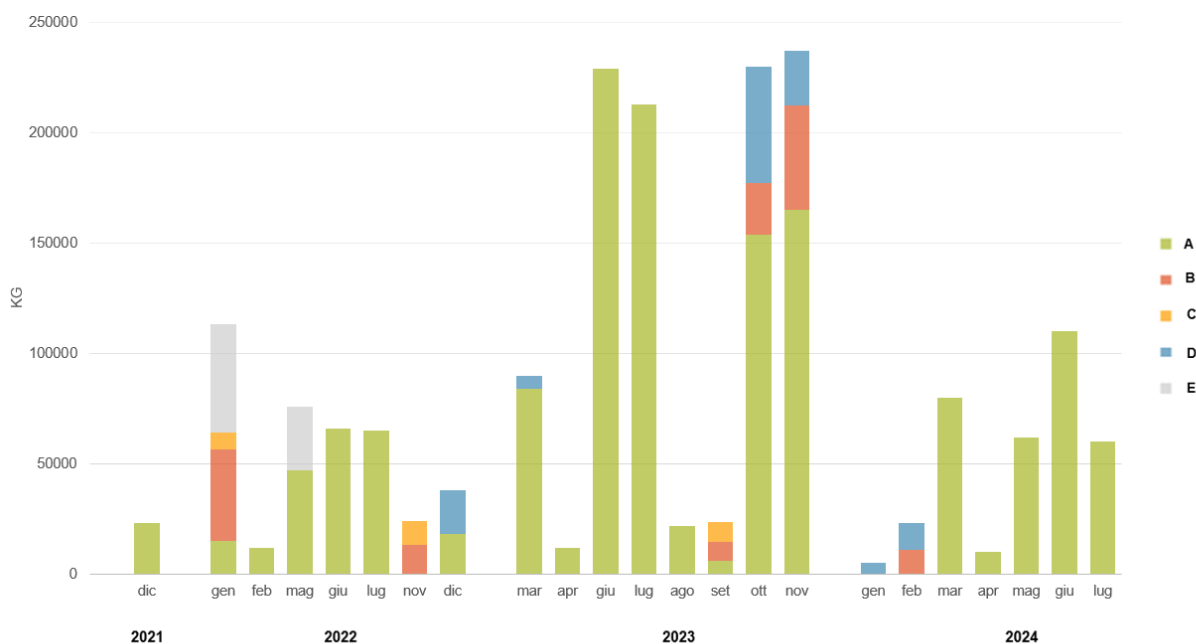


Fig.3: quantitativi di mitili movimentati per mese ed anno di riferimento

Dalla valutazione dei dati si riscontra un trend delle movimentazioni in deciso aumento negli anni, soprattutto per l'allevamento (A) che rappresenta da solo circa l'80 % del totale di mitili movimentati.

Nel 2022 il grafico mostra come tali spostamenti siano avvenuti abbastanza uniformemente nell'arco dell'intero anno, mentre nel 2023 si è riscontrata una concentrazione e un notevole incremento (fino a + 280%) degli stessi nel periodo estivo-autunnale (mesi di giugno-luglio e ottobre-novembre).

L'anno 2024 invece, ha visto un'inversione del trend in corrispondenza dapprima del periodo fine inverno / inizio primavera per la rilevazione della presenza di Biotossine algali (Ac. Okadaico e derivati totali) negli impianti di acquacoltura di origine, al di sopra del limite di conformità previsto dalla normativa vigente. Successivamente nel periodo estivo oltre ad un'iniziale riduzione, è seguita la completa interruzione delle movimentazioni a seguito della diminuzione della vitalità/aumento mortalità dei mitili potenzialmente correlate alle mutate condizioni microclimatiche marine e alla presenza di mucillagini.

I dati riportati vanno messi in relazione alla peculiarità dell'allevamento e della movimentazione dei mitili che avviene mediante lo spostamento di intere reste con un proprio microhabitat, caratteristiche ecologiche specifiche dell'area di allevamento e con una ricca biodiversità fito-zooplantonica [9]. In letteratura scientifica è già discusso l'impatto che l'ingestione e successiva ritenzione di zooplankton da parte dei molluschi bivalvi vivi produce sulle popolazioni di zooplankton residenti [5]. Tale capacità di ritenzione è stata evidenziata anche in *Mytilus edulis* nell'ordine del  $35 \pm 9,4\%$ , tenendo conto di una capacità di filtrazione compresa in un range che va da  $4.3 \pm 0.3 \text{ L h}^{-1} \text{ ind}^{-1}$  a  $12.5 \pm 1.12 \text{ L h}^{-1} \text{ g}^{-1}$  di peso tissutale secco [6]. La bibliografia dimostra inoltre come lo zooplankton contribuisca al trasferimento di metalli pesanti in tracce ai livelli trofici superiori risultando pertanto un target raccomandato per lo studio degli stessi in ambiente marino [7]. In maniera analoga, è comprovato l'accumulo di fitoplancton nell'apparato digerente in *Mytilus edulis* [8].

Alla luce di quanto esposto, auspichiamo che tali aspetti possano essere oggetto di approfondimenti relativamente alle potenziali modifiche dell'habitat marino come conseguenza della reimmissione di reste di mitili provenienti da una diversa area di origine.

#### Bibliografia:

[1] Decisione 2003/623/CE.

[2] Regolamento (UE) 2017/625.

[3] Regolamento di esecuzione (UE) 2019/1715.

[4] Regolamento di esecuzione (UE) 2019/627 della Commissione.

[5] Clare Lehane, John Davenport (2006) A 15-month study of zooplankton ingestion by farmed mussels (*Mytilus edulis*) in Bantry Bay, Southwest Ireland. Estuarine, Coastal and Shelf Science Volume 67, Issue 4, May 2006, Pages 645-652.

[6] Sonier, R., Filgueira, R., Daoud, D. and Comeau, L.A. (2018). Feeding pressure of *Mytilus edulis* and *Styela clava* on phytoplankton and zooplankton, including lobster larvae (stages I and IV). Can. Tech. Rep. Fish. Aquat. Sci. 3263: vi +19 p.

[7] M. Battuello, P. Brizio, R. Mussat Sartor, N. Nurra, D. Pessani, M.C. Abete, S. Squadrone, (2016) Zooplankton from a North Western Mediterranean area as a model of metal transfer in a marine environment. Ecological Indicators Volume 66, July 2016, Pages 440-451.

[8] G. Rouillon, J. Guerra Rivas, N. Ochoa, E. Navarro (2005) Phytoplankton composition of the stomach contents of the mussel *Mytilus edulis* L. from two populations: comparison with its food supply. Journal of Shellfish Research, 24(1):5-14.

[9] Giorgia Ravera, Monica Cangini, Samuela Capellacci, Sonia Dall'Ara, Giuseppe Prioli, Mauro Marini, Elena Manini, Antonella Penna, Silvia Casabianca (2024) Molecular monitoring of Dinophysis species assemblage in mussel farms in the Northwestern Adriatic Sea. Harmful Algae Volume 138, September 2024, 102686.

# Alteration in biometric and byssus performances in the mediterranean mussel, *mytilus galloprovincialis*, exposed to prolonged heat waves

A. De Marco<sup>1</sup>, V. A. Baldassarro<sup>1</sup>, V. Burato<sup>2</sup>, L. Calzà<sup>3</sup>, L. Giardino<sup>1</sup>, D. Montroni<sup>4</sup>, G. Falini<sup>4</sup>, L. Parma<sup>1</sup>, A. Bonaldo<sup>1</sup>

<sup>1</sup>) Department of Veterinary Medical Sciences, University of Bologna, Via Tolara di Sopra 50, 40064, Ozzano Emilia, Bologna, Italy.

<sup>2</sup>) IRET foundation ETS, Via Tolara di Sopra, 41/e, 40064, Ozzano dell'Emilia, Bologna, Italy.

<sup>3</sup>) Health Science and Technologies Interdepartmental Center for Industrial Research (HST-ICIR), University of Bologna, Via Tolara di Sopra 41/E, 40064, Ozzano Emilia, Bologna, Italy.

<sup>4</sup>) Department of Chemistry "Giacomo Ciamician", University of Bologna, Via Selmi 2, 40126, Bologna, Italy

**Keywords:** Heat wave; Thermal stress; Mediterranean mussel; Hepatosomatic index; Byssus; Collagen

## Introduction

Shifts in weather patterns and increased duration of extreme events, as prolonged heat waves, pose risks to mussel farms. High temperatures can alter the delicate balance of mussel growth and reproduction, but also the structure and solidification of byssus threads, impacting mussels' attachment to farming supports.

This study examined the influence of prolonged heat waves on Mediterranean mussels, *Mytilus galloprovincialis*, by exposing them to a simulated heat wave of 28°C for 30 days. Biometric, physiological along with byssus thread characteristics, were assessed at different time points to evaluate the mussels' stress responses. The findings suggest that prolonged heat waves can severely impact mussel aquaculture, with potential repercussions on commercial production and sector economy.

## Materials and methods

260 specimens of farmed *M. galloprovincialis* reared into 12 aquaria were divided in two groups: the control one at temperature of 20±0,5°C and the heat wave exposed group at 28±0,5°C. Mussels destined to byssus mechanical analysis, were placed on square of polypropylene (PP) film in order to simulate the attachment to PP socks used in farming.

At 3, 5, 10, 30 days exposure, mussels were sampled in both groups to determine the biometric indices of animal weight, wet and dry soft body and shell weight, condition index (CI), hepatosomatic index (HSI), clearance rate (CR), survival at air exposure. A portion of the basal foot tissues was collected at different sampling times to evaluate the expression of the three precursors genes of the byssus structural collagen, *preCOL-P*, *preCOL-D* and *preCOL-NG*. At final sampling time (30 days), byssus quantity, resistance to traction and ultrastructure were evaluated under stereoscope, rheometer analyzer and SEM observation.

## Results

About biometric indices, significant differences were found for hepatosomatic index, clearance rate and survival at air exposure. The exposed group at 30 days of exposure showed a significant reduction in the digestive gland energy reserve, compared to other time points. The same group, just after 5 days, started to filter at a rate significantly lower than the beginning of exposure. Moreover, the heat wave exposed group, at the end of thermic stress period, revealed a significant reduction in the capacity to survive compared to the other samplings and group (Fig.1).

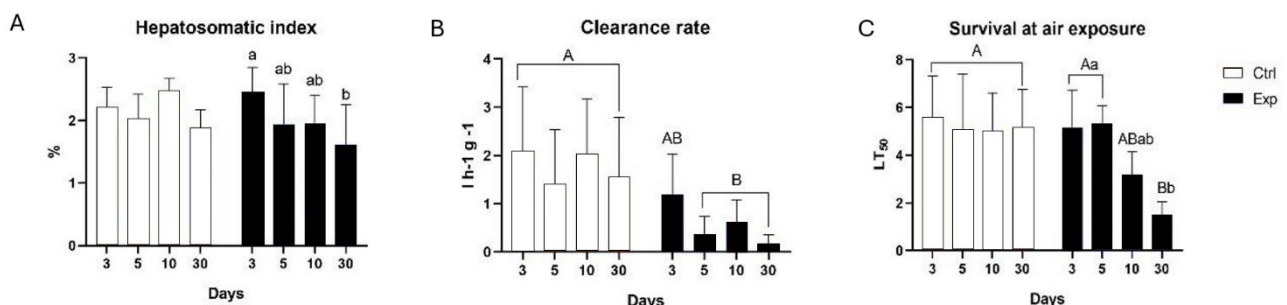


Fig. 1: Mussel HSI (A), CR (B), survival at air exposure (C). The uppercase letters (A,B) represent significant differences in two-way ANOVA ( $P < 0.05$ ) between the groups. Lowercase letters (a,b) stand for significant differences between times for the same group.

The expression of the collagen gene *preCOL-P* had a peak almost at the beginning of the trial in the exposed group, but, at long-term, showed a collapse at 30 days, as well as *preCOL-D* and *preCOL-NG* (Fig.2).



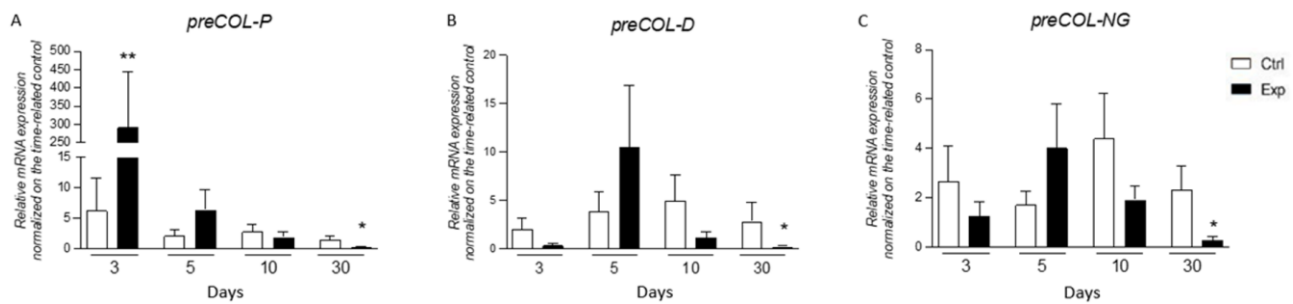


Fig. 2: Effect of temperature on *preCOL-P* (A), *preCOL-D* (B) and *preCOL-NG* (C). Asterisks represent the differences between the high temperature-exposed and non-exposed group at the same time point (\*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ).

About the mechanical resistance to the traction, the threads produced by exposed mussels were less resistant and deformable, they supported half of the maximum force compared to the control group. For the plaque adhesion resistance, no difference emerged between the groups. Counting the byssus filaments, it was found that exposed specimens made significantly fewer filaments, less than half of the control animals (Table 1).

Parameter	unit	Controls		Exposed		P value
		Ave. $\pm$ St. Dev.	N	Ave. $\pm$ St. Dev.	N	
N° threads	-	58.4 $\pm$ 23.13	10	21.6 $\pm$ 7.61	8	<b>P = 0.0007</b>
Max force of thread $\square$	N	0.5 $\pm$ 0.04	5	0.25 $\pm$ 0.08	4	<b>P = 0.0005</b>
Deformation at max force of thread $\square$	%	15 $\pm$ 1	5	10 $\pm$ 2	4	<b>P = 0.0017</b>
Max force of plaque $\square$	N	0.22 $\pm$ 0.07	3	0.16 $\pm$ 0.04	3	P = 0.3658
Deformation at max force of plaque $\square$	%	6 $\pm$ 2	3	4 $\pm$ 1	3	P = 0.1553

Table 1. Number of byssus threads, maximum force and deformation for the byssal thread resistance and plaque adhesion in the control and exposed mussels at 30<sup>th</sup> day of exposure. Data are shown as average value  $\pm$  S.D. Statistical differences are represented by P value  $< 0.05$

## Discussion

The prolongation of the thermal stress affected some biometric indices. Animals were able to face the thermal stress using the digestive gland energy resources, without the use of other tissues resources, so they did not reduce the pulp yield. The reduction in clearance rate could be a sign of decreased metabolic activity. Moreover, the prolonged heat wave has made these animals more susceptible to additional stress input, as air exposure. Finally, the capacity of the foot basal gland to express *preCOLs* genes was affected. The cost for byssus production depends on the available animal energy budget, high temperatures reduce it, consequently mussels may not have enough energy to spend for byssal collagen synthesis, which is then reflected in the reduced byssogenesis and in the lower tensile strength.

## Conclusion

In conclusion, the biometric and physiological alterations in mussels with the small amount of produced byssal threads and lower tensile strength represent a serious risk for the mussel farming and production quantity: the more lasting the warming of sea water, the more mussels might break away from the farming socks. As perspective for the future, it is necessary to activate prevention or mitigation actions to the damage, as the early harvest of the product or the selection of more resistant mussels' lines to this acute stress.

## Bibliografia

- [1] L. Xu, Y. Wang, S. Lin, H. Li, P. Qi, I. Buttino, W. Wang, B. Guo, Insights into the Response in Digestive Gland of *Mytilus coruscus* under Heat Stress Using TMT-Based Proteomics. *Animals* 12 (2023) 2248.
- [2] Y.F. Li, X.Y. Yang, Z.Y. Cheng, L.Y. Wang, W.X. Wang, X. Liang, J.L. Yang, Near-future levels of ocean temperature weaken the byssus production and performance of the mussel *Mytilus coruscus*. *Science of The Total Environment* 733 (2020) 139347.
- [3] J. Lassoued, XA. Padín, LA. Comeau, N. Bejaoui, F. Pérez, JMF. Babarro, (2021) The Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis*: responses to climate change scenarios as a function of the original habitat. *Conserv Physiol* 9(1) (2021) coaa114.
- [4] J. M. Lucas, E. Vaccaro, J. H. Waite, A molecular, morphometric and mechanical comparison of the structural elements of byssus from *Mytilus edulis* and *Mytilus galloprovincialis*. *J Exp Biol.* 205(Pt 12) (2002) 1807-17.

# **Analisi dei sierotipi di *Salmonella* spp. isolata nelle aree di produzione dei molluschi bivalvi della Regione Marche: confronto con i sierotipi identificati nelle altre matrici alimentari e non**

C. De Simoni<sup>1</sup>, C. Ciccarelli<sup>2</sup>

<sup>1</sup>) Veterinaria specialista ICPPA

<sup>2</sup>) Azienda Sanitaria Territoriale Ascoli Piceno

**Keywords:** *Salmonella*, *Chamelea gallina*, *Mytilus galloprovincialis*, sierotipo

## **Introduzione**

Il Reg. UE/2019/627, non indica i parametri da sottoporre a controllo nell'ambito del monitoraggio microbiologico delle aree di produzione dei molluschi bivalvi, tuttavia prevede che i risultati del monitoraggio per *Escherichia coli* vengano utilizzati per determinare lo status sanitario delle relative aree di produzione. Nella Regione Marche il monitoraggio microbiologico delle aree di produzione dei molluschi bivalvi prevede entrambi i parametri *E. coli* e *Salmonella* spp., testati su singola unità campionaria con frequenza mensile. Per *E. coli* si utilizza il conteggio mediante MPN/100g con metodo EN ISO 16649-3 e per *Salmonella* spp. la presenza/assenza su 25g con metodo EN ISO 6579-1: in caso di presenza viene eseguita l'identificazione del sierotipo.

Riguardo alla presenza di *Salmonella* spp. nelle acque costiere, e nei molluschi bivalvi in particolare, sono stati condotti diversi studi per valutare la distribuzione geografica e temporale, identificare i sierotipi e studiare la relazione tra i fattori ambientali [3,10,11]. Per esempio, in uno studio condotto nelle acque del Golfo di Napoli, con campionamenti effettuati su scarichi urbani, industriali e rurali, ubicati lungo il litorale dalla foce del fiume Volturno alla città di Torre del Greco, hanno identificato 40 diversi sierotipi di *Salmonella* spp. [2].

Utilizzando i dati disponibili sul sistema informativo SINVSA ed i dati pubblicati dal Centro di Riferimento Regionale degli Enteropatogeni [4,5,6,7,8,9,12,13] sui sierotipi identificati nella Regione Marche su un'ampia gamma di matrici di origine sia marina che terrestre, questo studio intende confrontare la diversa distribuzione dei sierotipi identificati evidenziando analogie e differenze tra i sierotipi legati all'ambiente terrestre e quelli riscontrati nell'ambiente marino costiero regionale.

## **Summary**

The aim of this study was to analyse the distribution of *Salmonella*'s serotypes identified during the monitoring of the bivalve molluscs harvesting areas in the Marche region by comparing them with those found in other matrices (zootechnical, food, environmental and human) in the same region. For bivalve molluscs, data were obtained from the SINVSA information system of the Ministry of Health and, for the other matrices, from the annual reports of the Regional Reference Centre for Pathogenic Enterobacteria managed by IZSUM. The analysis of the data allowed recognizing two large groups of serotypes:

- The first, represented by a few serotypes but responsible for most cases of positive; they show a higher survival capacity in the coastal marine environment, and the cases are not related to sources of contamination close in space and/or time.
- The second group, represented by all other serotypes and which gave rise to sporadic positive, does not appear to show survival capacity in the marine environment and whose episodes could be attributed to sources of contamination close in space and/or time.

## **Materiali e metodi**

Per lo studio sono stati presi in considerazione i risultati di tutti i campioni, eseguiti dal 2015 al 2023 nell'ambito del monitoraggio microbiologico per *Salmonella* spp. delle aree di produzione di vongole (*Chamelea gallina*) e mitili (*Mytilus galloprovincialis*) nella Regione Marche, per un totale di n. 103 stazioni di campionamento distribuite lungo tutta la costa regionale: i dati utilizzati sono quelli presenti nel Sistema Informativo SINVSA del Ministero della Salute italiano. Tutti i campioni risultati positivi per *Salmonella* spp. e sottoposti a sierotipizzazione sono stati classificati per sierotipo, matrice, anno, mese e territorio amministrativo di origine con cui sono stati realizzati grafici. Inoltre sono stati raccolti e classificati tutti i sierotipi identificati con gli isolamenti da matrici umane, zootecniche, alimentari e ambientali provenienti dalla Regione Marche nello stesso periodo temporale, come pubblicati dal Centro Regionale di Riferimento per gli Enterobatteri Patogeni (CRREP) di Tolentino (MC) dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche.

## **Risultati e discussione**

Nella Regione Marche, come nelle altre regioni italiane, per meglio garantire i criteri di sicurezza microbiologica dei molluschi bivalvi vivi, il monitoraggio delle aree di produzione viene attuato sia per *Escherichia coli* che per *Salmonella* spp. e i risultati sono disponibili nel sistema informativo SINVSA. Sempre nella Regione Marche il Centro Regionale di Riferimento per gli Enterobatteri Patogeni (CRREP) di Tolentino (MC) dell'IZSUM, esegue la sierotipizzazione di tutte le *Salmonelle* isolate nella regione e pubblica, con cadenza annuale una

elaborazione dei risultati ottenuti. A partire da questi dati è stata confrontata la distribuzione dei sierotipi di *Salmonella* spp. identificati nell'ambiente marino costiero regionale con quella dei sierotipi presenti sulle matrici animale, alimentare e ambientale di origine terrestre.

La tabella 1 riassume tutti i dati disponibili sugli isolamenti di *Salmonella* spp. avvenuti nella Regione Marche nel periodo 2015-2023 mentre nel Grafico 1 è stata riassunta la distribuzione dei principali sierotipi identificati nei molluschi bivalvi: appare evidente come, a fronte di un numero non trascurabile di sierotipi differenti (in tutto 25 su 90 campioni) i 6 sierotipi più rappresentati e cioè *S. Veneziana*, *S. Derby*, *S. Typhimurium*, *monophasic – 4*, *S. Typhimurium*, *S. Napoli* e *S. enterica subsp. Diarizonae* rappresentino il 59% del totale.

Nel Grafico 2, che mostra la distribuzione di tutti i sierotipi isolati sui molluschi bivalvi, distinta per anno e matrice, non è possibile riconoscere patterns di distribuzione: tuttavia, i 4 casi di *Salmonella* 4,12:i:- sono stati riscontrati solo in vongole nel 2016 e gli altri 4 casi di *S. Brandenburg* sempre in vongole ma solo nel 2018.

Il Grafico 3 mostra la distribuzione di tutti i sierotipi isolati sui molluschi bivalvi, distinta per provincia: appare evidente lo sbilanciamento tra il nord delle Marche dove la sola provincia di Pesaro-Urbino raccoglie il 45% dei casi e il 70% dei sierotipi isolati.

I grafici 4, 5 e 6 riassumono invece la distribuzione dei sierotipi identificati rispettivamente su matrici animali di origine zootecnica, alimentare e ambientale (acque di lago, fiume e potabili): tra le matrici di origine zootecnica, soprattutto negli avicoli e nelle matrici alimentari, prevalentemente prodotti avicoli, il sierotipo più frequente è rappresentato da *S. Infantis*; invece nelle matrici ambientali, rappresentate dalle acque interne, è *S. Veneziana* il sierotipo predominante.

La tabella 2, partendo dai principali sierotipi presenti nei molluschi bivalvi, riporta i valori complessivi ottenuti nelle altre matrici, consentendo così un confronto immediato: dai dati sembrerebbe che *S. Veneziana* prediliga l'ambiente acquatico, sia acque dolci che marine costiere, e questo vale in parte anche per *S. Typhimurium* e *S. Napoli*.

L'elevato tasso di casi umani legati a *S. Typhimurium*, *monophasic – 4* e *S. Enteritidis* potrebbe essere attribuito solo in minima parte ai molluschi bivalvi; per *S. Infantis* gli elevati tassi riscontrati in matrici zootecniche e su alimenti non ittici, non sembrano aver avuto ripercussioni significative sull'ambiente marino costiero.

In conclusione l'analisi dei dati relativi ai sierotipi di *Salmonella* spp. identificati nel corso del monitoraggio microbiologico dei molluschi bivalvi della Regione Marche ci permette di riconoscere due gruppi con comportamenti nettamente distinti: il primo rappresentato da quelle identificate più frequentemente (*S. Veneziana*, *S. Derby*, *S. Typhimurium*, *monophasic – 4*, *S. Typhimurium*, *S. Napoli* e *S. enterica subsp. Diarizonae*) che, in accordo con quanto già riscontrato da altri autori [3,10,11], sembrano mostrare una maggiore capacità di sopravvivenza nell'ambiente marino e, pertanto, la loro presenza nei molluschi bivalvi potrebbe non essere riconducibile a fonti di contaminazione vicine nello spazio e/o nel tempo. Il secondo gruppo invece, rappresentato dai restanti sierotipi che hanno dato luogo a pochi episodi per lo più isolati, probabilmente hanno una ridotta capacità di sopravvivenza nell'ambiente marino: gli episodi a loro collegati potrebbero essere riconducibili a fonti di contaminazione molto vicine nello spazio e/o nel tempo. Il comportamento dei due gruppi sarebbe coerente con quanto recentemente evidenziato da altri autori [1] che hanno dimostrato come le positività riscontrate nelle aree di produzione dei molluschi bivalvi della Regione Marche, nello stesso periodo preso in considerazione da questo studio, abbiano assunto un andamento casuale riconosciuto come significativo dal punto di vista statistico.

## Bibliografia

- [1] Ciccarelli C., Semeraro A. M., Di Trani V., D'Aurizio G., Blasi G., Leinoudi M., De Simoni C., Ciccarelli E. (2024). *Monitoraggio microbiologico delle aree di produzione dei molluschi bivalvi: l'importanza del parametro Salmonella*. It J Food Safety: 2024:12124
- [2] Cioffi B., Ianiro G., Iaccarino D., D'Apice F., Ferraro A., Race M., Spasiano D., Esposito E., Monini M., Serra F., Cozza D., Di Nocera F., De Maio L., Amoroso M.G., De Carlo E., Fusco G., (2021). *A potential risk assessment tool to monitor pathogens circulation in coastal waters*. Environ Res. 200:111748
- [3] Martinez-Urtaza J, Saco M, de Novoa J, Perez-Piñeiro P, Peiteado J, Lozano-Leon A, Garcia-Martin O. (2004). *Influence of environmental factors and human activity on the presence of Salmonella serovars in a marine environment*. Appl Environ Microbiol 70:4 2089-97.5.
- [4] Napoleoni M., Medici L., Staffolani M., Fisichella S. (2018) *Dati relativi agli isolamenti di batteri enteropatogeni effettuati da casi clinici umani, da animali, da alimenti e da ambiente nella Regione Marche - anno 2017*. Sanità Pubblica Veterinaria 2018:110.
- [5] Napoleoni M., Medici L., Staffolani M., Fisichella S (2019) *Dati relativi agli isolamenti di batteri enteropatogeni effettuati da casi clinici umani, da animali, da alimenti e da ambiente nell'anno 2018 nella Regione Marche*. Sanità Pubblica Veterinaria 2019:114.
- [6] Napoleoni M., Staffolani M., Pazzaglia I., Fisichella S.. (2020) *Dati relativi agli isolamenti di batteri enteropatogeni effettuati da casi clinici umani, da animali, da alimenti e da ambiente nell'anno 2019 nella Regione Marche*. Sanità Pubblica Veterinaria 2020:118.
- [7] Napoleoni M., Silenzi V., Staffolani M., Guidi F., Blasi G., Fisichella S., Rocchegiani E.. (2021) *Dati relativi agli isolamenti di batteri enteropatogeni effettuati da casi clinici umani, da campioni di origine animale, alimentare e ambientale nell'anno 2020 nella Regione Marche*. Sanità Pubblica Veterinaria 2021:125.
- [8] Napoleoni M., Staffolani M., Silenzi V., Blasi G., Rocchegiani E. (2022) *Dati relativi agli isolamenti di batteri enteropatogeni effettuati da casi clinici umani, da campioni di origine animale, alimentare e ambientale nell'anno 2021 nella Regione Marche*. Sanità Pubblica Veterinaria 2022:131



- [9] Napoleoni M., Staffolani M., Silenzi V., Blasi G., Rocchegiani E. (2023) *Dati relativi agli isolamenti di batteri enteropatogeni effettuati da casi clinici umani, da campioni di origine animale, alimentare e ambientale nell'anno 2022 nella Regione Marche*. Sanità Pubblica Veterinaria 2023:137
- [10] Setti I, Rodriguez-Castro A, Pata MP, Cadarso-Suarez C, Yacoubi B, Bensmael L, Moukrim A, Martinez-Urtaza J. (2009). *Characteristics and Dynamics of Salmonella Contamination along the Coast of Agadir, Morocco*. Appl Environ Microbiol. 75:24 7700-9.
- [11] Simental L, Martinez-Urtaza J. (2008). *Climate Patterns Governing the Presence and Permanence of Salmonellae in Coastal Areas of Bahía de Todos Santos, Mexico*. Appl Environ Microbiol. 74:19 5918-24.
- [12] Staffolani M., Medici L., Napoleoni M., Fisichella S. (2016). *Dati relativi agli isolamenti di batteri enteropatogeni effettuati da casi clinici umani, da animali, da alimenti e da ambiente nell'anno 2015 nella Regione Marche*. Sanità Pubblica Veterinaria 2016:95.
- [13] Staffolani M., Medici L., Napoleoni M., Fisichella S. (2017). *Dati relativi agli isolamenti di batteri enteropatogeni effettuati da casi clinici umani, da animali, da alimenti e da ambiente nell'anno 2016 nella Regione Marche*. Sanità Pubblica Veterinaria: 2017:100.

Tabella 1: isolamenti di *Salmonella* spp. nella Regione Marche (ND: dato non disponibile)

Anno	Molluschi bivalvi	Animali	Alimenti	Ambiente	Casi nell'uomo
2015	17	36	163	52	82
2016	16	37	91	51	100
2017	8	24	76	68	135
2018	13	199	169	101	142
2019	8	249	156	155	163
2020	9	386	196	229	247
2021	7	27	91	166	159
2022	8	114	196	554	318
2023	4	ND	ND	ND	ND

Tabella 2: sierotipi di *Salmonella* spp. maggiormente isolati nella Regione Marche: periodo 2015-2022

Sierotipo	Molluschi bivalvi	Animali	Alimenti ittici	Alimenti non ittici	Ambiente	Casi nell'uomo
S. Veneziana	12	16	11	0	73	7
S. Derby	10	71	13	123	0	38
S. Typhimurium, monophasic - 4	9	62	13	181	6	647
S. Typhimurium	8	26	13	18	12	63
S. Napoli	6	0	4	0	8	23
S. enterica subsp. diarizonae	6	14	0	14	2	5
S. Infantis	5	319	7	282	0	39
S. Enteritidis	3	77	4	80	2	243

Grafico 1: principali sierotipi isolati nella Regione Marche con il monitoraggio delle aree di produzione di molluschi bivalvi nel periodo 2015-2023

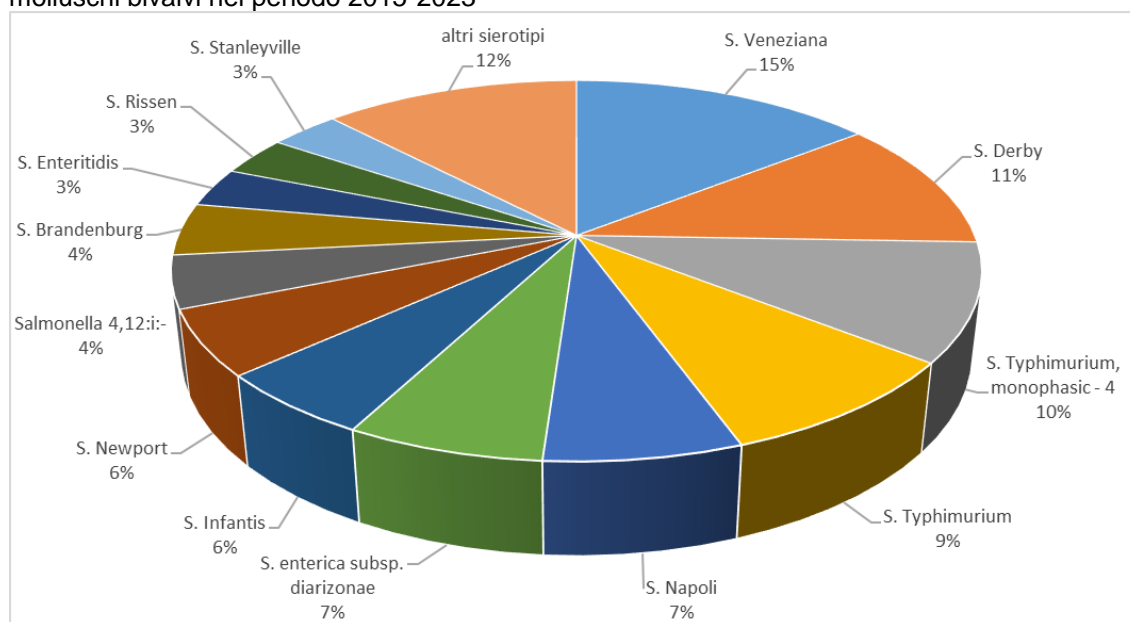


Grafico 2: monitoraggio delle aree di produzione di molluschi bivalvi nella Regione Marche: distribuzione dei sierotipi di *Salmonella* spp. in base ad anno e matrice

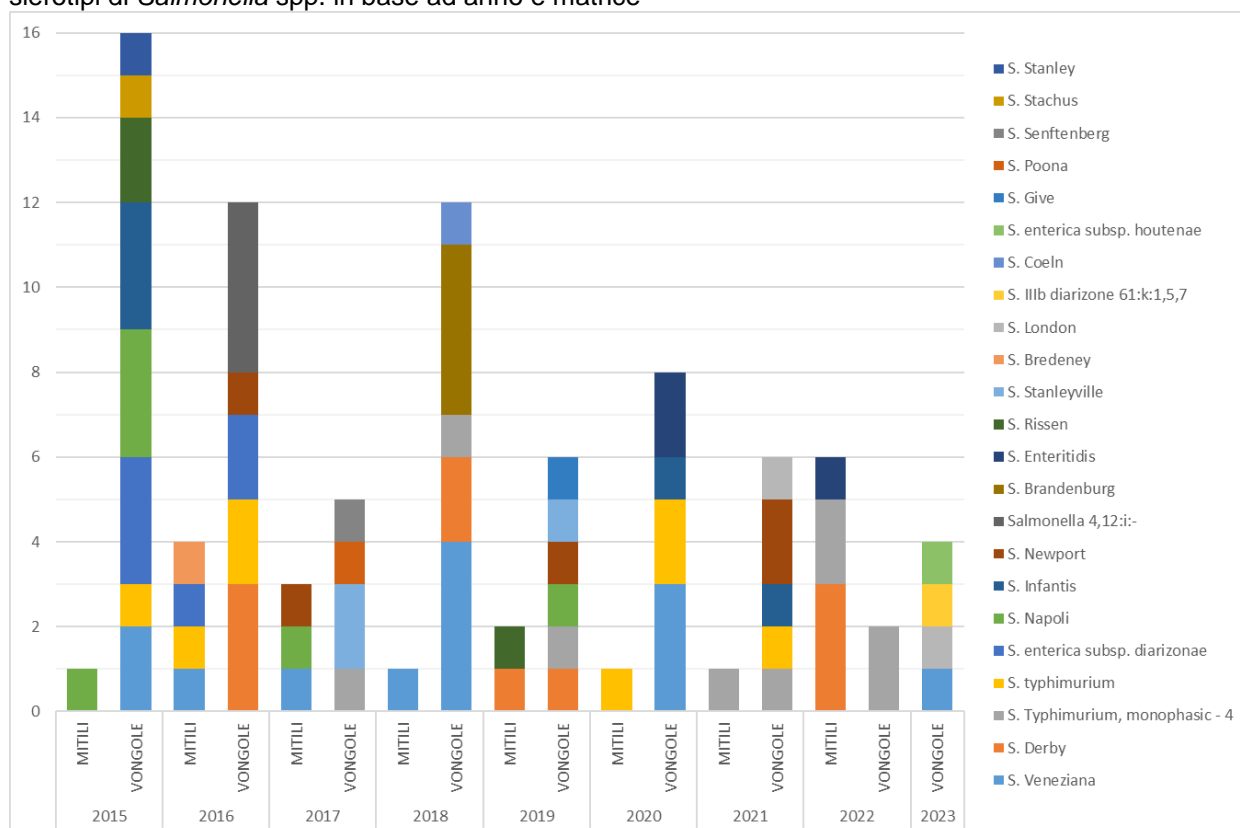


Grafico 3: monitoraggio delle aree di produzione di molluschi bivalvi nella Regione Marche: distribuzione dei sierotipi di *Salmonella* spp. su base provinciale nel periodo 2015-2023

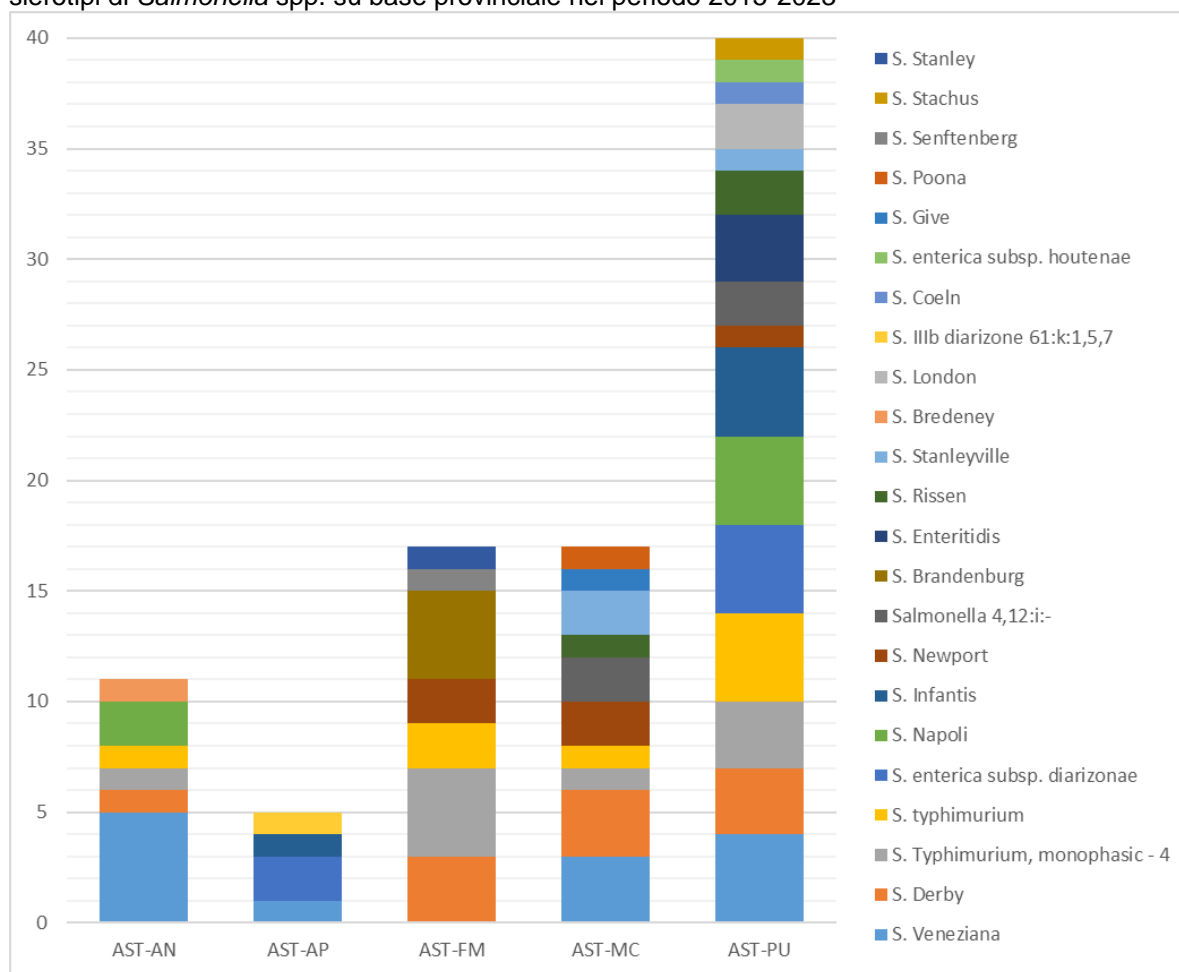


Grafico 4: distribuzione dei sierotipi di *Salmonella* spp. isolati nella Regione Marche da matrici animali

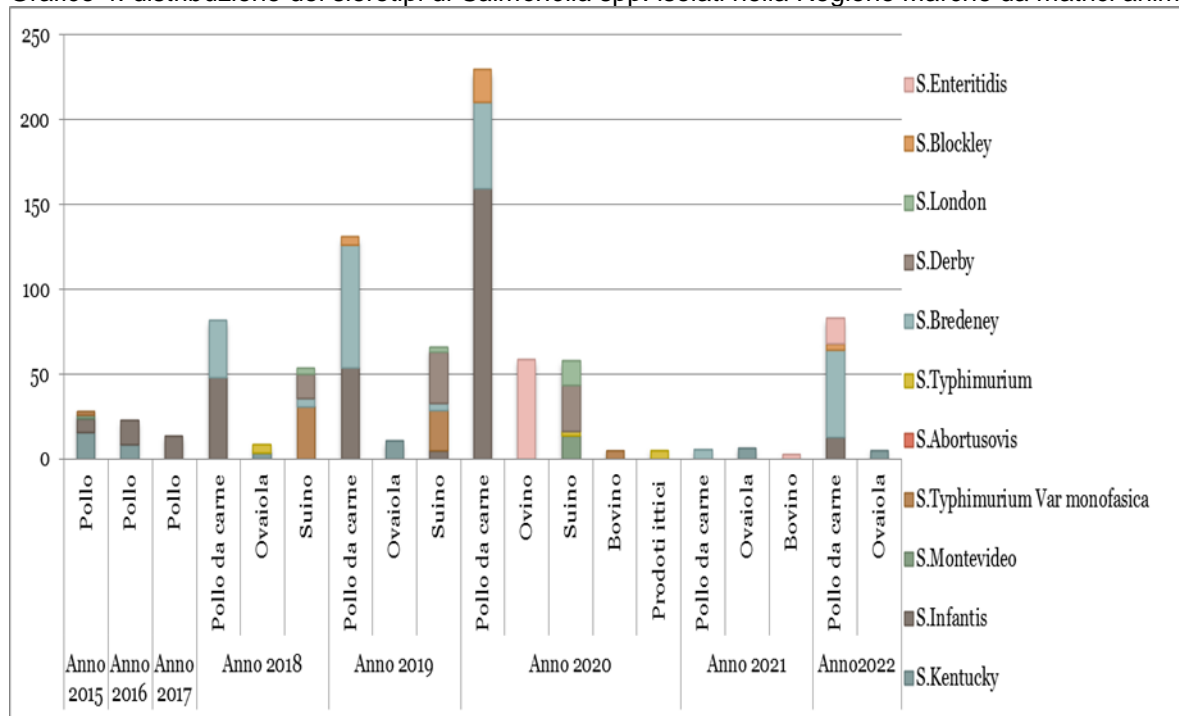


Grafico 5: distribuzione dei sierotipi di *Salmonella* spp. isolati nella Regione Marche da matrici alimentari

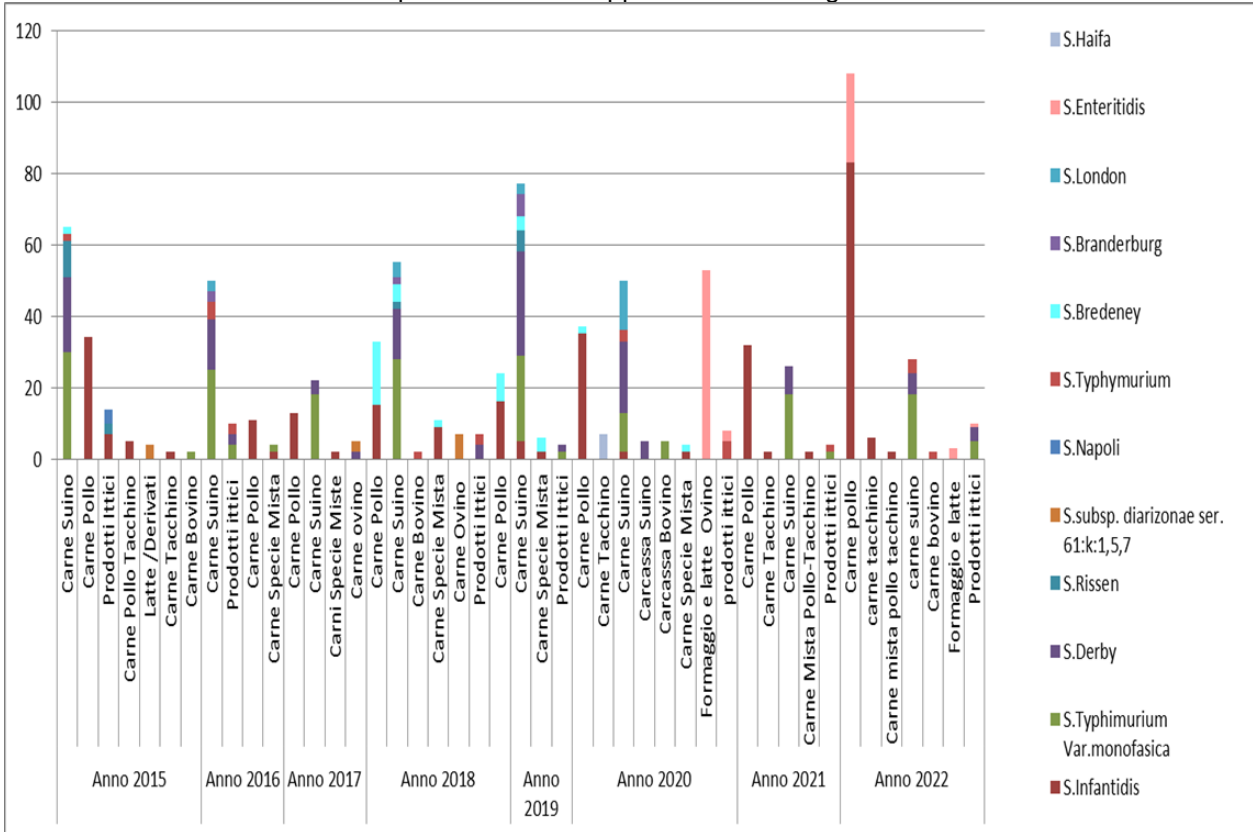
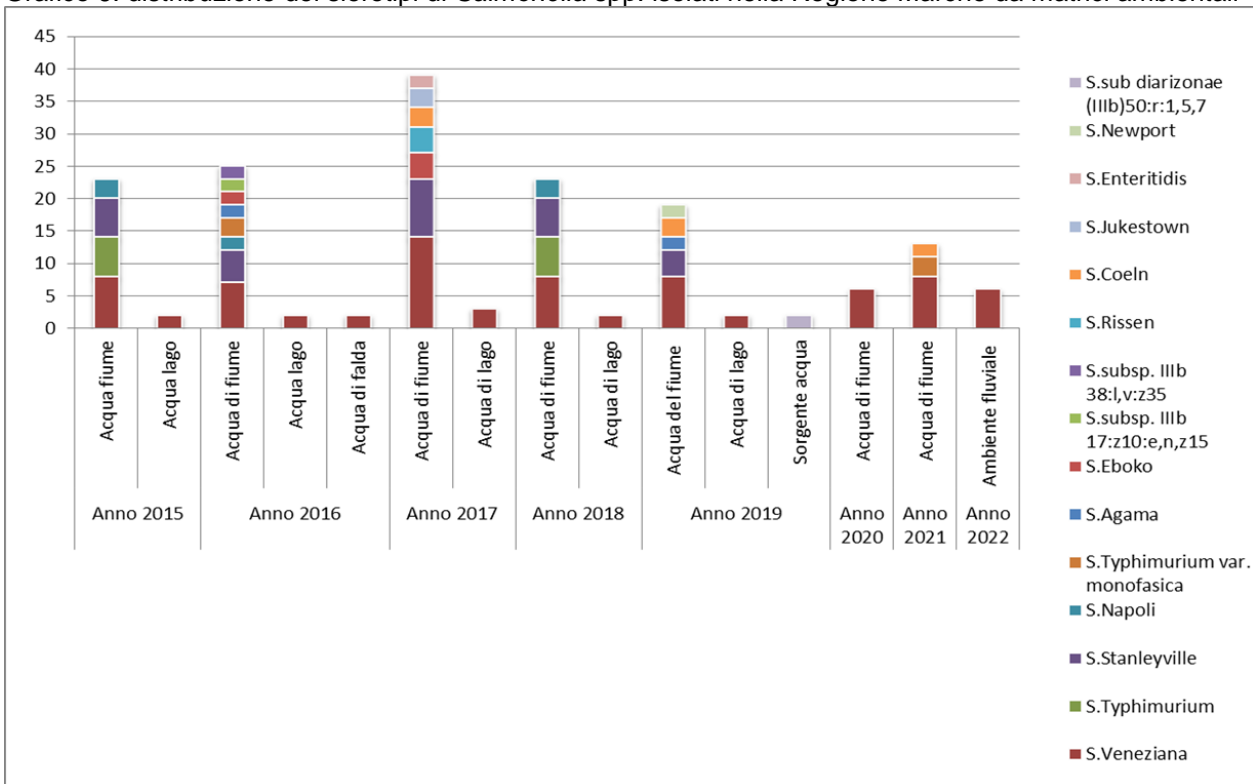


Grafico 6: distribuzione dei sierotipi di *Salmonella* spp. isolati nella Regione Marche da matrici ambientali



# Analisi microbiologiche su campioni ufficiali di molluschi bivalvi e studio delle caratteristiche di antibiotico-resistenza degli isolati

P. Di Taranto<sup>1</sup>, G. Normanno<sup>2</sup>, G. Castelli<sup>1</sup>, I. Ciuffreda<sup>3</sup>, C. Pedarra<sup>1</sup>, S. Faleo<sup>1</sup>, A. Didonna<sup>1</sup>, G. Occhiochiuso<sup>1</sup>, L. D'Attoli<sup>1</sup>, P. Selicato<sup>1</sup>, V. Rondinone<sup>1</sup>, L. Pace<sup>1</sup>, D. Galante<sup>1</sup>, V. Manzulli<sup>1</sup>, L. Serrecchia<sup>1</sup>, D. Farina<sup>1</sup>, C. Ortello<sup>1</sup>, A. Scarinci<sup>1</sup>, D. Belluscio<sup>1</sup>, L. Del Sambro<sup>1</sup>, L. Capozzi<sup>1</sup>, A. Parisi<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Puglia e della Basilicata – Foggia

<sup>2</sup> Dipartimento di Scienze Agrarie, Alimenti, Risorse Naturali e Ingegneria – Università degli Studi di Foggia

<sup>3</sup> Servizio Igiene degli alimenti di origine animale - Azienda Sanitaria Locale Foggia

**Keywords:** molluschi bivalvi, *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Vibrio* spp., antibiotico-resistenza

## Introduzione

La Puglia è ai primi posti a livello nazionale per produzione e consumo di molluschi bivalvi (MB), organismi filtratori capaci di concentrare organismi patogeni eventualmente presenti nell'ambiente marino [1]. I MB sono tradizionalmente consumati crudi in molte regioni del Meridione, pertanto, frequentemente si rendono responsabili di malattie a trasmissione alimentare (MTA) [2]. L'operatore primario e il dettagliante sono tenuti al rispetto dei requisiti sanitari e dei criteri microbiologici stabiliti dalla normativa unionale per i MB nelle diverse fasi della filiera. Lo scopo di questo lavoro è stato quello di verificare la qualità microbiologica dei campioni ufficiali di MB prelevati nella parte centro-settentrionale della Regione Puglia. In particolare, sono state eseguite analisi microbiologiche per la determinazione di *Escherichia coli*, *Salmonella* spp. e *Vibrio* spp. ed è stato effettuato uno studio sulle caratteristiche fenotipiche di antibiotico-resistenza dei ceppi isolati.

## Summary

Apulia Region is at the forefront at national level of production and consumption of bivalve molluscs, filter feeding organisms capable of concentrating pathogenic organisms that may be present in the marine environment. Bivalve molluscs are traditionally consumed raw in Southern Italy and, therefore, can cause foodborne diseases. Food business operators have to comply with the health requirements and microbiological criteria set out in EU legislation for bivalve molluscs at different stages of the supply chain. The aim of this work was to verify the microbiological quality of bivalve molluscs samples collected in the central-northern part of Apulia Region by official authorities. In particular, microbiological analyses were carried out for the detection of *Escherichia coli*, *Salmonella* spp. and *Vibrio* spp. and the isolated strains were analysed in order to determine the phenotypic antimicrobial resistance profile.

## Materiali e metodi

Tra gennaio 2023 e giugno 2024 presso il laboratorio della S. S. Microbiologia degli Alimenti di Foggia dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Puglia e della Basilicata sono stati esaminati 221 campioni ufficiali di molluschi bivalvi prelevati dal personale del Servizio Veterinario della ASL di Foggia e della ASL Barletta Andria Trani (BAT). Di questi, 144 campioni sono stati prelevati nell'ambito del Piano di Controllo Regionale Pluriennale (PCR) e 77 campioni nell'ambito del piano di monitoraggio dei molluschi bivalvi in aree già classificate. Per tutti i campioni è stata eseguita la conta in MPN per *E. coli* secondo la UNI EN ISO 16649-3:2015/EC1:2017 e la ricerca di *Salmonella* spp. secondo la ISO 6579-1:2017/Amd1:2020 (escluso l'annesso D). La conferma delle colonie riferibili a *Salmonella* spp. è stata effettuata mediante MALDI-TOF MS (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation - Time of Flight Mass Spectrometry) seguendo il protocollo riportato in PT/MA/089:2023 rev.2. Gli isolati di *Salmonella* spp. sono stati sottoposti alla prova di sierotipizzazione secondo la ISO/TR 6579-3:2014 e alla determinazione della minima concentrazione inibente (MIC) mediante l'utilizzo di piastre commerciali Sensititre™ EUVSEC 3 (Thermo Scientific) contenenti i composti specificati nella Decisione della Commissione (UE) 2020/1729. Per l'interpretazione dei risultati della MIC sono stati utilizzati i valori cut-off epidemiologici forniti da EUCAST (European Committee on antimicrobial susceptibility testing). Su 26 campioni, in quanto prelevati alla distribuzione, è stata eseguita anche la ricerca di *Vibrio* spp. ai sensi della ISO 21872-1:2017/Amd1:2023.

## Risultati e discussione

Undici campioni (4,97%) sono risultati non conformi; nel dettaglio, 7 (63,63%) degli 11 campioni sfavorevoli sono stati prelevati nell'ambito del PCR e i restanti 4 (36,36%) nell'ambito del piano di monitoraggio. Per quanto riguarda i campioni sfavorevoli prelevati nell'ambito del PCR, trattasi, in 4 casi su 7, di non conformità analitiche dovute a livelli di *Escherichia coli* superiori agli standard stabiliti dalla normativa vigente e, per i restanti casi sfavorevoli, di non conformità legate alla rilevazione di *Salmonella* spp.. Per quanto riguarda i 4 campioni sfavorevoli prelevati nell'ambito del piano di monitoraggio, trattasi in 2 casi di livelli di *Escherichia coli* superiori agli standard stabiliti dalla normativa vigente e in 2 casi di non conformità legate alla rilevazione di *Salmonella* spp.. La prova di sierotipizzazione effettuata sugli isolati di *Salmonella* ha consentito di rilevare

S. Enteritidis e S. Kasenyi dai campioni prelevati nell'ambito nel piano di monitoraggio e S. Manchester, S. Infantis e S. Goldcoast dai campioni prelevati nell'ambito del PCR. Gli isolati di S. Enteritidis e di S. Goldcoast hanno mostrato sensibilità a tutti gli antibiotici testati; gli isolati di S. Kasenyi hanno mostrato resistenza solo al sulfatemossazolo; gli isolati di S. Manchester e di S. Infantis hanno mostrato un profilo multiresistente (multidrug resistance, MDR) in quanto resistenti a più di 3 classi di antibiotici, più precisamente al sulfatemossazolo, trimetoprim, tetraciclina, acido nalidixico, tigeciclina, ciprofloxacina ed ampicillina. *Vibrio* spp. non è stato isolato da alcun campione. L'indagine effettuata fornisce una buona fotografia della qualità microbiologica complessiva dei molluschi bivalvi dell'area marina indagata. I dati ottenuti sono inferiori a quelli riportati da uno studio effettuato tra il 2016 e il 2021 su mitili prelevati lungo le coste della Campania dove le percentuali di non conformità per *E. coli* sono state pari al 19,6% [3] e superiori ai risultati pubblicati in un lavoro del 2020 effettuato in Sardegna dove non si sono registrate non conformità per *E. coli* [4]. Il dato ottenuto in merito alla rilevazione di *Vibrio* spp. è diverso rispetto a quanto riscontrato in un lavoro del 2022 in cui il 38,2% di 296 campioni di molluschi bivalvi prelevati lungo la costa nord della Puglia è risultato sfavorevole [5]. Nel corso di questo lavoro è stato possibile mettere in relazione la presenza di *E. coli* e di *Salmonella* con alcuni parametri di ordine ambientale. Si è visto infatti che il maggior numero di esiti sfavorevoli, si sono registrati nei mesi invernali (da gennaio ad aprile), periodo dell'anno caratterizzato da abbondante piovosità che determina anche l'aumento della portata dei numerosi torrenti che sfociano nell'area considerata; inoltre, è noto che in questo periodo dell'anno risulta maggiore l'attività filtrante dei molluschi. Tale situazione è comparabile a quanto rinvenuto da Di Taranto *et al.* in un lavoro effettuato nell'ambito del monitoraggio delle aree classificate per molluschi bivalvi nel medio Adriatico nel periodo 2020-2022 [6]. Per quanto riguarda il test di sensibilità antimicrobica effettuato sui 5 isolati di *Salmonella* spp., solo i ceppi di S. Manchester e di S. Infantis hanno mostrato un profilo MDR. Tale dato è simile a quello riportato in un lavoro del 2022 sui molluschi bivalvi campionati in Puglia in cui solo un isolato di S. Typhimurium è risultato resistente a numerosi antibiotici [5]. I nostri isolati di S. Manchester e di S. Infantis mostrano sensibilità verso gli aminoglicosidi ma sono risultati resistenti a penicilline e tetracicline confermando che la resistenza a queste classi antibiotiche è ampiamente diffusa negli isolati provenienti dal Mar Adriatico [7]. Risulta molto preoccupante la resistenza dei nostri isolati nei confronti dei fluorochinoloni, in quanto questi antibiotici sono ampiamente usati in medicina umana contro le salmonellosi invasive, e nei confronti della ampicillina e della tetraciclina che sono impiegate in medicina veterinaria come trattamento di prima linea per le infezioni animali [8]. A seguito delle non conformità riscontrate c'è stato un tempestivo ed efficace intervento dell'autorità competente con l'emissione di specifici provvedimenti e ulteriori controlli. Il presente lavoro ha messo in evidenza l'importanza dell'attività svolta dall'Autorità Competente e dal laboratorio ufficiale del IZS della Puglia e della Basilicata nell'ambito dei controlli ufficiali sui molluschi bivalvi consentendo di contribuire a garantire la sicurezza alimentare e tutelare la salute del consumatore.

## Bibliografia

- [1] Normanno G., Parisi A., Addante N., Quaglia N. C., Dambrosio A., Montagna C., Chiocco, D., 2006. *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio vulnificus* and microorganisms of fecal origin in mussels (*Mytilus galloprovincialis*) sold in the Puglia region (Italy). International journal of food microbiology, 106(2), 219-222.
- [2] Parisi A., Normanno G., Addante N., Dambrosio A., Montagna C. O., Quaglia N. C., Celano G.V., Chiocco D., 2004. Market survey of *Vibrio* spp. and other microorganisms in Italian shellfish. Journal of food protection, 67(10), 2284-2287.
- [3] Pellicanò R., Brunetti R., Toscano T., Smeraldo S., Baldi L., Cavallo S., Capone S., Colarusso G., 2023. Risk valuation for *E. coli* contamination in Campania region shellfish from 2016 to 2021. Heliyon, 9(11).
- [4] Lamon S., Piras F., Meloni D., Consolati S.G., Mureddu A., 2020. Enumeration of *Escherichia coli* and determination of *Salmonella* spp. and verotoxin-genic *Escherichia coli* in shellfish (*Mytilus galloprovincialis* and *Ruditapes decussatus*) harvested in Sardinia, Italy. Italian Journal of Food Safety, 9(4), pp.195-200.
- [5] Mancini M.E., Alessiani A., Donatiello A., Didonna A., D'Attoli L., Faleo S., Occhiochiuso G., Carella F., Di Taranto P., Pace L., Rondinoine V., Damato A.M., Coppola R., Pedarra C., Goffredo E., 2023. Systematic Survey of *Vibrio* spp and *Salmonella* spp. in Bivalve Shellfish in Apulia Region (Italy): Prevalence and Antimicrobial Resistance. Microorganisms, 11(2), 450.
- [6] Di Taranto P., Torzi G., Di Nardo W., Di Fonzo F., Pagano F., Genovesi M., Barbone F., Rossi Q., Di Renzo L., Nerone E., Nardella R., Normanno G., Parisi A., 2023. Attività di monitoraggio delle aree classificate per molluschi bivalvi nel medio Adriatico nel periodo 2020-2022. Atti del X Congresso Nazionale S.I.R.A.M. – Cagliari. p. 35-36.
- [7] Giacometti F., Pezzi A., Galletti G., Tamba T., Meriardi G., Piva S., Serraino A., Rubini S., 2021. Antimicrobial resistance patterns in *Salmonella enterica* subsp. *enterica* and *Escherichia coli* isolated from bivalve molluscs and marine environment. Food Control, 121:107590.
- [8] Montone A.M.I., Cutarelli A., Peruzi M.F., La Tela I., Brunetti R., Pirofalo M.G. Folliero V., Balestrieri A., Murru N., Capuano F., 2023. Antimicrobial resistance and genomic characterization of *Salmonella* Infantis from different sources. International Journal of Molecular Sciences, 24(6), 5492.

# Monitoraggio di patogeni in letti naturali di ostrica piatta (*Ostrea edulis*) nel Mar Adriatico occidentale

C. D'Onofrio<sup>1</sup>, T. Pretto<sup>1</sup>, L. Cortinovis<sup>1</sup>, P. Berto<sup>1</sup>, F. Tosi<sup>1</sup>, N. Lago<sup>1</sup>, G. Arcangeli<sup>1</sup>, T. Petochi<sup>2</sup>, S. Raicevich<sup>3</sup>, M. Ciani<sup>2</sup>, G. Prioli<sup>4</sup>, A. Vetri<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Centro Specialistico Ittico – Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Legnaro (PD)

<sup>2</sup> ISPRA – Istituto Superiore per la Protezione e la Ricerca Ambientale – Area Acquacoltura Sostenibile

<sup>3</sup> ISPRA – Istituto Superiore per la Protezione e la Ricerca Ambientale – Conservation, management and sustainable use of national marine resources

<sup>4</sup> M.A.R.E. Soc. Coop. a r.l., Cattolica (RN)

**Keywords:** Ostrica piatta, *Marteilia refringens*, *Bonamia* spp.

## Introduzione

Il monitoraggio dello stato di salute di banchi naturali di ostrica piatta (*Ostrea edulis*) nel Mar Adriatico occidentale fa parte del progetto PNRR MER, finanziato dai fondi del piano Italiano Next Generation EU e coordinato da ISPRA. Una delle principali attività previste da questo progetto multidisciplinare è il ripristino dei banchi naturali di ostrica piatta in 5 regioni dell'area d'interesse: Friuli Venezia-Giulia, Veneto, Emilia Romagna, Marche ed Abruzzo. A tal fine, il progetto prevede due strategie: la prima incentrata sul ripopolamento e l'espansione dei banchi naturali tramite lo spostamento di esemplari da banchi già esistenti all'area circostante; la seconda consiste nella produzione di giovanili di ostrica in schiuditoio a partire da riproduttori selvatici prelevati negli areali d'interesse.

Durante la prima fase sono stati effettuati dei campionamenti di 30 soggetti selvatici in vari siti che coinvolgono tutto l'areale di interesse. Tali campionamenti, effettuati due volte l'anno per ciascun sito (primavera e inverno), hanno il fine di individuare popolazioni esenti dai patogeni di interesse: *Marteilia refringens* (temperatura dell'acqua >14°C), *Bonamia ostreae* e *B. exitiosa* (temperatura dell'acqua <14°C). Le popolazioni che si sono rivelate esenti da patogeni sono state destinate o al ripopolamento mediante espansione dell'areale di distribuzione di banchi naturali o alla produzione di giovanili in hatchery. Prima di essere portati in schiuditoio, gli animali destinati alla riproduzione controllata sono stati sottoposti ad un periodo di quarantena in cui la temperatura dell'acqua è stata manipolata per esacerbare eventuali infezioni latenti. In questo frangente sono stati prelevati trenta esemplari di ostrica all'inizio e trenta alla fine della quarantena per effettuare analisi cito-istologiche e molecolari; è stata inoltre prelevata l'acqua dello schiuditoio a cadenza quindicinale per analizzare il DNA ambientale (eDNA) al fine di individuare la presenza dei patogeni d'interesse. I lotti di riproduttori che si sono rivelati esenti da *Marteilia refringens* e *Bonamia* spp. sono stati introdotti nello schiuditoio e condizionati termicamente al fine di avviare il ciclo riproduttivo.

Alcuni potenziali siti di pre-ingrasso di giovanili destinati alle operazioni di reintroduzione sono stati infine valutati al fine di escludere la presenza dei parassiti summenzionati tramite l'analisi di esemplari selvatici, qualora presenti, o di giovanili provenienti da schiuditoio e allevati *in loco* per un lasso di tempo sufficiente (> 8 mesi) all'eventuale infestazione da parte dei patogeni d'interesse. A tal fine, come per la valutazione dello stato di salute dei banchi naturali, sono stati effettuati campionamenti di 30 soggetti 2 volte l'anno ed analizzati con esami cito-istologici e molecolari.

## Summary

*Ostrea edulis* health monitoring in Western Adriatic Sea is part of the PNRR MER project, comprised in the Italian Plan for Next Generation EU funds, coordinated by ISPRA. One of the main activities foreseen by this multidisciplinary project is the restoration of wild banks of European flat oyster in 5 Italian regions of the Western Adriatic sea: Friuli Venezia-Giulia, Veneto, Emilia Romagna, Marche and Abruzzi region. In order to restore and increase flat oysters wild beds, two pathways are envisioned. The first activity, based on sustainable fishing and natural recruitment of flat oysters by means of scuba divers, collectors and fishing equipment, aims to relocate specimens from pre-existing natural beds in the surrounding area to locally expand their distribution. The second pathway consists in hatchery production of flat oyster juveniles from wild broodstocks collected from northern and central part of the Adriatic coast.

During the implementation of the first pathway, health screening of flat oyster wild populations has been assessed in each site twice a year, where 30 specimens were sampled and analysed in order to evaluate the presence of *Marteilia refringens* (late spring sampling; water temperature >14°C) and *Bonamia ostreae* and *B. exitiosa* (late winter; water temperature < 14°C). Meanwhile, in the second pathway plan of action, a quarantine period has been performed on broodstocks before the introduction in the facility. During this period, specimens were exposed to water temperature manipulation in order to promote the activation of the latent infections. 30 specimens were collected at the start and the end of quarantine together with environmental DNA (eDNA). After negative results, at the end of quarantine, broodstocks were introduced in the hatchery and the health monitoring continued through eDNA testing along the reproductive cycle.

Furthermore, potentially suitable sites for the pre-grow-out of juveniles for re-introduction operations have been evaluated to verify the circulation of the aforementioned parasites, analysing flat oyster specimens from wild populations, where present, or from farmed juveniles maintained *in loco* for adequate time (>8 months).

### **Materiali e metodi**

Gli esemplari campionati per la valutazione dello stato di salute sia dei banchi naturali e dei potenziali siti di preingrasso che i pool di riproduttori, sono stati analizzati in parallelo mediante analisi cito-istologiche e molecolari al fine di rilevare la presenza di patogeni notificabili quali *Marteilia refringens*, *Bonamia ostreae* e *B. exitiosa*.

Le analisi citologiche sono state effettuate mediante impronte di cuore, branchie e ghiandola digestiva su vetrini successivamente colorati con Hemacolor® e letti al microscopio ottico.

La valutazione istologica è stata effettuata su una sezione trasversale dell'intero soggetto contenente i principali organi di interesse (branchie, mantello, ghiandola digestiva e connettivo periviscerale) fissata per 48h in Davidson e colorata con ematossilina-eosina (H-E).

Per le analisi molecolari sono stati predisposti dei pool di organi (branchie, ghiandola digestiva e mantello) da ogni soggetto e analizzati in singolo. Dai pool è stato estratto il DNA ed analizzato mediante due distinte duplex qPCR, una per la rilevazione di *Marteilia refringens* e *M. pararefringens* ed una per la rilevazione di *Bonamia ostreae* e *Bonamia exitiosa*. Le analisi di eDNA sono state effettuate sull'acqua campionata in schiuditoio durante tutto il ciclo riproduttivo, sia come misura preventiva al fine di evitare una cross-contaminazione fra esemplari indenni ed esemplari infettati, sia per un monitoraggio a più ampio spettro durante l'intera fase di allevamento in schiuditoio.

### **Risultati e discussione**

I primi risultati ottenuti analizzando esemplari di ostriche selvatiche, mostrano la circolazione di *Marteilia refringens* in alcuni campioni prelevati nella costa marchigiana, mentre *B. exitiosa* è stata rilevata con bassa prevalenza in Abruzzo e nelle Marche. Nelle ostriche raccolte nell'Adriatico settentrionale (FVG e Veneto) non è stata riscontrata la presenza di *Marteilia refringens* e *Bonamia* spp. Le analisi di eDNA effettuate sull'acqua dello schiuditoio non hanno rilevato la presenza dei patogeni di interesse, confermando la buona riuscita della sperimentazione. Sono stati inoltre individuati alcuni siti esenti da *Marteilia refringens* e *Bonamia* spp. da destinare al pre-ingrasso dei giovanili provenienti da schiuditoio e destinati al ripopolamento dei siti di interesse. Le successive fasi del progetto che prevedono il monitoraggio dello stato di salute e dello sviluppo gonadico pre e post-introduzione dei giovanili prodotti in schiuditoio e degli animali selvatici pescati e spostati nell'areale circostante è ad oggi ancora *in itinere*.



# Studio integrato dell'area marina del Golfo di Pozzuoli attraverso analisi meteo-oceanografiche e monitoraggio della contaminazione da IPA

M. Esposito<sup>1</sup>, Y. Cotroneo<sup>2</sup>, L. Fortunato<sup>2</sup>, V. Capozzi<sup>2</sup>, T. Bruno<sup>1</sup>, G. Aulicino<sup>2</sup>, L. Gifuni<sup>2</sup>, P. de Ruggiero<sup>2</sup>, S. Canzanella<sup>1</sup>, P. Gallo<sup>1</sup>, F. Conversano<sup>3</sup>

<sup>1</sup>) Centro di Referenza Nazionale per l'Analisi e Studio di Correlazione tra Ambiente, Animale e Uomo, IZSM - Portici

<sup>2</sup>) Università degli Studi di Napoli Parthenope, Dip. di Scienze e Tecnologie - Napoli

<sup>3</sup>) Stazione Zoologica Anton Dohrn. Villa Comunale 80121 - Napoli

**Keywords:** molluschicoltura, marine dynamic, contaminanti, IPA

## Introduzione

La presenza di inquinanti chimici nell'acqua di mare costituisce un fattore di forte impatto igienico-sanitario con risvolti economici di grande rilievo sulla molluschicoltura. Nella gestione degli impianti si rende pertanto necessario affiancare alle attività di monitoraggio *in situ* un modello in grado di prevedere l'evoluzione della qualità dell'acqua relativamente all'idrodinamica costiera e alle attività note delle fonti di inquinamento.

Obiettivo principale di questo lavoro è identificare ed esaminare potenziali modelli di circolazione oceanica e atmosferica associati a episodi di contaminazione, che siano in grado di fornire una migliore comprensione dei fattori abiotici che influenzano gli allevamenti. I risultati potrebbero essere integrati in un quadro più ampio, volto a supportare i governi locali e gli allevatori nella previsione di eventi di contaminazione.

Per lo sviluppo di questo modello è stata presa in considerazione l'area produttiva del golfo di Pozzuoli (GoP) situato a Nord-Ovest del Golfo di Napoli nel Mar Tirreno meridionale. Il GoP è considerato un'area di pregevole interesse sia per il paesaggio che per il patrimonio archeologico ma che è sottoposta ad una forte pressione antropica causa di degrado del tratto costiero e il cui impatto è amplificato dalle caratteristiche della circolazione locale che possono contribuire alla dispersione di rifiuti marini o inquinanti rilasciati dalla costa, mettendo a rischio gli ecosistemi marini.

La mitilicoltura rappresenta un'attività storicamente presente nel GoP la cui parte orientale, l'area di Bagnoli, dall'inizio del XX secolo fu identificata come sito per l'industrializzazione del Paese. L'attività di impianti produttivi di vario genere, dal siderurgico al chimico, durata decenni ha causato gravi danni ambientali, con la contaminazione del territorio e dei fondali [1]. Nel tratto di mare antistante l'area di Bagnoli, diversi studi sui sedimenti marini hanno evidenziato l'elevato grado di inquinamento da metalli, idrocarburi policiclici aromatici (IPA), policlorobifenili (PCB) [2]. Tra questi contaminanti, gli IPA rivestono grande interesse scientifico e sanitario per la loro tossicità [3], in particolare, il benzo(a)pirene (BaP) è ritenuto causa di mutazioni genetiche, malformazioni fetali e disturbi dello sviluppo. Pertanto, ai fini della sicurezza dei consumatori, l'UE ha fissato limiti massimi in alcuni alimenti per il BaP e per la somma di BaP e di altri tre IPA (crisene, benzo[a]antracene e benzo[b]fluorantene) considerati indicatori della presenza degli IPA. I molluschi bivalvi rientrano negli alimenti a rischio di contaminazione pertanto, anche negli impianti di produzione, è previsto un monitoraggio dei livelli di IPA per il controllo del rispetto dei tenori massimi. Negli anni le attività di monitoraggio nel GoP hanno riscontrato la presenza di IPA nei mitili allevati nell'area di Lucrino con un andamento spiccatamente stagionale [4]. In relazione alla reiterata contaminazione dei mitili nel GoP, su iniziativa delle Autorità regionali, sono state eseguite dall'ARPAC specifiche indagini ambientali sui sedimenti marini prossimi alla costa per identificare la potenziale fonte di contaminazione da IPA. Sulla base dei risultati delle analisi effettuate dall'IZS Mezzogiorno e dei dati oceanografici dal modello sviluppato dal centro di previsioni ed osservazioni meteo marine del DIST dell'Università Parthenope, è stato realizzato uno studio per ricostruire l'andamento delle correnti superficiali del GoP in relazione agli episodi di contaminazione da IPA. Questo studio presenta una serie di attività multidisciplinari svolte per indagare i livelli e le fonti di contaminazione da IPA sulla base di dati provenienti da diversi campi scientifici (analisi su mitili e sedimenti, studio e simulazione delle correnti marine).

## Summary

The Gulf of Pozzuoli, a marginal sub-basin of the Tyrrhenian Sea, is historically dedicated to the farming of bivalve molluscs despite it is characterized by strong anthropogenic impact. Monitoring activity of mussel production showed a higher number of samples exceeding the limits for both BaP and the sum of PAHs, the Lucrino site showing a well-defined seasonal pattern. Moreover, this area is very close to the brownfield site of Bagnoli where elevated concentrations of PAHs in both surface and bottom sediments were documented. The seasonality of contamination supports the hypothesis of a correlation with meteorological and oceanographic phenomena as coastal hydrodynamic processes.

This study presents a series of multidisciplinary activities carried out to investigate the levels and sources of PAH contamination based on data from various scientific fields (sediment analysis, biological samples, study and simulation of marine currents). Based on these results, mussel contamination could be related to the remobilization, suspension, and transport of sediments from Bagnoli (ex-industrial area) to Lucrino, depending on the variability of marine and weather conditions.

## Materiali e metodi

Per lo studio sono stati utilizzati i dati del monitoraggio effettuato su campioni di mitili prelevati presso allevamenti situati nell'area di Lucrino del golfo di Pozzuoli e analizzati dall'IZS Mezzogiorno. I risultati del monitoraggio hanno confermato l'andamento già verificato negli anni passati, con livelli di IPA alti nel periodo invernale e prossimi allo zero nelle stagioni primavera ed estate. In particolare, nel 2016, su un totale di 15 campioni, 4 sono risultati con livelli oltre i limiti di legge previsti dalla normativa. Tutti gli eventi di alta contaminazione sono avvenuti durante l'inverno, specificamente nelle seguenti date: 25 gennaio, 17 febbraio, 22 novembre, 14 dicembre.

Per descrivere le condizioni meteo-marine nel GoP precedentemente ad ogni evento di contaminazione, sono stati utilizzati dati meteo e oceanografici in situ, dati satellitari e output da modello oceanografico. I dati di intensità e direzione del vento sono stati raccolti dalla stazione meteorologica di Bacoli, disponibili attraverso la rete Campanialive (<https://www.campanialive.it/>). I dati oceanografici in situ sono stati raccolti dalla "MEDA A" presente nella baia di Bagnoli (40° 48.550' N, 014° 09.300' E) su un fondale di circa 19 m di profondità. La "MEDA A", gestita dalla Stazione Zoologica Nazionale A. Dohrn (SZN), è dotata di un correntometro ADCP da cui sono stati acquisiti i dati di corrente marina. L'ADCP registra la direzione e l'intensità delle correnti, la direzione del moto ondoso e l'oscillazione della superficie del mare ad intervalli di 15 minuti. Per descrivere il pattern di circolazione a più grande scala, sono stati utilizzati i dati satellitari e gli output di velocità delle correnti del modello oceanografico CROM (Campania Regional Ocean Model) [5].

## Risultati e Discussione

Lo studio si è concentrato sull'anno 2016, durante il quale sono stati registrati quattro eventi di contaminazione dei mitili da IPA sopra i limiti massimi nei mesi invernali. La stagionalità della contaminazione avvalorava l'ipotesi di una correlazione tra fenomeni meteo-oceanografici, trasporto dei contaminanti e contaminazione nei mitili. L'analisi dei dati in situ ha rivelato direzioni del vento variabili, mentre le correnti marine circa una settimana prima degli eventi di inquinamento erano principalmente dirette verso ovest. La distribuzione delle correnti osservate supporta l'ipotesi che i contaminanti provenienti dai sedimenti nell'area orientale del GoP (Bagnoli) siano trasportati dalle correnti marine verso gli impianti di mitilicoltura situati nella parte occidentale del Golfo (Lucrino). I diagrammi di Hovmöller indicano una tendenza delle correnti marine verso nord-ovest, supportando ulteriormente questa ipotesi. Il tempo di trasporto dei contaminanti è coerente con le dimensioni del GoP e le velocità medie delle correnti marine. L'instaurarsi delle correnti marine superficiali indotte dal vento inizia con un certo ritardo rispetto al momento in cui il vento raggiunge gradualmente la velocità di regime. Per questo motivo, durante periodi di venti intensi e prolungati, come spesso accade in inverno, l'accumulo graduale e la persistenza delle correnti indotte dal vento possono facilitare il trasporto dei contaminanti lungo la costa, spiegando la stagionalità della contaminazione. Durante i mesi estivi, infatti, la minore intensità delle mareggiate e delle correnti superficiali riduce la probabilità di contaminazione oltre i limiti di legge.

Questa analisi può contribuire a identificare specifiche condizioni meteorologiche e oceanografiche che potrebbero correlare con l'aumento degli eventi di inquinamento in ambienti costieri, come il GoP, offrendo preziosi spunti per strategie di mitigazione e gestione dell'inquinamento.

L'identificazione di un pattern di correnti ricorrente, nelle ore e nei giorni precedenti agli eventi di contaminazione, ha dimostrato la stretta correlazione tra inquinamento e fenomeni meteo-oceanografici.

Una conoscenza dettagliata della circolazione nel GoP è necessaria per una corretta gestione delle attività socioeconomiche che insistono sulle aree costiere e per la pianificazione di attività volte allo sfruttamento delle risorse marine (tra cui gli allevamenti di molluscoltura), al fine di comprendere, prevenire ed eventualmente mitigare i rischi per l'ambiente e la salute.

## Bibliografia

- [1] Armiento, G. *et al.* 2020. Current status of coastal sediments contamination in the former industrial area of Bagnoli-Coroglio (Naples, Italy). *Chemistry and Ecology*, 36(6), 579–597.
- [2] Arienzo, M. *et al.* 2017. Characterization and source apportionment of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in the sediments of gulf of Pozzuoli (Campania, Italy). *Marine Pollution Bulletin*, 124(1), 480–487. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2017.07.006>
- [3] Abdel-Shafy, H.I., Mansour, M.S.M., 2016. A review on polycyclic aromatic hydrocarbons: source, environmental impact, effect on human health and remediation. *Egypt. J. Pet.* 25, 107–123.
- [4] Esposito, M., Canzanella, S., Lambiase S., ... & Gallo, P. (2020). Organic pollutants (PCBs, PCDD/Fs, PAHs) and toxic metals in farmed mussels from the Gulf of Naples (Italy): Monitoring and human exposure. *Regional studies in marine science*, 40, 101497.
- [5] de Ruggiero, P., Napolitano, E., Iacono R. and Pierini S., (2016): A high-resolution modelling study of the circulation along the Campania coastal system, with a special focus on the Gulf of Naples., *Cont. Shel. Res.*, 122, 85-101.

# Aggiornamento della Banca Dati Nazionale (BDN) degli stabilimenti di molluschi sulla base della nuova normativa in sanità animale (Reg. UE 2016/429 - AHL)

E. Franzago<sup>1</sup>, G. A. Santarelli<sup>2</sup>, W. Di Donato<sup>3</sup>, A. Maroni Ponti<sup>2</sup>, A. Marsella<sup>1</sup>, S. Rizzo<sup>1</sup>, E. Schiavon<sup>1</sup>, L. Bille<sup>1</sup>, A. Toffan<sup>1</sup>, M. Dalla Pozza<sup>1</sup>, A. Sorgente<sup>2</sup>

<sup>1</sup>) Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie – Legnaro (PD)

<sup>2</sup>) Ministero della Salute - Roma

<sup>3</sup>) Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell’Abruzzo e del Molise (IZSAM) - Teramo

**Keywords:** Banca Dati Nazionale, Sistema I&R, Molluschi.

## Introduzione

Dal 21 aprile 2021 è entrato in vigore il Regolamento (UE) 2016/429 del Parlamento Europeo e del Consiglio, relativo alle malattie animali trasmissibili ed emergenti, che modifica e abroga taluni atti in materia di sanità animale. Il Regolamento, chiamato “Animal Health Law” (AHL), fornisce un quadro giuridico generale e detta i principi armonizzati per tutto il settore della sanità animale, rivedendo e abrogando la precedente normativa europea alla luce della strategia 2007- 2013 dell’Unione “Prevenire è meglio che curare”. Il Regolamento adotta un approccio basato sul rischio, rafforzando l’importanza della prevenzione, della biosicurezza e delle buone pratiche di allevamento. Prerequisito è la formazione degli operatori da parte delle associazioni di categoria, dell’Autorità Competente ed altri soggetti indicati nel Decreto del Ministero della Salute del 6 settembre 2023. Il medesimo Regolamento elenca le malattie oggetto di interesse per la sorveglianza ed eradicazione in Europa (nel settore dell’acquacoltura le malattie elencate sono 14), categorizzandole (da A a E) a seconda della rilevanza che i patogeni, causa delle stesse, rivestono sul territorio dell’Unione Europea. In base alla categoria, sono previste azioni da intraprendere nel caso esse si manifestino in stabilimenti con specie sensibili (eradicazione obbligatoria/facoltativa, sorveglianza, ecc.), così come in stabilimenti con specie sensibili o non elencate, ma con sospetto di una malattia emergente. Agli stabilimenti che allevano specie sensibili alle malattie elencate ad eradicazione facoltativa va assegnata una categoria sanitaria (Categoria 1 - Indenne; Categoria 2 - In fase di eradicazione; Categoria 3 - Sorveglianza attiva volontaria; Categoria 4 - Sorveglianza passiva). Tutte queste novità sono state recepite, in primo luogo aggiornando BDN, base dati informatizzata nazionale del sistema di identificazione e registrazione degli operatori, degli stabilimenti e degli animali (sistema I&R, ex anagrafe), accessibile nel portale internet del Sistema Informativo Veterinario (VetInfo). Per quanto riguarda il settore acquacoltura il Ministero della Salute ha coordinato, con il supporto del Centro di Referenza Nazionale per lo studio e la diagnosi delle malattie di pesci molluschi e crostacei (CRN) sito presso l’Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie (IZSve), e dell’Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell’Abruzzo e del Molise (IZSAM) – Centro Servizi Nazionale (CSN), uno studio della norma al fine di concretizzare l’aggiornamento del Sistema Informativo Veterinario Italiano (VetInfo) in questo settore zootecnico (gruppo specie pesci *in primis* e dal 2024 anche molluschi e crostacei). L’adeguamento della BDN ai requisiti del Regolamento (UE) 2016/429 comporterà il necessario aggiornamento dei dati da parte delle Aziende Sanitarie Locali, prerequisito per disporre di una base informativa efficace a descrivere, da un punto di vista epidemiologico e produttivo tale settore, nonché a soddisfare i debiti informativi verso l’Unione Europea.

## Summary

Regulation (EU) 2016/429 of the European Parliament and of the Council on transmissible animal diseases amending and repealing certain acts in the area of animal health entered into force at 21<sup>st</sup> April 2021. The Regulation, called Animal Health Law (AHL), provides a general legal framework and dictates harmonised principles for the entire animal health sector, revising and repealing previous European legislation in light of the Union’s 2007- 2013 Animal Health Strategy ‘Prevention is better than cure’. The regulation focuses on a risk-based approach, increasing the importance of prevention, biosecurity and good husbandry practices, starting from the education of operators and introducing changes on disease categorisation and listed species. In order to be able to apply all these changes, especially effective pathogen surveillance, it is necessary to start from a proper registry of the establishments keeping animals on the territory. For this reason, the Italian Ministry of Health, with the support of the National Reference Centre for the study and diagnosis of fish diseases molluscs and crustaceans (CRN) located at the Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie (IZSve), and of the Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell’Abruzzo e del Molise (IZSAM) in 2024 has finalised the changes for molluscs and crustacean species into the Italian National computer Data Base of the identification and registration system of operators, establishments and animals.

## Materiali e metodi

È stato creato un gruppo di lavoro composto da personale del CRN, CSN e vari esperti del settore produttivo della molluschicoltura, al fine di avere una conoscenza più ampia sulle caratteristiche d’allevamento nelle varie

realità territoriali. Inizialmente è stata consultata la norma per identificare le tipologie di stabilimenti che obbligatoriamente devono essere registrati in Banca Dati Nazionale (BDN). Successivamente, partendo dalle voci già presenti nel sistema I&R (cosiddetta anagrafe) molluschi, per la precisione nelle sezioni “Indirizzo d’attività”, “Metodo d’allevamento”, “Specie allevate” e “Tipologia Acque”, si è eseguita una valutazione su quali “descrizioni” mantenere, eliminare, modificare o inserire *ex novo* per rappresentare tutte le realtà presenti sul territorio nazionale.

### Risultati e discussione

La prima sezione (Tabella 1) ad essere modificata è stata quella dell’indirizzo d’attività, la cui nuova denominazione è “orientamento produttivo”, come indicato nelle schede gestionali online di Vetinfo. Nella tabella sottostante è possibile osservare le modifiche apportate alla base dati. Le voci con lettera a) nella prima colonna hanno subito una modifica di tipo semantico, per poter meglio esplicitare l’orientamento produttivo di riferimento. Le voci indicate con lettera b) sono di nuova introduzione in BDN perché previste dalla nuova normativa. Le voci indicate con lettera c), che erano presenti nella precedente sezione “metodo di allevamento”, sono state spostate in questa sezione.

Tabella 1 – Sezione “Indirizzo d’attività” in BDN, gruppo specie molluschi

	<b>Indirizzo d’attività (vecchie voci)</b>	<b>Orientamento Produttivo (Nuove voci)</b>
	Altro	Altro
a	Incubatoio	Schiodatoio con riproduttori
	Ingrasso	Ingrasso
a	Vivaio	Preingrasso (vivaio)
c	<i>Impianto per ricerca</i>	Stabilimento a fini scientifici
c	<i>Impianto per quarantena</i>	Stabilimento di quarantena
c	<i>Centro di spedizione/depurazione</i>	Centro di spedizione
c	<i>Centro di spedizione/depurazione</i>	Centro di depurazione
b		Struttura chiusa con animali di acquacoltura a scopo ornamentale
b		Struttura aperta con animali di acquacoltura a scopo ornamentale
b		Zona di stabulazione
b		Rifinitura
b		Nuova immersione a fine di conservazione

La seconda sezione modificata (Tabella 2) è stata quella del metodo d’allevamento, la cui nuova denominazione è “Metodologia d’allevamento”. La chiave di lettura delle modifiche apportate (con lettere) è la stessa della tabella 1.

Tabella 2 – Cambiamenti sezione “Metodo d’allevamento” in BDN, gruppo specie molluschi

	<b>Metodo di allevamento (vecchie voci)</b>	<b>Metodologia di allevamento (Nuove voci)</b>
	Altri metodi	Altri metodi
c	Centro di spedizione/depurazione	\
c	Impianto per quarantena	\
c	Impianto per ricerca	\
	<del>Molluschicoltura aperta</del>	Eliminata, quegli stabilimenti che si configuravano in questa voce sono stati trasformati in «Altri metodi»
a	Molluschicoltura chiusa	Sistemi a ricircolo (RAS)
	<del>Zona destinata a molluschicoltura</del>	Eliminata, quegli stabilimenti che si configuravano in questa voce sono stati trasformati in «Altri metodi»
b		Sistemi in sospensione
b		Sistemi sul fondo
b		Bacini in terra
b		Vasche
b		Porzioni di acque libere delimitate e segnalate

La sezione sulla “tipologia acque” è rimasta invariata. Dopo attenta valutazione, non si è ritenuto necessario eliminare la voce “acqua dolce” in quanto potenzialmente esistono molluschi che potrebbero essere allevati in tale habitat.

Per quanto riguarda la sezione delle specie allevate (Tabella 3) la tabella riporta, nella colonna di sinistra, le modifiche alle specie che dovranno essere apportate in BDN, previa verifica con le Aziende Sanitarie Locali. Le modifiche sono ancora in corso, a causa del fatto che ci sono attualmente specie che sarebbero eliminabili o perché mai selezionate dall’elenco attualmente presente in BDN o perché, seppur selezionate per alcuni stabilimenti, non risultano essere specie allevabili o allevate in Italia. È in corso una validazione dei dati sulle specie attualmente inserite in BDN.

Tabella 3 - Cambiamenti sezione "Specie allevate" in BDN, gruppo specie molluschi

<b>Specie allevate (vecchie voci)</b>	<b>Specie allevate (nuove voci)</b>
Arca di Noè - arca noae	\
Canestrello - Chlamys spp	Canestrello - Chlamys spp.; Aequipecten spp.; Flexopecten spp.; Mimaclamys varia;
\	Canestrello rosso - Spondylus gaederopus;
Cannolicchio o cappelungo - Ensis spp	Cannolicchio o cappelungo - Ensis spp.
Cannolicchio o cappelungo - ensis minor o ensis siliqua	\
Cannolicchio o cappelungo - ensis ensis	\
Cannolicchio o cappelungo - solen vagina	\
Cannolicchio o cappelungo - Solen spp	Cannolicchio o cappelungo - Solen spp.
Cappasanta - Pecten spp	Cappasanta o Conchiglia di S. Giacomo - Pecten jacobaeus
Cappasanta - argopecten spp	\
Cappasanta (conchiglia di san giacomo) - pecten jacobaeus	\
Cozza - mytilus spp	\
Cozza - mytilus galloprovincialis mitilo	Cozza/mitilo – Mytilus galloprovincialis
Cozza - mytilus edulis (cozza atlantica)	\
Cozza - modiolus barbatus (cozza pelosa)	\
Cuore - Cerastoderma spp	Cuore - Cerastoderma spp.
Cuore - Acanthocardia spp	Cuore - Acanthocardia spp.
Cuore - acanthocardia tuberculata l.	\
Cuore - cardium edule	\
Cuore - cardium spp	\
Fasolaro - Callista chione	Fasolaro - Callista chione
Holothuria poli - olothuria sabbiosa	\
Holothuria tubulosa - cetriolo di mare	\
Limone di mare o uovo di mare - microcosmus sulcatus	\
Lumachina di mare - sphaeronassa spp	\
Lumachino - nassarius spp	\
Mactra - mactra spp	\
Mactra - mactra corallina	\
Murice - murex spp	\
Ostrica - crassostrea angulata (ostrica concava)	\
Ostrica - ostrea edulis (ostrica piatta)	Ostrica piatta - Ostrea edulis
Ostrica argentina - ostrea puelchana	\
Ostrica asiatica - ostrea denselammellosa	\
Ostrica cilena - ostrea chilensis	\
Ostrica della virginia - crassostrea virginica	\
Ostrica di olimpia - ostrea conchaphila	\
Ostrica giapponese - crassostrea gigas	Ostrica concava - Crassostrea gigas
Ostrica piatta australiana - ostrea angasi	\
Piè d'asino - glycimeris glycimeris	\
Pie' di pellicano - aporrhais pes pelecani	\
Riccio di mare - paracentrotus lividus	\
Scigno di venere - anadara inequivalvis o scapharca inequivalvis	\
Scigno di venere - anadara demiri o scapharca demiri	\
Tartufo o noce - Venus verrucosa	Tartufo o noce - Venus verrucosa
Tellina - Donax trunculus	Tellina - Donax trunculus/ Donax vittatus
Torricella - cerithium vulgatum	\
Vongola verace – Tapes semidecussatus o Ruditapes philippinarum	Vongola verace - Ruditapes philippinarum
Vongola verace – Tapes decussatus o Ruditapes decussatus	Vongola verace – Ruditapes decussatus
Vongola/lupino – Venus gallina o Chamelea gallina	Vongola/lupino – Chamelea gallina
\	Specie ornamentali

Legenda: \ specie da eliminare o nel caso della colonna di sinistra non presenti.

## **Conclusioni**

Tutte le modifiche eseguite hanno come obiettivo quello di rendere il sistema I&R (ex anagrafe) dei molluschi il più possibile omnicomprendente di tutte le realtà presenti sul territorio e facilitare la registrazione dei nuovi stabilimenti di molluschi. Inoltre, una migliore caratterizzazione degli stabilimenti agevolerà le elaborazioni dati e/o statistiche, ad esempio per le rendicontazioni richieste da enti internazionali o per implementare i piani di sorveglianza previsti dalla normativa, e consentirà di adempiere al meglio alla richiesta di trasparenza dei dati dettata dalla Commissione Europea.

## **Bibliografia**

[1] Regolamento (UE) 2016/429 del 9 marzo 2016 del Parlamento europeo e del Consiglio relativo alle malattie animali trasmissibili e che modifica e abroga taluni atti in materia di sanità animale («normativa in materia di sanità animale»).

[2] Regolamento delegato (UE) 2020/691 del 30 gennaio 2020 della Commissione che integra il regolamento (UE) 2016/429 del Parlamento europeo e del Consiglio per quanto riguarda le norme relative agli stabilimenti di acquacoltura e ai trasportatori di animali acquatici.

[3] Regolamento delegato (UE) 2020/689 del 17 dicembre 2019 che integra il Regolamento (UE) 2016/429 del Parlamento europeo e del Consiglio per quanto riguarda le norme relative alla sorveglianza, ai programmi di eradicazione e allo status di indenne da malattia per determinate malattie elencate ed emergenti (s.m.i.).

[4] Regolamento d'esecuzione (UE) 2018/1882 del 3 dicembre 2018 relativo all'applicazione di determinate norme di prevenzione e controllo delle malattie alle categorie di malattie elencate e che stabilisce un elenco di specie e gruppi di specie che comportano un notevole rischio di diffusione di tali malattie elencate (s.m.i.).

[5] Decreto 6 settembre 2023 del Ministero della Salute Definizione delle modalità di erogazione dei programmi formativi in materia di sistema di identificazione e registrazione degli operatori, degli stabilimenti e degli animali per gli operatori ed i professionisti degli animali, in conformità alle prescrizioni contenute in materia di formazione nell'articolo 11 del regolamento (UE) 2016/429. (GU Serie Generale n.243 del 17-10-2023).

# Vongole (*Chamelea gallina*) della costa del Piceno: andamento su base mensile della contaminazione microbiologica da *E. coli* dal 2002 al 2023

S. Gentili<sup>1</sup>, C. Ciccarelli<sup>2</sup>

<sup>1</sup>) Veterinaria specialista ICPPA

<sup>2</sup>) Azienda Sanitaria Territoriale Ascoli Piceno

**Keywords:** *E. coli*, molluschi bivalvi vivi, piano di monitoraggio, metodo MPN, statistica descrittiva

## Introduzione

Questo studio propone una valutazione critica dei dati raccolti, negli ultimi 22 anni, con il monitoraggio microbiologico delle aree classificate per vongole *Chamelea gallina* della costa del Piceno: vongole presenti in banchi naturali distribuiti regolarmente lungo tutto il tratto di costa fino alla batimetria di 10-12 m.

L'area oggetto di studio è quella del Piceno, compresa nel tratto di costa delimitato a sud dal fiume Tronto e a nord dal confine tra i comuni Massignano e Campofilone, poco più a sud della foce del fiume Aso, in cui sono presenti n. 8 aree classificate per *Chamelea gallina*, con 10 stazioni di campionamento geo-referenziate.

L'obiettivo dello studio è stato valutare la qualità microbiologica complessiva delle vongole prodotte e raccolte nell'area marina del Piceno negli ultimi 22 anni attraverso lo studio dell'andamento su base mensile della contaminazione da *Escherichia coli* in ciascuna stazione di campionamento ed il confronto dei livelli di contaminazione tra le diverse stazioni di campionamento.

## Summary

The purpose of this study was to evaluate the data collected over the past 22 years during the microbiological monitoring of *Chamelea gallina* clams' natural beds on the Piceno's coast (Italy). The goal was to assess the overall quality of the clams produced and harvested in the locality by examining the monthly trend and comparing the results of *Escherichia coli* contamination's checks. In total, no. 1870 results obtained for *E. coli*, from 2002 to the first months of 2024, at 10 sampling stations distributed in the 8 classified areas were taken into account. Tukey-based box-and-whisker plots were used to create graphical representation of the results after taking into account the main parameters of descriptive statistics for the respective distributions. To summarize, the analysis of the data shows a largely low level of contamination of Piceno's clams. Furthermore, the monthly variability of results from different sampling stations validates the significance of continuing monitoring at all already identified sampling stations.

## Materiali e metodi

Per lo studio sono stati presi in considerazione i risultati di tutti i campioni del monitoraggio microbiologico nei confronti di *Escherichia coli* delle aree di produzione di molluschi bivalvi vivi, prelevati dal 24 ottobre 2002 fino al 3 aprile 2024 nelle 10 stazioni di campionamento di vongole *Chamelea gallina*. Le stazioni di campionamento sono state individuate sulla base dei risultati dell'Indagine Sanitaria secondo il criterio del worst-case e si presentano su due differenti batimetrie, alla profondità di 3-6 metri oppure alla profondità di 6-9 metri: generalmente, data la morfologia costante che caratterizza la costa picena, le prime si trovano ad una distanza di circa 0,6/0,7 Km dalla riva mentre le seconde sono a circa 1,2/1,3 Km.

Tutti i valori sono espressi come MPN/100g e, per mantenere una scala adeguata, sono stati trasformati in logaritmi a base 10; tutti i valori inferiori a 18 sono stati conteggiati come la metà del valore minimo (criterio del *medium bound*). Per ciascuna stazione di campionamento sono stati determinati i principali parametri di statistica descrittiva delle distribuzioni di risultati e ne è stata realizzata una rappresentazione grafica mediante box-plot del tipo Box-and-Whisker secondo Tukey; inoltre tali dati sono stati suddivisi su base mensile e le relative distribuzioni sono state rappresentate sempre mediante box-plot.

## Risultati e discussione

Complessivamente sono stati presi in considerazione n. 1870 risultati ottenuti, a partire dal 2002 e fino ai primi mesi del 2024, con il monitoraggio microbiologico nei confronti di *E. coli* dei banchi naturali di vongole *Chamelea gallina* del Piceno. Per ciascuna delle 10 stazioni di campionamento i principali parametri di statistica descrittiva delle relative distribuzioni di risultati sono riassunti nella Tabella 2 mentre il Grafico 13 ne riporta una rappresentazione grafica mediante box-plot. Da una valutazione generale appare evidente come il livello di contaminazione sia in generale molto basso e solo in maniera episodica si riscontrano valori superiori a 230 MPN/100g. La rappresentazione mediante box-plot, pur se con minime differenze, permette di riconoscere una distribuzione di risultati più raccolta, e quindi una minore variabilità, nelle stazioni di campionamento più settentrionali rispetto a quelle centrali e meridionali.

L'analisi degli andamenti su base mensile, riportata nei grafici dal n. 1 al n. 12, permette di evidenziare invece una notevole variabilità di comportamento delle diverse stazioni di campionamento: differenze non riconoscibili quando vengono valutati i dati complessivi come nel grafico n. 13.

Questo potrebbe essere spiegato dalla presenza di una miriade di piccole fonti di contaminazione, già evidenziate con l'Indagine Sanitaria, spesso meteo-dipendenti ed in grado di influenzare ciascuna area classificata in maniera indipendente dalle altre.

L'analisi su base mensile mostra inoltre come i livelli più bassi di contaminazione si riscontrino nei mesi estivi, da giugno a settembre: mesi caratterizzati dalla massima pressione antropica, in un'area a forte vocazione turistica balneare, ma anche dai minimi livelli di precipitazioni. Negli altri mesi invece, caratterizzati da una minore pressione antropica ma da livelli di precipitazioni locali più elevate, soprattutto nel quadrante centro-meridionale dell'area i livelli di contaminazione appaiono più elevati: la fragilità del sistema di raccolta dei reflui, che verrebbe messo alla prova da precipitazioni più abbondanti, potrebbe essere una ulteriore spiegazione del fenomeno.

In conclusione l'analisi dei dati del monitoraggio microbiologico dei banchi naturali di vongole del Piceno fornisce un quadro ampiamente rassicurante del livello di contaminazione dei molluschi bivalvi raccolti; inoltre la variabilità su base mensile dei risultati delle diverse stazioni di campionamento rappresenta una conferma dell'importanza di mantenere il monitoraggio in tutte le stazioni già individuate.

## Bibliografia

[1] Barchiesi F., Donati D., Ottaviani D., Santarelli S., Masini L., Duranti A., Rocchegiani E., Latini M. (2012). *Zone di produzione delle vongole (Chamelea gallina) nella regione Marche: analisi preliminare della contaminazione fecale nel triennio 2008-2010*. Italian Journal of Food Safety 1:11-14.

[2] Ciccarelli C., Semeraro A.M., Aliventi A., Di Trani V., Capocasa P. (2014). *Seasonal variations of Escherichia coli contamination in clams (Chamelea gallina) harvested in the Adriatic Sea (San Benedetto del Tronto district, Italy)*. It. J. Food Safety 3:1645.

[3] Ciccarelli C., Semeraro A.M., Aliventi A., Di Trani V., Capocasa P. (2012). *Valutazione dell'impatto delle precipitazioni sulla contaminazione fecale delle vongole (Chamelea gallina) raccolte nel distretto di San Benedetto del Tronto (AP)*. It. J. Food Safety 1:46-9.

[4] Ciccarelli C., Semeraro A.M., Leinoudi M., Di Trani V., Murru S., Capocasa P., Ciccarelli E., Sacchini L. (2017). *Assesment of relationship between rainfall and Escherichia coli in clams (Chamelea gallina) using the Bayes Factor*. It. J. Food Safety 6:6826.

[5] Ciccarelli C., Leinoudi M., Semeraro A. M., Di Trani V., Ciccarelli E., Consorti G. (2022). *European legislation and live bivalve molluscs: Are the criteria for microbiological safety matching with the criteria for sanitary classification of harvesting areas?* It. J. Food Safety 11:9956.

[6] Deliberazione della Giunta Regionale Marche del 4 giugno 2024, n. 857. *Riclassificazione sanitaria delle zone di produzione/stabulazione dei molluschi bivalvi vivi ai sensi del regolamento UE del 15 marzo 2019, n. 627; revoca della Deliberazione di Giunta del 20 giugno 2022, n. 773*. BUR n. 53 del 14/06/2024.

[7] Soliani Lamberto (2005). *Manuale di statistica per la ricerca e la professione; statistica univariata e bivariata parametrica e non parametrica per le discipline ambientali e biologiche*. Cap 1: Elementi di statistica descrittiva per distribuzioni univariate. <https://www.dsa.unipr.it/soliani/soliani.html>

Figura 1: cartina con la posizione delle stazioni di campionamento dei banchi naturali di vongole della costa del Piceno





Tabella 1: stazioni di campionamento dei banchi naturali di vongole della costa del Piceno

Identificativo stazione	Lat. N	Long. E	Principali fonti di contaminazione
19.1 3/6	43,04353	13,86491	Rio Canale, depuratore di Massignano, Torrente Menocchia
19.1 6/9	43,05926	13,86272	Rio Canale, Centrale ENEL, Fiume Aso
19.2 3/6	43,02361	13,87056	Torrente Menocchia, Fosso S. Egidio, Fosso dell'Acquarossa
19.2 6/9	43,02896	13,87515	Torrente Menocchia, depuratore di Cupra Marittima, Fosso S. Egidio
19.3 3/6	42,98071	13,88431	Fosso S. Lucia, collettori GRT2, GRT3 e GRT5, Fiume Tesino, depuratore di Grottammare, Fosso delle Tavole, Fosso S. Francesco
19.3 6/9	42,9765	13,89187	Fosso S. Lucia, Fiume Tesino, depuratore di Grottammare, Fosso delle Tavole, Fosso S. Francesco
19.4 3/6	42,94744	13,89787	collettore GRT7, Fosso delle Tavole, Fosso S. Francesco, Torrente Albula, Fosso Fornaci, Fosso Brancadoro
19.4 6/9	42,94712	13,9052	Fosso delle Tavole, Fosso S. Francesco, Torrente Albula, Fosso Fornaci,
19.5 3/6	42,92923	13,90716	Fosso Brancadoro, Torrente Ragnola, fosso canale
R 3/6	42,9077	13,91598	fosso canale, Fiume Tronto, depuratore di S. Benedetto del Tronto, depuratore di Martinsicuro

Tabella 2: statistica descrittiva dei risultati del monitoraggio microbiologico dei banchi naturali di vongole della costa del Piceno

	19.01 3-6	19.01 6-9	19.02 3-6	19.02 6-9	19.03 3-6	19.03 6-9	19.04 3-6	19.04 6-9	19.05	R
<b>N</b>	190	169	193	184	188	196	192	187	187	184
<b>Min</b>	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9
<b>Max</b>	1300	3500	5400	3500	16000	1300	9200	10900	16000	5400
<b>Sum</b>	13776	12568	18730	24905	44573	18374	44948	29912	56401	43423
<b>Mean</b>	72,505	74,367	97,047	135,353	237,090	93,745	234,104	159,957	301,610	235,995
<b>Std. error</b>	11,699	21,883	31,273	30,110	89,989	14,327	60,926	61,680	120,235	52,362
<b>Variance</b>	26005	80925	188759	166817	1522420	40232	712688	711425	2703373	504488
<b>Stand. dev</b>	161,260	284,473	434,464	408,433	1233,864	200,580	844,209	843,460	1644,194	710,273
<b>Median</b>	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20
<b>25 prcentil</b>	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9
<b>75 prcentil</b>	50	45	45	45	78	63,5	110	110	78	130
<b>Skewness</b>	4,454	10,704	10,405	5,175	11,456	3,693	7,915	11,574	8,095	5,149
<b>Kurtosis</b>	23,899	127,091	120,537	32,107	144,427	15,770	74,383	144,307	67,616	29,377
<b>Geom. mean</b>	25,671	24,485	24,237	26,533	34,854	27,983	39,962	31,985	33,038	41,871
<b>Coeff. var</b>	222,411	382,526	447,686	301,753	520,419	213,964	360,612	527,304	545,140	300,970

Grafico 1: monitoraggio microbiologico dei banchi naturali di vongole della costa del Piceno: box-plot dei risultati ottenuti nel mese di gennaio

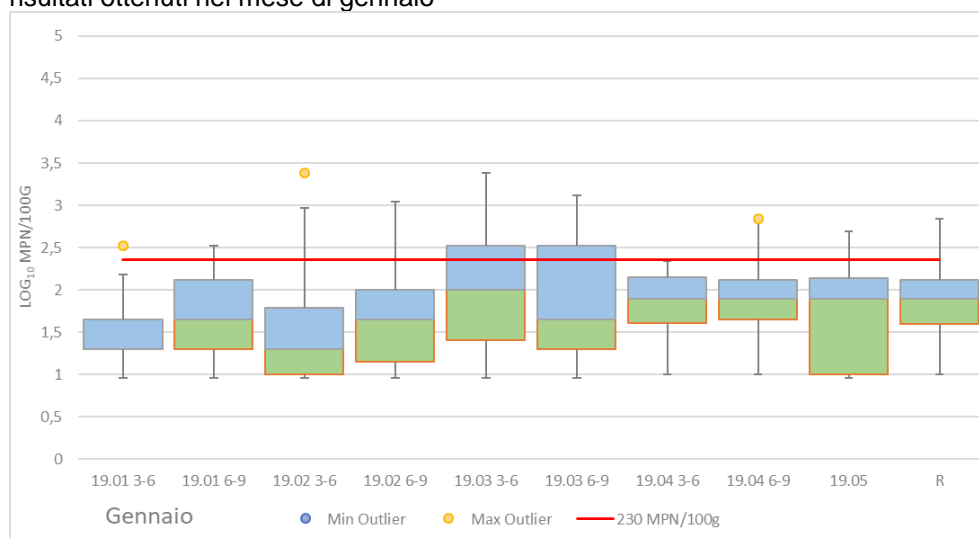


Grafico 2: monitoraggio microbiologico dei banchi naturali di vongole della costa del Piceno: box-plot dei risultati ottenuti nel mese di febbraio

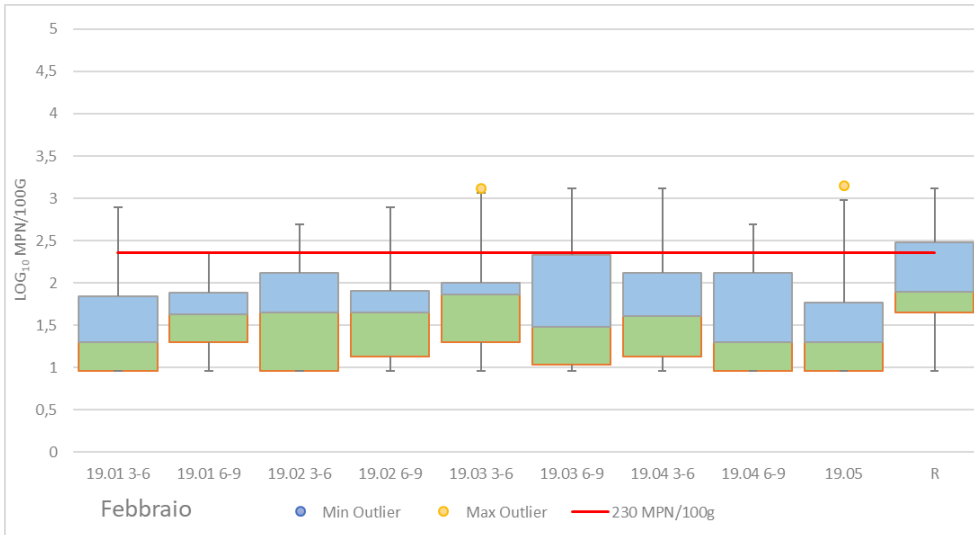


Grafico 3: monitoraggio microbiologico dei banchi naturali di vongole della costa del Piceno: box-plot dei risultati ottenuti nel mese di marzo

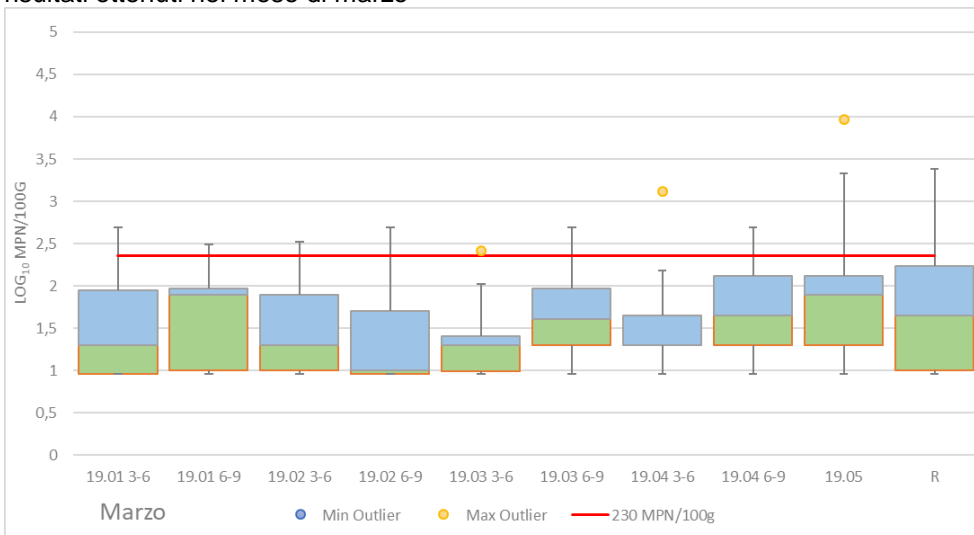


Grafico 4: monitoraggio microbiologico dei banchi naturali di vongole della costa del Piceno: box-plot dei risultati ottenuti nel mese di aprile

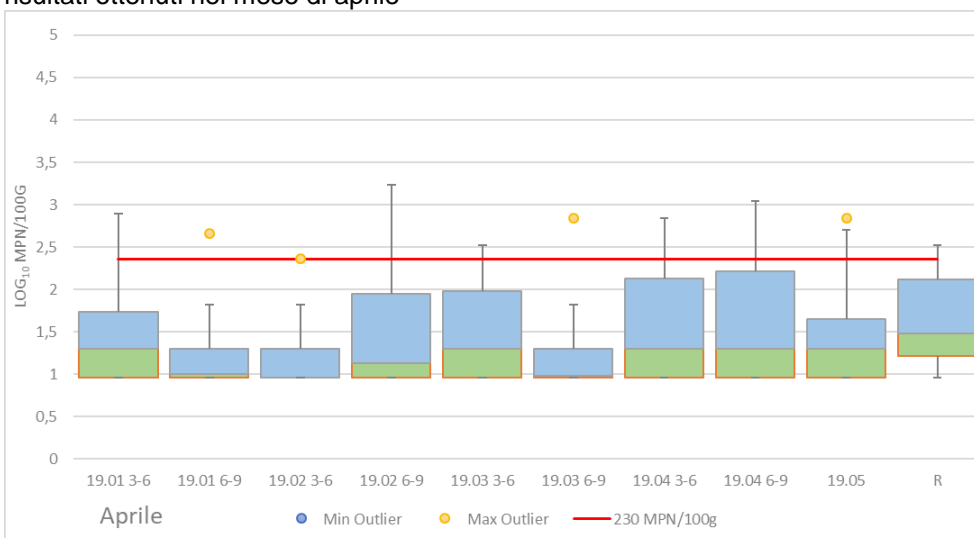


Gráfico 5: monitoraggio microbiológico dei banchi naturali di vongole della costa del Piceno: box-plot dei risultati ottenuti nel mese di maggio

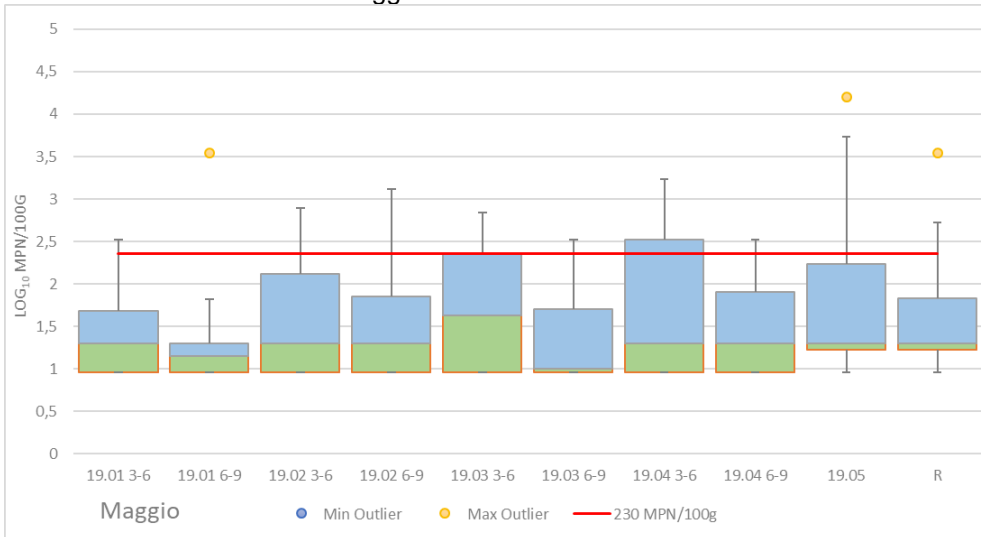


Gráfico 6: monitoraggio microbiológico dei banchi naturali di vongole della costa del Piceno: box-plot dei risultati ottenuti nel mese di giugno

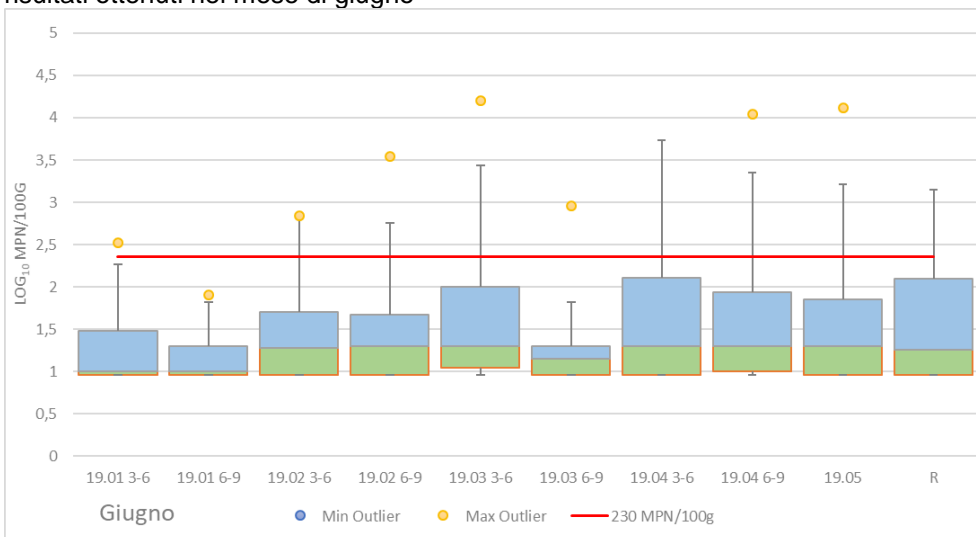


Gráfico 7: monitoraggio microbiológico dei banchi naturali di vongole della costa del Piceno: box-plot dei risultati ottenuti nel mese di luglio

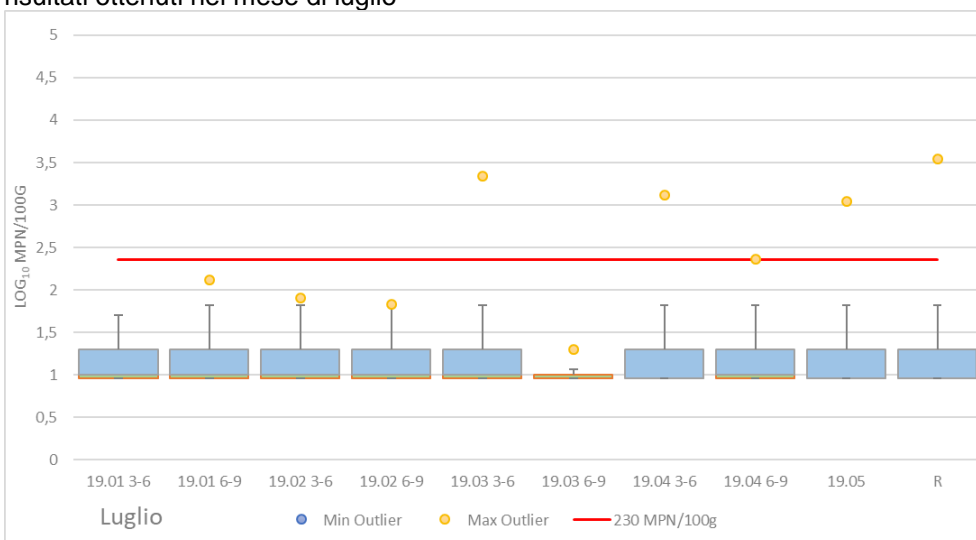


Gráfico 8: monitoraggio microbiologico dei banchi naturali di vongole della costa del Piceno: box-plot dei risultati ottenuti nel mese di agosto

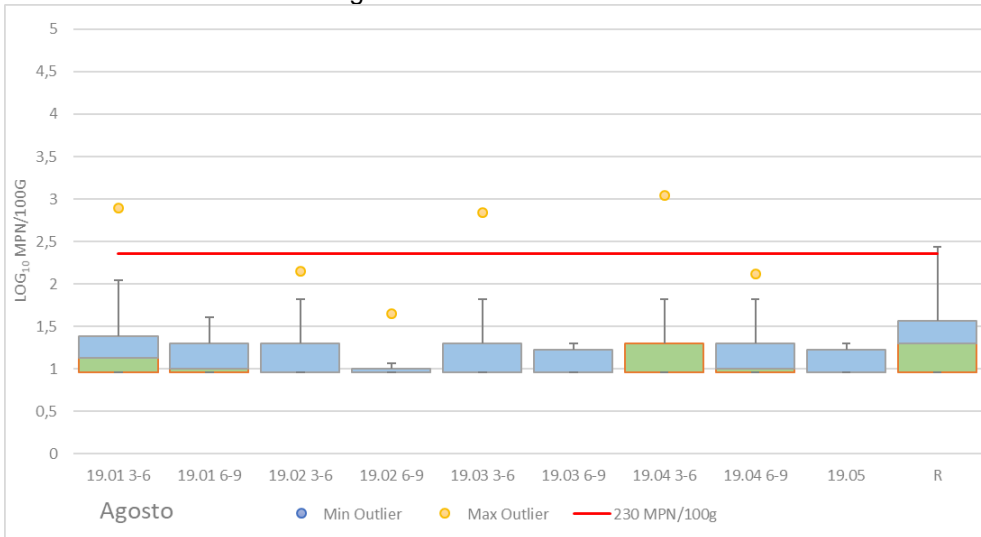


Gráfico 9: monitoraggio microbiologico dei banchi naturali di vongole della costa del Piceno: box-plot dei risultati ottenuti nel mese di settembre

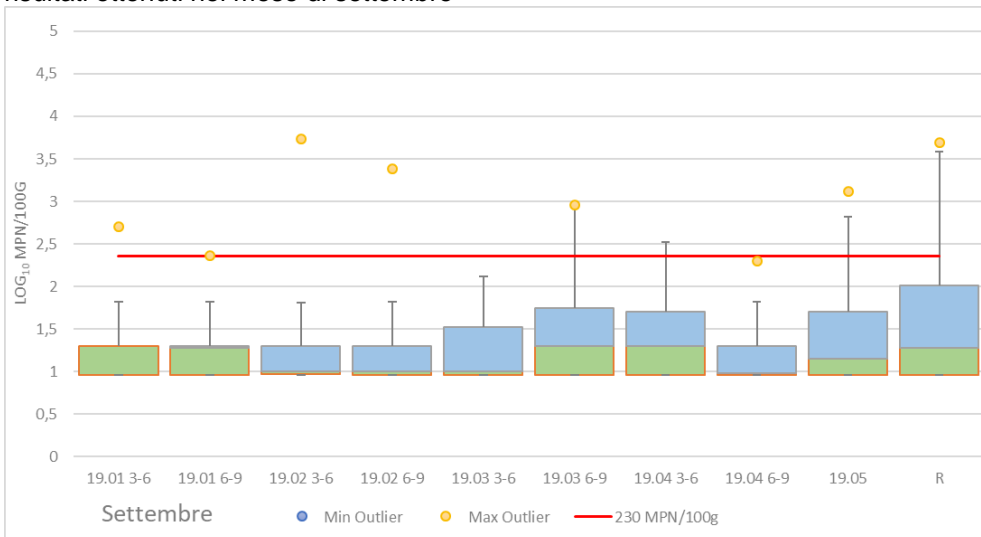


Gráfico 10: monitoraggio microbiologico dei banchi naturali di vongole della costa del Piceno: box-plot dei risultati ottenuti nel mese di ottobre

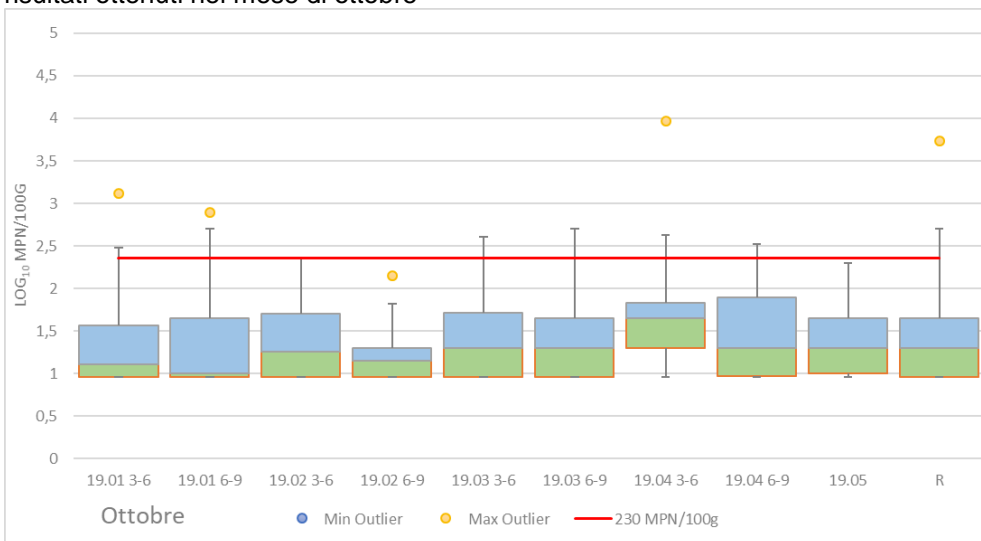


Gráfico 11: monitoraggio microbiologico dei banchi naturali di vongole della costa del Piceno: box-plot dei risultati ottenuti nel mese di novembre

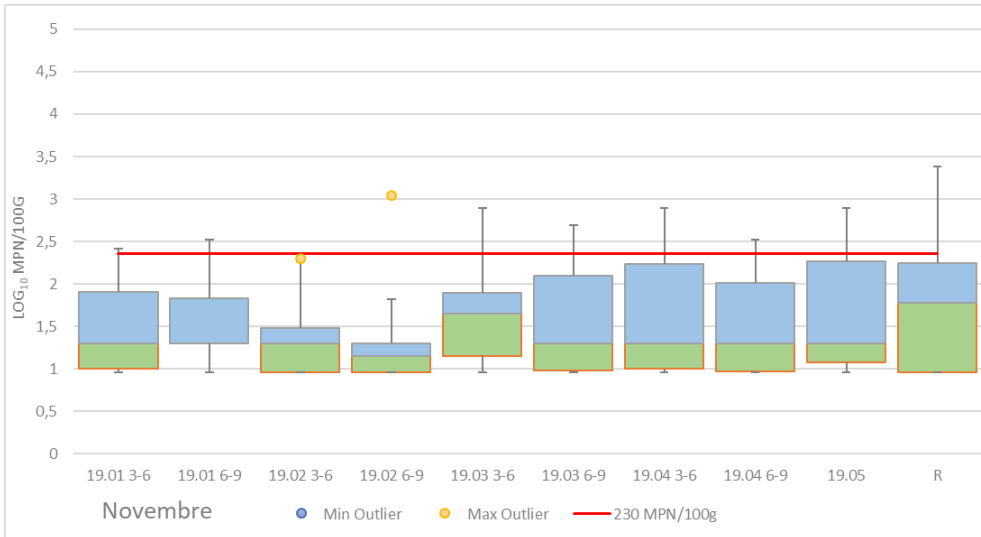


Gráfico 12: monitoraggio microbiologico dei banchi naturali di vongole della costa del Piceno: box-plot dei risultati ottenuti nel mese di dicembre

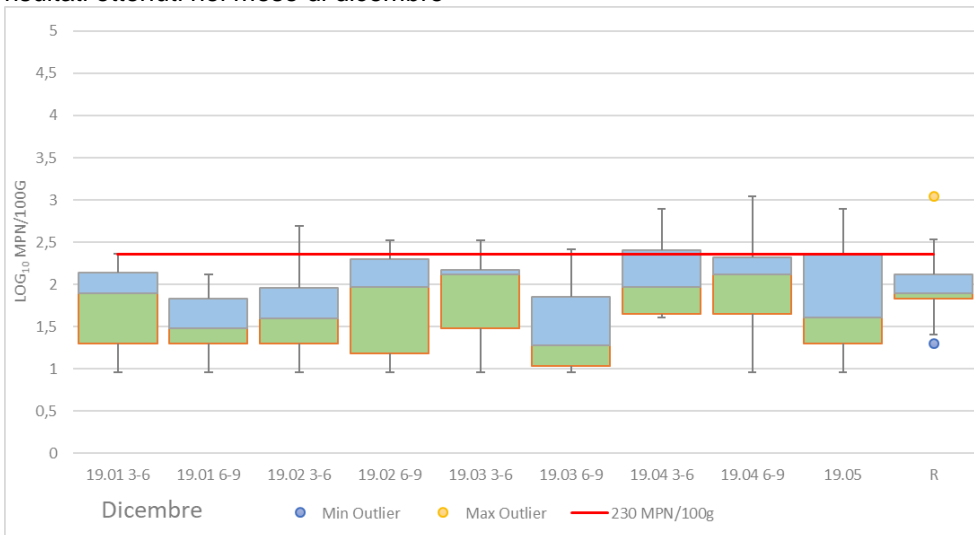
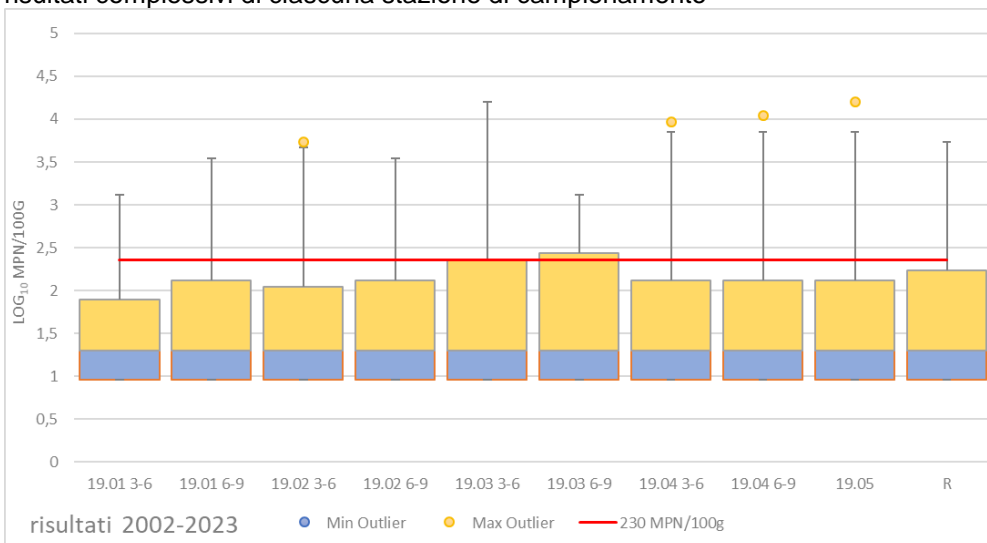


Gráfico 13: monitoraggio microbiologico dei banchi naturali di vongole della costa del Piceno: box-plot dei risultati complessivi di ciascuna stazione di campionamento



# Tetrodotossine nei molluschi bivalvi: primi casi di positività in Emilia-Romagna

D. Ippoliti<sup>1</sup>, D. Lenzo<sup>1</sup>, T. Vollaro<sup>1</sup>, M. Cangini<sup>2</sup>, S. Dall'Ara<sup>2</sup>, A. Calfapietra<sup>2</sup>, F. Pino<sup>2</sup>, S. Milandri<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia-Romagna – Bologna (BO)

<sup>2</sup>Fondazione Centro Ricerche Marine – Cesenatico (FC)

**Keywords:** Biotossine, Tetrodotossine (TTXs), Mar Adriatico, Molluschi Bivalvi

## Introduzione

Le tetrodotossine (TTXs) sono potenti neurotossine termostabili, idrosolubili, che si distinguono dalle altre biotossine marine in quanto di probabile origine batterica, e sono considerate le tossine più letali presenti nell'ambiente marino [1]. Le TTXs sono causa di avvelenamento nell'uomo soprattutto nei Paesi asiatici, a seguito del consumo di pesci palla (Famiglia Tetraodontidae).

Recentemente le TTXs sono state riscontrate anche nei molluschi bivalvi raccolti nel Mar Mediterraneo [2], [3], [4], [5], [6] e lungo le coste dell'Oceano Atlantico [6], [7], [8], costituendo pertanto un potenziale pericolo in termini di sicurezza alimentare.

L'Autorità Europea per la Sicurezza Alimentare (EFSA) nel 2017 ha proposto un valore soglia per le TTXs nei molluschi di 44 µg TTX /kg di parte edibile [9]. In Europa, alcuni Paesi come l'Olanda hanno già inserito nei loro piani di monitoraggio la ricerca di queste tossine adottando tale valore come limite di legge a livello nazionale. L'origine e la diffusione di TTXs in Mediterraneo sono ancora poco conosciute e si ipotizza che possano essere influenzate da fattori biotici e abiotici [10], [11].

In particolare, la presenza della fioritura della dinoflagellata *Prorocentrum cordatum*, l'aumento delle temperature, il basso idrodinamismo e il pH dell'acqua di mare sono i parametri oggetto di studio per l'analisi di eventuali correlazioni con la diffusione delle TTXs. In Italia, nel 2016 sono stati segnalati i primi ritrovamenti di mitili contaminati da queste tossine: in particolare si trattava della specie *Mytilus galloprovincialis* all'interno della Baia di Siracusa [5].

Nel 2017 e 2018, durante il monitoraggio ufficiale delle zone di produzione della Laguna di Marano (Friuli-Venezia Giulia), è stata ritrovata sempre in *M. galloprovincialis*, mentre nel 2019 è stata rilevata anche in *Crassostea gigas*. [4].

Ulteriori ritrovamenti di *M. galloprovincialis* contaminati da TTXs sono stati segnalati lungo la costa marchigiana nel 2018, 2019, 2020, 2021[2], [3].

Nel maggio 2023 la Fondazione Centro Ricerche Marine di Cesenatico (LNR per il monitoraggio delle Biotossine Marine) ha attivato un'indagine conoscitiva per verificare la presenza di TTXs in molluschi bivalvi provenienti dalle aree di produzione dell'Emilia-Romagna prelevati nel periodo maggio–settembre, stagione in cui le TTXs si erano manifestate in aree limitrofe (Friuli-Venezia Giulia e Marche). Il rilevamento di una fioritura della dinoflagellata *Prorocentrum cordatum* ha coinciso con l'accumulo di TTXs in *M. galloprovincialis* in una stazione prossima alla Diga Foranea Nord (Marina di Ravenna), sia a maggio 2023 che nello stesso periodo del 2024. Si tratta della prima segnalazione di presenza di TTXs in Emilia-Romagna, che documenta un ampliamento dell'areale di diffusione di questa tossina.

## Summary

Tetrodotoxins (TTXs) are particularly dangerous neurotoxins that has attracted the attention of scientists and health authorities, largely due to its lethal effects. These toxins are present in various marine organisms, particularly in the Tetraodontidae family, but recent research has also revealed their presence in bivalve molluscs in Mediterranean Sea and Atlantic Ocean, amplifying fears regarding food safety.

Therefore, the European Food Safety Authority (EFSA) in 2017 proposed a threshold value for TTXs in molluscs of 44 µg TTX /kg. The situation in Italy is worrying: the first cases of contamination were reported in 2016, in Sicily and subsequently in the upper-middle Adriatic Sea. Since May 2023 The Fondazione Centro Ricerche Marine of Cesenatico has started studies to investigate the presence of TTXs in bivalve molluscs of Emilia-Romagna, following the monitoring model of other areas already affected by contamination.

Research on the origin and spread of TTXs in the Mediterranean is still in its early stages. Scientists are investigating biotic and abiotic factors, such as the bloom of *Prorocentrum cordatum*, high temperatures, pH changes and water hydrodynamics, to better understand how and why TTXs are spreading in our marine environment.

## Materiali e Metodi

A partire da Maggio 2023 sono stati analizzati per la ricerca di TTXs 55 campioni di molluschi bivalvi (46 *M. galloprovincialis*, 7 *Ruditapes philippinarum* e 2 *Chamelea gallina*) provenienti da aree di produzione di molluschi bivalvi della Regione Emilia-Romagna. L'analisi chimica per l'identificazione e quantificazione delle TTXs è stata effettuata mediante la tecnica LC-MS/MS in modalità ESI+, andando a monitorare le transizioni (320.1 > 302.1, 162.1) secondo la metodica pubblicata dal Laboratorio Europeo di Riferimento per le

Biotossine Marine (EURLMB) [12]. La TTX è stata quantificata per confronto con le soluzioni di taratura preparate utilizzando materiale di riferimento certificato fornito da Cifga, l'indagine è stata estesa anche ad altri analoghi di TTX. Contestualmente ai molluschi bivalvi sono stati raccolti campioni di acqua di mare (tramite campionamento integrato) per la ricerca del fitoplancton produttore di biotossine. L'analisi avviene mediante l'utilizzo di un microscopio ottico rovesciato secondo il metodo EN 15204:2006. [13]

## Risultati e discussioni

Parallelamente all'indagine conoscitiva la Fondazione Centro Ricerche Marine effettua il controllo ufficiale sia delle biotossine algali che del fitoplancton produttore di tossine nelle aree di produzione di molluschi bivalvi dell'AUSL della Romagna. Questo ha permesso di intercettare la presenza di una prima fioritura della dinoflagellata *P. cordatum* ( $6,53 \times 10^3$  cell/L) il 29/05/2023 all'interno della zona di produzione chiamata DIFO Nord (Diga Foranea Nord di Ravenna). Si è dunque deciso di effettuare la determinazione del contenuto di TTXs nei mitili della corrispondente area di produzione. In questi campioni (*M. galloprovincialis*), per la prima volta in Emilia-Romagna, è stata rilevata la presenza delle tossine con valori di 35 µg TTX /kg p.e.. Analogamente nella primavera successiva (28/05/2024), nella stessa area e in un'area adiacente (DIFO Sud) si è ripresentata la fioritura di *P. cordatum* ( $58 \times 10^3$  cell/L e  $35 \times 10^3$  cell/L rispettivamente); anche in questa circostanza i campioni di mitili hanno confermato la presenza di TTXs (26 µg TTX /kg p.e. per DIFO Nord e 17 µg TTX /kg p.e. per DIFO Sud). Tutti gli altri campioni di bivalvi analizzati fino ad oggi sono invece risultati al di sotto del limite di quantificazione (LOQ) di TTX pari a 10 µg/kg.

I risultati ottenuti da queste segnalazioni vanno quindi a rafforzare l'ipotesi che *P. cordatum* sia in qualche modo coinvolto nell'accumulo di TTXs in organismi filtratori [2], [4]. Altro fattore determinante risulta essere la temperatura dell'acqua [11]: le positività sono state riscontrate in tarda primavera così come in tutti gli altri casi riportati in bibliografia [2], [3], [4], [5], [6], [10]

Questi recenti ritrovamenti in Emilia-Romagna sottolineano il fatto che le TTXs nei bivalvi commestibili in Europa non debbano più essere considerate un fenomeno emergente, ma piuttosto un potenziale rischio per la sicurezza alimentare, di recente introduzione e sempre più consolidato.

Tuttavia, intercettare gli eventi di tossicità da TTXs rimane ancora estremamente difficile, poiché queste non sono incluse tra le biotossine regolarmente monitorate sul territorio dell'Unione Europea (UE).

L'attuazione di un piano di monitoraggio che preveda l'identificazione e la quantificazione delle TTXs nei molluschi bivalvi potrebbe essere una buona strategia a protezione dei consumatori da possibili episodi di intossicazione derivanti dall'ingestione di prodotti contaminati. Inoltre, un intervento normativo sarebbe di supporto alle autorità locali competenti nella gestione del rischio riducendo al minimo le ipotetiche chiusure precauzionali che avrebbero un impatto negativo sull'economia del settore.

In conclusione, si evidenzia la necessità di ulteriori approfondimenti per comprendere al meglio la produzione e le dinamiche di trasferimento di queste tossine, così come il ruolo da attribuire a *P. cordatum*, la stagionalità e l'accumulo negli organismi marini.

## Bibliografia

- [1] J. Lago, L. P. Rodriguez, L. Blanco, J. M. Vieites, and A. G. Cabado, "Tetrodotoxin, an extremely potent marine neurotoxin: Distribution, toxicity, origin and therapeutical uses," *Mar Drugs*, vol. 13, no. 10, pp. 6384–6406, Oct. 2015, doi: 10.3390/md13106384.
- [2] S. Bacchiocchi *et al.*, "A Hotspot of TTX Contamination in the Adriatic Sea: Study on the Origin and Causative Factors," *Mar Drugs*, vol. 21, no. 1, Jan. 2023, doi: 10.3390/md21010008.
- [3] S. Bacchiocchi *et al.*, "Tetrodotoxins (Ttxs) and vibrio alginolyticus in mussels from central adriatic sea (italy): Are they closely related?," *Mar Drugs*, vol. 19, no. 6, Jun. 2021, doi: 10.3390/md19060304.
- [4] P. Bordin *et al.*, "First occurrence of tetrodotoxins in bivalve mollusks from Northern Adriatic Sea (Italy)," *Food Control*, vol. 120, Feb. 2021, doi: 10.1016/j.foodcont.2020.107510.
- [5] C. Dell'Aversano *et al.*, "First detection of tetrodotoxin and high levels of paralytic shellfish poisoning toxins in shellfish from Sicily (Italy) by three different analytical methods," *Chemosphere*, vol. 215, pp. 881–892, Jan. 2019, doi: 10.1016/j.chemosphere.2018.10.081.
- [6] P. Antonelli *et al.*, "Tetrodotoxin in live bivalve mollusks from Europe: Is it to be considered an emerging concern for food safety?," Jan. 01, 2022, *John Wiley and Sons Inc.* doi: 10.1111/1541-4337.12881.
- [7] A. D. Turner *et al.*, "Detection of Tetrodotoxin Shellfish Poisoning (TSP) toxins and causative factors in bivalve molluscs from the UK," *Mar Drugs*, vol. 15, no. 9, Sep. 2017, doi: 10.3390/md15090277.
- [8] A. Gerssen, T. H. F. Bovee, M. D. Klijnstra, M. Poelman, L. Portier, and R. L. A. P. Hoogenboom, "First report on the occurrence of tetrodotoxins in bivalve mollusks in the Netherlands," *Toxins (Basel)*, vol. 10, no. 11, Nov. 2018, doi: 10.3390/toxins10110450.
- [9] H. K. Knutsen *et al.*, "Risks for public health related to the presence of tetrodotoxin (TTX) and TTX analogues in marine bivalves and gastropods," *EFSA Journal*, vol. 15, no. 4, Apr. 2017, doi: 10.2903/j.efsa.2017.4752.
- [10] P. Antonelli *et al.*, "Tetrodotoxin in bivalve mollusks: An integrated study towards the comprehension of the influencing factors of a newly native phenomenon," *Chemosphere*, vol. 339, Oct. 2023, doi: 10.1016/j.chemosphere.2023.139682.
- [11] M. Dhanji-Rapkova *et al.*, "Sea temperature influences accumulation of tetrodotoxin in British bivalve shellfish," *Science of the Total Environment*, vol. 885, Aug. 2023, doi: 10.1016/j.scitotenv.2023.163905.
- [12] European Union Reference Laboratory for Marine Biotoxins (EURL MB), "Determination of Tetrodotoxin by HILIC-MS/MS, Vigo, Spain," 2017.
- [13] DIN EN 15204, *Water quality – guidance standard DIN on the enumeration of phytoplankton using inverted microscopy (Utermöhl technique)*. Beuth Verlag, Germany, 2006.

# Monitoraggio ambientale dell'ecosistema marino presso mitilocolture abruzzesi: confronto tra due diversi sistemi di rilevazione di dati sito-specifici

L. Lanci<sup>1</sup>, F. Mosca<sup>1</sup>, P. G. Tiscar<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Facoltà di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Teramo, Teramo, Italy

Keywords: Environmental monitoring, Precision aquaculture,

## Introduzione

La mitilicoltura è un settore caratterizzato da un ampio margine di crescita. In Europa, l'Italia costituisce il secondo produttore di mitili d'allevamento dopo la Spagna, con circa 64.000 tonnellate all'anno e un consumo medio di 120.000 tonnellate. Tuttavia, negli ultimi decenni, il settore ha dovuto affrontare numerose sfide, legate soprattutto al fenomeno del riscaldamento globale, quali l'incremento delle temperature, la conseguente ipossia e acidificazione delle acque, gli eventi di fioritura algale nociva e la necessità di adeguarsi a standard sempre più rigorosi in termini di sostenibilità e sicurezza alimentare. Il monitoraggio continuo dei parametri ambientali risulta essenziale per prevenire e mitigare tali eventi, per permettere il perfezionamento delle dinamiche e dei processi di allevamento e per migliorare accuratezza, precisione e ripetibilità delle operazioni condotte. La crescita del bivalve, nel contesto produttivo, varia nel tempo e nello spazio e dipende da un complesso modello di interazioni con l'ambiente. Nonostante tali dinamiche siano ormai note da tempo, la loro effettiva comprensione e la modellizzazione del controllo ambientale necessitano ancora di moltissimi progressi. Attualmente, i sistemi maggiormente impiegati per il monitoraggio ambientale includono i rilievi satellitari e l'impiego di sonde multiparametriche. I primi si basano sull'utilizzo di sensori remoti per raccogliere dati fisici e biogeochimici sulla superficie terrestre e sulle acque marine. Si tratta di una tecnologia particolarmente utile per il monitoraggio di vaste aree, in quanto permette di ottenere una visione d'insieme dello stato dell'ecosistema marino su scale spaziali e temporali che sarebbero impossibili da coprire con metodi tradizionali. Le sonde multiparametriche sono strumenti progettati per misurare simultaneamente vari parametri chimico-fisici e possono essere installate in punti fissi o montate su veicoli subacquei autonomi, offrendo un monitoraggio continuo e dettagliato. L'obiettivo del presente studio è stato quello di operare un confronto qualitativo tra i rilievi effettuati mediante sistema satellitare e le misurazioni ottenute attraverso l'impiego di una sonda multiparametrica collocata presso una mitilicoltura situata lungo la costa abruzzese.

## Summary

Mussel aquaculture is now largely present worldwide in coastal areas and it is still an industry with great room to grow. In Europe, Italy is the second main producer of farmed mussels after Spain, with about 64,000 tonnes per year and an average consumption of 120,000 tonnes. However, in recent decades, the sector has faced significant challenges due to global warming, including rising temperatures, hypoxia, ocean acidification, harmful algal blooms, and stricter sustainability and food safety standards. Continuous monitoring of environmental parameters is essential to prevent and mitigate such events, as well as to improve breeding processes by increasing operations accuracy, precision and repeatability. In a shellfish farm, the bivalve growth varies in time and space and depends on a complex pattern of interactions between the animal and a wide range of environmental factors. Although these dynamics have long been known, the effective understanding of processes and environment modelling need to make rapid progress. Currently, the most frequently used systems for environmental monitoring include satellite surveys and the use of multiparameter probes. Satellite systems rely on remote sensors to collect physical and biogeochemical data on the earth's surface and marine waters. This technology efficiently monitors large areas, offering a comprehensive view of the marine ecosystem that traditional methods cannot match. Multiparametric probes measure multiple chemical-physical parameters and can be fixed or mobile for continuous detailed monitoring. The aim of this study was to make a qualitative comparison between satellite measurements and those obtained by using a multiparameter probe at a mussel farm located along the Abruzzo coast.

## Materiali e metodi

Il rilievo dei parametri ambientali è stato effettuato presso una mitilicoltura situata a nord di Vasto, lungo la costa abruzzese (42.2433526 N 14.6242991 E) sia mediante sistema diretto, basato su un'apposita stazione di monitoraggio, che indiretto, legato alla gestione del dato satellitare attraverso la piattaforma Copernicus®. La stazione di monitoraggio è costituita da una sonda multiparametrica, collocata ad una profondità di circa 13 m, adibita al rilievo, a cadenza di 15 minuti, dei dati inerenti temperatura (C°), salinità (ppt), ossigeno disciolto (mmol/m<sup>3</sup>) e clorofilla (mg/m<sup>3</sup>). Le misurazioni vengono puntualmente inviate online dal sistema, in modo tale da garantire un semplice e rapido accesso alle informazioni ottenute. I dati satellitari sono ricavati direttamente dalla piattaforma Copernicus®, attraverso i prodotti Mediterranean Sea Physics Analysis and Forecast (risoluzione 0.042° × 0.042°)<sup>1</sup> e Mediterranean Sea Biogeochemistry Analysis and Forecast (risoluzione 0.042° × 0.042°)<sup>2</sup> e sono relativi ai seguenti parametri, misurati alla medesima profondità di 13



metri, a cadenza giornaliera: temperatura (C°), salinità (ppt), ossigeno disciolto (mmol/m<sup>3</sup>) e clorofilla (mg/m<sup>3</sup>). I dati sono stati rilevati dai due sistemi a partire dal 1 gennaio 2023 fino al 1 gennaio 2024 e sono stati opportunamente interpolati, allo scopo di comprendere le variazioni stagionali dell'ambiente fisico-chimico oggetto di monitoraggio.

## Risultati e discussione

I risultati non mostrano corrispondenza tra i due sistemi per la maggior parte dei parametri considerati. Relativamente alla temperatura, in entrambi i casi appare evidente il tipico andamento stagionale, con valori minimi di 10-12 °C tra gennaio e febbraio e massimi di 26-27.5 °C tra luglio e agosto. Sebbene gli andamenti mostrino trend quasi sovrapponibili tra i due sistemi, le temperature rilevate dalla sonda multiparametrica manifestano maggiore variabilità o oscillazioni rispetto al satellite. Inoltre, la sonda registra valori massimi più elevati (picco oltre i 27.5 °C) e minimi più bassi (<10 °C) se confrontati con i dati di Copernicus® (26.5 °C e 11 °C rispettivamente). La concentrazione di ossigeno disciolto mostra anch'essa un chiaro andamento stagionale con una tendenza inversamente proporzionale rispetto alla temperatura. Ciò nonostante, i due sistemi si discostano notevolmente. I dati ricavati dalla sonda multiparametrica, infatti, raggiungono picchi massimi (300 mmol/m<sup>3</sup> a marzo) e minimi (<180 mmol/m<sup>3</sup> a giugno) molto più marcati rispetto al sistema satellitare (260 mmol/m<sup>3</sup> a giugno e 210 mmol/m<sup>3</sup> a settembre). Inoltre, il dato del satellite mostra minori fluttuazioni e i valori ricadono all'interno di un range piuttosto ridotto e uniforme nel tempo. La salinità presenta un andamento stagionale simile tra i due sistemi, ma piuttosto inusuale. I valori rilevati dalla sonda a gennaio si attestano intorno a 34 psu, per poi aumentare gradualmente fino a marzo-aprile, quando si raggiunge il picco massimo (37 psu). Ciò risulta parzialmente in linea con quanto normalmente atteso, poiché generalmente la salinità tende ad aumentare con l'avanzare della primavera. Tuttavia, l'entità del picco è notevole rispetto a quella solitamente rilevata in questa stagione, soprattutto per un'area costiera in cui si riversano acque dolci. Nel corso dei mesi estivi, invece, non si osserva un incremento costante dei valori, ma si assiste ad una forte oscillazione, con picchi e cadute che non seguono un trend di crescita chiaro. Anzi, soprattutto tra giugno e luglio, la salinità scende a circa 32 psu, il che è inusuale, considerata la maggiore evaporazione che caratterizza i periodi estivi. In autunno, la salinità continua a mostrare forti oscillazioni, con un calo significativo a partire da novembre in linea con la riduzione della salinità attesa con l'aumento delle piogge, nonostante la rapidità e l'entità di tale calo risultino molto accentuate. L'andamento della salinità rilevata dal satellite è molto più stabile, con valori che si mantengono intorno a 38 psu per la maggior parte dell'anno. Questo riflette una media spaziale e temporale che smussa le variazioni locali e temporanee ben evidenziate dalla sonda. La clorofilla è un indicatore chiave della biomassa fitoplanctonica, e le sue variazioni stagionali possono riflettere i cicli di crescita del fitoplancton, influenzati da fattori come temperatura, disponibilità di nutrienti e luce solare. I dati ricavati dalla sonda mostrano un picco notevole tra marzo e aprile, con valori che raggiungono quasi i 40 mg/m<sup>3</sup>. Questo periodo di alta produttività primaria è tipico delle acque costiere, dove l'aumento della luce solare e la disponibilità di nutrienti (spesso dovuti ai flussi fluviali primaverili) stimolano una fioritura algale intensa. Un secondo aumento della clorofilla è osservabile a partire da ottobre fino a novembre, sebbene sia molto meno pronunciato rispetto a quello primaverile. Anch'esso è in linea con l'andamento stagionale atteso ed è dovuto probabilmente alle temperature ancora miti e al rimescolamento dei nutrienti da parte di correnti o venti. Il satellite, al contrario, non sembra catturare questi picchi in modo evidente. In questo caso, l'andamento resta uniforme per tutto l'anno, con valori costantemente bassi, attorno a 1 mg/m<sup>3</sup> o meno, suggerendo una possibile sottostima delle variazioni locali di clorofilla. Tali risultati evidenziano chiaramente i punti di forza e le limitazioni di ciascun sistema di rilevazione. La sonda multiparametrica è molto sensibile ai cambiamenti locali, aspetto essenziale per studi che richiedono un monitoraggio dettagliato e in tempo reale delle condizioni ambientali in un'area specifica. Sebbene tale sistema introduca un maggior livello di complessità nell'interpretazione dei dati, ciò consente di porre in essere interventi tempestivi in presenza di condizioni ambientali che possono avere effetti devastanti sulla crescita e sul benessere dei mitili allevati. Il satellite, al contrario, fornisce una visione d'insieme più stabile e meno influenzata dalle fluttuazioni sito-specifiche, il che è utile per il monitoraggio su larga scala e per l'osservazione di tendenze generali a lungo termine. Inoltre, le rilevazioni satellitari sono più accurate in superficie e possono perdere di precisione a profondità maggiori, a causa della torbidità e delle interferenze ottiche. In ogni caso, l'impiego combinato dei due sistemi offre una comprensione più completa delle dinamiche ambientali.

## Bibliografia

[1] Clementi, E., Aydogdu, A., Goglio, A. C., Pistoia, J., Escudier, R., Drudi, M., Grandi, A., Mariani, A., Lyubartsev, V., Lecci, R., Creti, S., Coppini, G., Masina, S., & Pinardi, N. (2021). Mediterranean Sea Physical Analysis and Forecast (CMEMS MED-Currents, EAS6 system) (Version 1) [Data set]. Copernicus Monitoring Environment Marine Service (CMEMS).

[2] Feudale, L., Bolzon, G., Lazzari, P., Salon, S., Teruzzi, A., Di Biagio, V., Coidessa, G., Alvarez, E., Amadio, C., & Cossarini, G. (2022). Mediterranean Sea Biogeochemical Analysis and Forecast (CMEMS MED-Biogeochemistry, MedBFM4 system) (Version 1) [Data set]. Copernicus Marine Service.

# DNA mitocondriale di *Callinectes sapidus*: storia evolutiva e una sister species ancora da descrivere

C. Locci<sup>1,2</sup>, I. Azzena<sup>1</sup>, N. Pascale<sup>1,3</sup>, A. Ciccozzi<sup>2</sup>, I. A. Giantsis<sup>4</sup>, D. K. Papadopoulos<sup>4</sup>, A. Lattos<sup>4</sup>, F. Orrù<sup>5</sup>, C. M. Puzzi<sup>5</sup>, F. Scarpa<sup>2</sup>, M. Casu<sup>1</sup>, D. Sanna<sup>2</sup>

<sup>1</sup>) Dipartimento di Medicina Veterinaria, Università di Sassari, Via Vienna 2, 07100 Sassari, Italia; iazzena@uniss.it (I.A.); npascale@uniss.it (N.P.); marcasu@uniss.it (M.C.)

<sup>2</sup>) Dipartimento di Scienze Biomediche, Università di Sassari, Viale San Pietro 43b, 07100 Sassari, Italia; c.locci3@phd.uniss.it (C.L.); aciccozzi@uniss.it (A.C.); fscarpa@uniss.it (F.S.); darsanna@uniss.it (D.S.);

<sup>3</sup>) Dipartimento di Scienze Chimiche, Fisiche, Matematiche, e Naturali, Università di Sassari, Via Vienna 2, 07100 Sassari, Italia

<sup>4</sup>) Laboratorio di Ittiologia e Pesca, Facoltà di Agraria, Silvicoltura e Ambiente Naturale, Università Aristotele di Salonicco, 541 24 Salonicco, Grecia; igiants@auth.gr (I.A.G.); dkpapado@bio.auth.gr (D.K.P.); lattosad@bio.auth.gr (A.L.)

<sup>5</sup>) GRAIA Gestione Ricerca Ambientale Ittica Acque, via Repubblica 1, 21020 Varano Borghi (VA), Italia; [florru@tiscali.it](mailto:florru@tiscali.it) (F.O.); [Cesare.Puzzi@graia.eu](mailto:Cesare.Puzzi@graia.eu) (C.M.P.)

**Keywords:** Specie aliena; DNA mitocondriale; invasione; Mar Mediterraneo; speciazione criptica; variabilità genetica; storia evolutiva.

## Introduzione

Il granchio blu (*Callinectes sapidus*) è una specie aliena invasiva del Mar Mediterraneo [1,2]. La sua espansione rappresenta una delle minacce più significative per la biodiversità e la stabilità degli ecosistemi marini, con rilevanti impatti anche sulle attività commerciali [3,4]. Originario dell'Atlantico occidentale [5], questo crostaceo è maggiormente diffuso nelle coste orientali del Nord e Sud America, includendo il Mar dei Caraibi [6-8]. Grazie alla sua elevata capacità di adattamento a diverse temperature e habitat, come estuari, lagune e acque costiere [9-12], il granchio blu si è rapidamente diffuso in nuove aree geografiche, facilitato da meccanismi di dispersione come le acque di sentina delle navi [5,13,14]. Inoltre, la lunga fase larvale e le sue notevoli capacità natatorie hanno favorito ulteriormente la sua espansione [8,15,16]. In particolare, l'invasività del granchio blu nel Mediterraneo ha causato rilevanti danni economici ed ambientali, compromettendo le attività di pesca e acquacoltura, e competendo con le specie autoctone [15,16]. A partire dal 1900, il granchio blu ha espanso il suo areale di distribuzione fino a raggiungere numerose acque costiere europee [5]. Tale espansione ha sollevato preoccupazioni non solo per gli effetti ecologici diretti, ma anche per la potenziale trasmissione di patogeni e malattie, che potrebbero influenzare negativamente specie marine locali [17-19]. Il valore commerciale del granchio blu è elevato in alcune regioni, come la Turchia [20-23], e varia significativamente in altre aree del Mediterraneo, come Grecia [24], Italia [25] ed Egitto [26]. Tuttavia, le attuali conoscenze sulla diversità genetica e sulle dinamiche di diffusione di *Callinectes sapidus* sono ancora limitate. Studi recenti hanno identificato la presenza di diversi lignaggi genetici nelle popolazioni native [22,27], ma hanno riportato una bassa diversità genetica nelle popolazioni mediterranee, ad eccezione delle popolazioni turche [22].

In questo contesto, il presente studio si propone di indagare le dinamiche di invasione del granchio blu sia nelle sue aree native che in quelle introdotte, con un focus sul Mediterraneo. L'obiettivo è di determinare i livelli di variabilità genetica tra e all'interno delle popolazioni di granchio blu, provenienti dall'Atlantico e dal Mediterraneo, e chiarire lo status tassonomico della specie mediante l'impiego di analisi filogeografiche e filogenetiche.

## Summary

The Atlantic blue crab (*Callinectes sapidus*) is an invasive alien species in the Mediterranean Sea, posing significant threats to biodiversity and human activities. Native to the North America Atlantic coasts, it has expanded its geographical range since the early 1900s, reaching various European coastal waters, facilitated by its adaptability to several temperature ranges and habitats. In this context, this study aimed to investigate the genetic variability and evolutionary history of *Callinectes sapidus* in both its native and introduced areas, with a focus on the Mediterranean Sea. Genetic analyses were performed on a total of 667 mitochondrial Cytochrome c Oxidase Subunit I (COI) gene sequences. This dataset included 36 sequences obtained in the present study from previously under-investigated Mediterranean sites and 631 sequences from worldwide locations obtained from GenBank. Our results revealed two distinct, yet closely related, genetic groups within the species' distribution, indicating a possible species complex. Moreover, Mediterranean populations showed reduced genetic variability, except for Turkish populations, which exhibited an incipient genetic differentiation. This research enhances our comprehension of the global genetic diversity and evolutionary patterns of *Callinectes sapidus*. However, further genetic and morphological studies are needed to understand the diversity among blue crab populations and to develop effective management strategies.

## Materiali e Metodi

Per raggiungere gli obiettivi del nostro studio abbiamo raccolto 36 campioni di granchio blu da siti selezionati nel Mar Mediterraneo (Sardegna e Grecia). Le analisi molecolari sono state condotte sul gene mitocondriale Citocromo c Ossidasi Subunità I (COI), ottenendo un totale di 36 nuove sequenze (633 bp). Per inserire i nostri campioni in un contesto geografico più ampio, il dataset ottenuto è stato integrato con 631 sequenze, disponibili sul database pubblico GenBank, rappresentative di diverse aree geografiche nel mondo. Inoltre, un subset di 86 sequenze è stato creato combinando tutte le sequenze ottenute nel presente studio con quelle provenienti da diverse regioni del Mediterraneo. In seguito, analisi di tipo filogeografico e filogenetico sono state condotte per valutare i livelli di variabilità genetica, lo status tassonomico della specie, e i rapporti evolutivi all'interno delle popolazioni di granchio blu.

## Risultati e Discussione

Le analisi genetiche effettuate sul dataset completo hanno rilevato la presenza di strutturazione genetica tra due gruppi distinti di sequenze, compatibili con l'esistenza di due sister species. Il primo gruppo è composto prevalentemente da popolazioni provenienti dal Sud America, mentre il secondo include principalmente popolazioni del Nord America, del Mediterraneo e del Mar Nero. Inoltre, i risultati dell'analisi filogenetica suggeriscono che il differenziamento tra questi due gruppi sia avvenuto circa 500,000 anni fa, a partire da un antenato comune che abitava le coste atlantiche circa 700,000 anni fa, durante la Transizione del Medio-Pleistocene, un periodo di significativi cambiamenti climatici [28]. Tali condizioni climatiche, caratterizzate da oscillazioni e variazioni nei cicli glaciali e interglaciali, potrebbero aver influenzato la variabilità genetica e i movimenti migratori del granchio blu [28-30].

Nel bacino del Mediterraneo, i risultati ottenuti mostrano una ridotta variabilità genetica, con la prevalenza di due aplotipi principali (CSWM1-CSWM2) [21,22] in tutta la regione, ad eccezione delle popolazioni turche, che mostrano segni di un differenziamento genetico incipiente. Questo scenario potrebbe essere la conseguenza del fatto che il granchio blu sia arrivato, e rapidamente adattato, in Turchia circa un secolo prima rispetto alle altre regioni del Mediterraneo attualmente interessate dall'invasione di questa specie [5,20-22].

Questo studio fornisce importanti approfondimenti sulla variabilità genetica, la storia evolutiva e le dinamiche di distribuzione del granchio blu (*Callinectes sapidus*) in gran parte del suo areale di distribuzione, contribuendo alla comprensione dei modelli di espansione della specie in nuovi ambienti, in particolare nel Mediterraneo. Tuttavia, ulteriori studi genetici e morfologici sono necessari per comprendere e prevedere la potenziale espansione futura del granchio blu, e per sviluppare piani di gestione e monitoraggio efficaci.

## Bibliografia

- [1] Zenetos, A.; Çınar, M. E.; Crocetta, F.; Golani, D.; Rosso, A.; Servello, G.; Shenkar, N.; Turon, X.; Verlaque, M. Uncertainties and validation of alien species catalogues: The Mediterranean as an example. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* **2017**, *191*, 171-187. <https://doi.org/10.1016/j.ecss.2017.03.031>
- [2] Galil, B. S.; Marchini, A.; Occhipinti-Ambrogi, A. East is east and West is west? Management of marine bioinvasions in the Mediterranean Sea. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* **2018**, *201*, 7-16. <https://doi.org/10.1016/j.ecss.2015.12.021>
- [3] Vilà, M.; Hulme, P. E. *Impact of Biological Invasions on Ecosystem Services*; Springer: Netherlands, Dordrecht, 2017. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-45121-3>
- [4] Mancinelli, G.; Bardelli, R.; Zenetos, A. A global occurrence database of the Atlantic blue crab *Callinectes sapidus*. *Sci. Data* **2021**, *8*, 111. <https://doi.org/10.1038/s41597-021-00888-w>
- [5] Nehring, S. Invasion history and success of the American blue crab *Callinectes sapidus* in European and adjacent waters. In *In the wrong place - alien marine crustaceans: distribution, biology and impacts*; Galil, B., Clark, P., Carlton, J., Eds.; Springer: Netherlands, Dordrecht, 2011, pp. 607-624. [https://doi.org/10.1007/978-94-007-0591-3\\_21](https://doi.org/10.1007/978-94-007-0591-3_21)
- [6] Churchill, E. P. Life history of the blue crab. *Bull. Bur. Fish* **1919**, *36*, 95-128. <https://fisherybulletin.nmfs.noaa.gov/sites/default/files/pdf-content/fish-bull/fb36.3.pdf>
- [7] Van Engel, W. A. The blue crab and its fishery in Chesapeake Bay. Part 1. Reproduction, early development, growth and migration. *Comm. Fish. Rev.* **1958**, *20*(6), 6. <https://spo.nmfs.noaa.gov/sites/default/files/pdf-content/mfr2062.pdf>
- [8] Hill, J.; Fowler, D. L.; Avyle, M. V. Species profiles: Life histories and environmental requirements of coastal fishes and invertebrates (Mid-Atlantic) - Blue crab. U.S. Army Corps of Engineers, Vicksburg, 1989. <https://apps.dtic.mil/sti/pdfs/ADA210181.pdf>
- [9] Hines, A. H. Ecology of juvenile and adult blue crabs: summary of discussion of research themes and directions. *Bull. Mar. Sci.* **2003**, *72*, 423-433. [https://repository.si.edu/bitstream/handle/10088/18446/serc\\_Hines\\_2003\\_BMarSci\\_72\\_423\\_433](https://repository.si.edu/bitstream/handle/10088/18446/serc_Hines_2003_BMarSci_72_423_433)
- [10] Walters, E. A.; Bojko, J.; Crowley, C. E.; Gandy, R. L.; Martin, C. W.; Shea, C. P.; Bateman, K. S.; Stentiford, G. D.; Behringer, D. C. Salinity and temperature affect the symbiont profile and host condition of Florida USA blue crabs *Callinectes sapidus*. *J. Invertebr. Pathol.* **2023**, *198*, 107930. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2023.107930>
- [11] Marchessaux, G.; Bosch-Belmar, M.; Cilenti, L.; Lago, N.; Mangano, M. C.; Marsiglia, N.; Sarà, G. The invasive blue crab *Callinectes sapidus* thermal response: Predicting metabolic suitability maps under future warming Mediterranean scenarios. *Front. Mar. Sci.* **2022**, *9*, 1055404. <https://doi.org/10.3389/fmars.2022.1055404>
- [12] Lewis, D. H.; Roer, R. D. Thermal preference in distribution of blue crabs, *Callinectes sapidus*, in a power plant cooling pond. *J. Crustac. Biol.* **1988**, *8*(2), 283-289. <https://doi.org/10.2307/1548320>

- [13] Kevrekidis, K.; Kevrekidis, T.; Mogias, A.; Boubonari, T.; Kantaridou, F.; Kaisari, N.; Malea, P.; Dounas, C.; Thessalou-Legaki, M. Fisheries Biology and Basic Life-Cycle Characteristics of the Invasive Blue Crab *Callinectes sapidus* Rathbun in the Estuarine Area of the Evros River (Northeast Aegean Sea, Eastern Mediterranean). *J. Mar. Sci. Eng.* **2023**, *11*, 462. <https://doi.org/10.3390/jmse11030462>
- [14] Serbetis, C. Un nouveau Crustacé comestible en Mer Egée *Callinectes sapidus* Rathb. (Décapode brachyoure). *Proc. Gen. Fish. Comm. Mediterran.* **1959**, *5*, 505–507.
- [15] Millikin, M. R.; Williams, A. B. Synopsis of biological data on blue crab, *Callinectes sapidus* Rathbun. In *FAO Fisheries Synopsis*; NMFS (National Marine Fisheries Service), United States, 1984, 138, pp. 32-39. <https://repository.library.noaa.gov/view/noaa/5574>
- [16] Marchessaux, G.; Chevalier, C.; Mangano, M. C.; Sarà, G. Larval connectivity of the invasive blue crabs *Callinectes sapidus* and *Portunus segnis* in the Mediterranean Sea: A step toward improved cross border management. *Mar. Pollut. Bull.* **2023**, *194*, 115272. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2023.115272>
- [17] Mancinelli, G.; Carrozzo, L.; Costantini, M. L.; Rossi, L.; Marini, G.; Pinna, M. Occurrence of the Atlantic blue crab *Callinectes sapidus* Rathbun, 1896 in two Mediterranean coastal habitats: Temporary visitor or permanent resident?. *Estuar. Coast. Shelf S.* **2013**, *135*, 46-56. <https://doi.org/10.1016/j.ecss.2013.06.008>
- [18] Small, H. J.; Shields, J. D.; Hudson, K. L.; Reece, K. S. Molecular detection of *Hematodinium* sp. infecting the blue crab, *Callinectes sapidus*. *J. Shellfish Res.* **2007**, *26*, 131-139. [https://doi.org/10.2983/0730-8000\(2007\)26\[131:MDOHSI\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.2983/0730-8000(2007)26[131:MDOHSI]2.0.CO;2)
- [19] Lattos, A.; Papadopoulos, D. K.; Giantsis, I. A.; Stamelos, A.; Karagiannis, D. Histopathology and Phylogeny of the Dinoflagellate *Hematodinium perezii* and the Epibiotic Peritrich Ciliate *Epistylis* sp. Infecting the Blue Crab *Callinectes sapidus* in the Eastern Mediterranean. *Microorganisms* **2024**, *12*, 456. <https://doi.org/10.3390/microorganisms12030456>
- [20] Öztürk, R. Ç.; Terzi, Y.; Feyzioğlu, A. M.; Şahin, A.; Aydın, M. Genetic characterization of the invasive Blue crab, *Callinectes sapidus* (Rathbun, 1896), in the Black Sea. *Reg. Stud. Mar. Sci.* **2020**, *39*, 101412. <https://doi.org/10.1016/j.rsma.2020.101412>
- [21] González-Ortegón, E.; Berger, S.; Encarnação, J.; Chairi, H.; Morais, P.; Teodosio, M. A.; Oliva-Paterna, F. J.; Schubart C. D.; Cuesta, J. A. Free pass through the pillars of Hercules? Genetic and historical insights into the recent expansion of the Atlantic blue crab *Callinectes sapidus* to the West and the East of the Strait of Gibraltar. *Front. Mar. Sci.* **2022**, *9*, 918026. <https://doi.org/10.3389/fmars.2022.918026>
- [22] Schubart, C. D.; Deli, T.; Mancinelli, G.; Cilenti, L.; Gil Fernández, A.; Falco, S.; Berger, S. Phylogeography of the Atlantic blue crab *Callinectes sapidus* (Brachyura: Portunidae) in the Americas versus the Mediterranean Sea: Determining origins and genetic connectivity of a large-scale invasion. *Biology* **2022**, *12*(1), 35. <https://doi.org/10.3390/biology12010035>
- [23] Öndes, F.; Gökçe, G. Distribution and Fishery of the Blue Crab (*Callinectes sapidus* Rathbun, 1896) in Turkey Based on Local Ecological Knowledge of Fishers. *J. Anatol. Environ. Animal Sci.* **2021**, *6*(3), 325-332. <https://doi.org/10.35229/jaes.891379>
- [24] Kampouris, T. E.; Porter, J. S.; Sanderson, W. G. *Callinectes sapidus* Rathbun, 1896 (Brachyura: Portunidae): An assessment on its diet and foraging behaviour, Thermaikos Gulf, NW Aegean Sea, Greece: Evidence for ecological and economic impacts. *Crustac. Res.* **2019**, *48*, 23–37. [https://doi.org/10.18353/crustacea.48.0\\_23](https://doi.org/10.18353/crustacea.48.0_23)
- [25] Manfrin, C.; Turolla, E.; Chung, J. S.; Giulianini, P. G. First occurrence of *Callinectes sapidus* (Rathbun, 1896) within the Sacca di Goro (Italy) and surroundings. *Check List* **2015**, *11*, 1640. <https://doi.org/10.15560/11.3.1640>
- [26] Abdel-Razek, F. A. Crab fishery of the Egyptian waters with notes on the bionomics of *Portunus pelagicus* (L.). *Acta Adriat.* **1987**, *28*(1/2), 143-154. <https://acta.izor.hr/ojs/index.php/acta/article/view/852>
- [27] Windsor, A. M.; Moore, M. K.; Warner, K. A.; Stadig, S. R.; Deeds, J. R. Evaluation of variation within the barcode region of Cytochrome c Oxidase I (COI) for the detection of commercial *Callinectes sapidus* Rathbun, 1896 (blue crab) products of non-US origin. *PeerJ.* **2019**, *7*, e7827. <https://doi.org/10.7717/peerj.7827>
- [28] Head, M. J.; Gibbard, P. L. Early–Middle Pleistocene transitions: linking terrestrial and marine realms. *Quat. Int.* **2015**, *389*, 7-46. <https://doi.org/10.1016/j.quaint.2015.09.042>
- [29] Oliveira, D.; Desprat, S.; Yin, Q.; Rodrigues, T.; Naughton, F.; Trigo, R.; Su, Q.; Grimalt, J. O.; Alonso-Garcia, M.; Voelker, A. H. L.; et al. Enhanced humidity in SW Iberia driven by the combination of insolation and ice-sheet forcing during MIS 13 interglacial. In *EGU General Assembly Conference Abstracts*, EGU General Assembly 2021, online, 19–30 Apr 2021, EGU21-11408. <https://doi.org/10.5194/egusphere-equ21-11408>
- [30] Ludt, W. B.; Rocha, L. A. Shifting seas: The impacts of Pleistocene sea-level fluctuations on the evolution of tropical marine taxa. *J. Biogeogr.* **2015**, *42*(1), 25-38. <https://doi.org/10.1111/jbi.12416>

# Monitoraggio delle sostanze perfluoroalchiliche (PFAS) nei molluschi bivalvi della costa Italiana: i risultati dei primi due anni (2023- 2024)

E. Lucidi<sup>1</sup>, T. Tavoloni<sup>1</sup>, A. Stramenga<sup>1</sup>, M. Ciriaci<sup>1</sup>, F. Griffoni<sup>1</sup>, F. Pardi<sup>1</sup>, P. Palombo<sup>1</sup>, F. Barchiesi<sup>2</sup>, A. Piersanti<sup>1</sup>

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

<sup>2</sup>) CRN 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)

**Keywords:** mussels, clams, PFASs, LC-MS/MS

## Introduzione

Le sostanze perfluoroalchiliche (PFAS) sono composti chimici di sintesi caratterizzati dalla presenza di forti legami carbonio-fluoro. Per la loro stabilità, resistenza alla degradazione ad alte temperature e repellenza a grassi ed oli sono stati ampiamente utilizzati nel settore industriale, specialmente per la produzione di materiali a contatto con gli alimenti. Per l'uomo, la principale via di esposizione a questi composti è rappresentata da cibo e bevande contaminate. Dal 2008, l'Autorità Europea per la Sicurezza Alimentare (EFSA) ha emanato una serie di pareri sul rischio associato al consumo di alimenti contaminati da PFAS e, nel 2020, ha stabilito un valore massimo di tolleranza settimanale di 4,4 ng/kg peso corporeo per la somma degli acidi perfluorooctano sulfonico, perfluorooctanoico, perfluoroesano sulfonico e perfluorononanoico (PFOS, PFOA, PFHxS e PFNA), i quattro composti considerati prioritari dal punto di vista tossicologico. A partire dal gennaio 2023, il Regolamento (UE) 915/2023 fissa limiti di legge in diverse matrici alimentari per questi quattro PFAS e la loro somma ( $\Sigma_4$ PFAS) e contestualmente la Raccomandazione (UE) 2022/1431 invita gli stati membri ad effettuare il monitoraggio anche di altri 18 PFAS a catena lineare, oltre che di PFAS emergenti. I prodotti della pesca sono gli alimenti che presentano i livelli di contaminazione più elevati, tra questi sono interessanti i molluschi bivalvi, organismi filtratori e sessili. Poiché l'Italia è il terzo produttore Europeo di molluschi e il settimo nel mondo [<https://ambiti-bivalvi-veneto.izsvenezie.it/molluschicoltura-veneto/>], con una produzione annua che sfiora le 150.000 tonnellate, il monitoraggio dei livelli di contaminazione risulta quanto mai importante ai fini della sicurezza alimentare. In questo studio, riportiamo i risultati ottenuti nell'ambito del Piano di controllo ufficiale (2023-2024) dei PFAS in vongole e mitili.

## Summary

Per- and polyfluorinated alkyl substances (PFASs) are a group of synthetic fluorinated organic compounds characterized by strong C-C and C-F bonds. The main route of exposition to these compounds for humans is diet and, in particular, fish and fishery products. Bivalve molluscs require particular attention, due to their peculiar bioaccumulation and biomagnification properties. Italy is molluscs' third producer in Europe and seventh in the world. European Regulation (EU) 915/2023 established maximum limits for four PFASs (PFOS, PFOA, PFNA, PFHxS) and their sum in some food matrices, but Recommendation 2022/1431 suggests the monitoring of other 18 PFASs and some emerging molecules. In this study, we present 2023-2024 data on PFASs levels in clams and mussels collected in the frame of Official Monitoring Plans.

## Materiali e metodi

Tra il 2023 e il 2024, l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche (IZSUM) ha analizzato 55 campioni di molluschi bivalvi, di cui 20 mitili (*Mytilus galloprovincialis*) e 35 vongole appartenenti a diverse specie: *Chamelea gallina* (n=25), *Tapes semidecussatus* (n=7), *Tapes philippinarum* (n=2) e *Paphia undulata* (n=1). Tali campioni sono stati raccolti in diverse regioni del Centro e Nord Italia, nell'ambito del Piano di controllo ufficiale dei contaminanti negli alimenti (Ministero della Salute) ed analizzati per la ricerca di 19 sostanze perfluoroalchiliche a catena lineare, secondo il metodo in spettrometria di massa riportato da Stecconi et. al, 2024. [1] Il Limite di Quantifica (LOQ) del metodo è pari a 0.010 µg/kg (0.20 µg/kg per PFBA). La contaminazione totale da PFAS è stata calcolata in modalità "lower bound" (i.b.: concentrazioni < LOQ = 0.0) sia come somma di tutti i 19 PFAS ( $\Sigma_{19}$ PFAS) analizzati che dei soli 4 composti attualmente normati ( $\Sigma_4$ PFAS).

## Risultati e discussione

Nelle vongole, la  $\Sigma_{19}$ PFAS oscilla fra 0,086 e 6,6 µg/kg (media: 0,71 µg/kg), mentre la  $\Sigma_4$ PFAS è compresa fra 0,049 e 6,2 µg/kg (media: 0,51 µg/kg) e sembra contribuire alla contaminazione totale stimata come  $\Sigma_{19}$ PFAS per circa il 72%. Delle 19 molecole analizzate, solo 6 (PFBA, PFPeS, PFHpS, PFNS, PFDS e PFDoS) non sono stati quantificati in nessuno dei campioni. I PFAS più abbondanti nelle vongole sono PFOA e PFOS-tot (L-PFOS + br-PFOS), con una media di 0,28 e 0,15 µg/kg, rispettivamente. Tutti i campioni sono risultati conformi ai limiti di legge, ad eccezione del campione di vongole cotte *P. undulata* ("Yellow clams"),

proveniente dall'Asia, in cui la concentrazione di PFOA è risultata 5,2 µg/kg e la Σ<sub>4</sub>PFAS 6,2 µg/kg (LM: PFOA 0,70 µg/kg; Σ<sub>4</sub>PFAS 5,0 µg/kg). Nel 2022, la Food and Drug Administration (FDA) ha rilevato livelli non trascurabili di PFAS in un altro campione di vongole cotte della stessa tipologia provenienti dalla Cina e nel luglio 2024, dalla Danimarca è stato notificato un campione di vongole cotte provenienti dal Vietnam per la presenza di PFOA.

Escludendo il campione di *P. undulata* dalla popolazione in esame, il contributo del PFOA alla contaminazione totale nelle vongole risulta paragonabile a quello del PFOS-tot (media PFOA: 0,14 µg/kg; PFOS-tot: 0,14 µg/kg). La concentrazione media degli altri due composti normati è di 0,052 µg/kg per PFNA e 0,010 per PFHxS, inoltre la presenza di acidi carbossilici a lunga catena (C9-C14) risulta non trascurabile (PFNA 10%, PFDA 9%, PFUnA 7%, PFDoA 4%, PFTrDA 6%, PFTeDA 6%). Tale pattern di contaminazione è indipendente dal genere (*Chamelea* vs *Tapes*), sebbene le vongole *Tapes* mostrino livelli di contaminazione più alti (Σ<sub>4</sub>PFAS media: 0,69 µg/kg) rispetto alle *Chamelea* (Σ<sub>4</sub>PFAS media: 0,38 µg/kg) ed in queste ultime il contributo del PFOA alla contaminazione totale sia più basso (19%) che nel genere *Tapes* (33%), a favore di una maggiore presenza di acidi carbossilici a lunga catena. A livello di specie, le vongole *Tapes decussatus* mostrano un pattern leggermente diverso dalle *Chamelea gallina* e *Tapes Philippinarum*, con una concentrazione più bassa di acidi C11-C14 e un contributo maggiore dei sulfonati PFBS e PFHxS. La presenza di br-PFOS si evidenzia solo nei campioni con concentrazioni più elevate di PFOS con una concentrazione media di 0,012 µg/kg, circa l'8% del PFOS totale.

In letteratura non sono riportati molti dati in merito alla presenza di sostanze perfluoroalchiliche nelle vongole del Mediterraneo. Uno studio condotto nel 2022 [2] ha indagato la presenza di 21 PFAS (tradizionali ed emergenti) in prodotti ittici campionati sulle coste della Tunisia, tra cui 60 campioni di vongole della specie *Ruditapes decussatus*. Le molecole più riscontrate sono state PFOS, PFTrDA e PFTeDA che contribuiscono rispettivamente per il 34%, 19% e 13% alla contaminazione totale come somma di 8 principali PFAS. Il PFOA non è molto presente, diversamente da quanto accade nei campioni oggetto del presente studio.

Per quel che riguarda i mitili, la Σ<sub>19</sub>PFAS è compresa tra 0,094 e 0,46 µg/kg (media = 0,29 µg/kg), mentre la Σ<sub>4</sub>PFAS normati oscilla fra 0,012 e 0,22 µg/kg (media = 0,10 µg/kg). Il livello medio di PFAS riscontrato nelle vongole raccolte sulle coste italiane (0,14 µg/kg) sembra dunque più basso di quello ritrovato nei mitili. Tutti i campioni analizzati sono risultati ampiamente al di sotto dei limiti definiti dal Reg. 915/2023 per i molluschi bivalvi (valori medi = PFOA 0,016 µg/kg; PFNA 0,013 µg/kg; PFHxS 0,001 µg/kg; PFOS-tot 0,075 µg/kg).

In contrasto con quanto riportato nelle vongole, tuttavia, nei campioni di mitili analizzati la Σ<sub>4</sub>PFAS normati rappresenta solo il 36% circa della contaminazione totale in quanto un contributo importante alla contaminazione è dato dagli acidi carbossilici a lunga catena (C11-C14). Il PFTrDA ha una concentrazione media (0,072 µg/kg, 24% dei PFAS tot) paragonabile a quella di PFOS-tot (0,075 µg/kg, 26% dei PFAS tot). PFTeDA, PFUnA e PFDoA mostrano concentrazioni medie confrontabili (0,033, 0,031 e 0,034 µg/kg) e il loro contributo è all'incirca dell'11% ciascuno. Il contributo di PFAS C8-C10 è minore, con una concentrazione di PFDA (media = 0,019 µg/kg) paragonabile a quelle del PFOA e PFNA.

I nostri risultati sono confermati da quanto riportato da Munsch et al. (2019) [3] in *Mithylus galloprovincialis* provenienti dalla costa francese, che evidenzia una presenza diffusa di PFOS e acidi carbossilici a lunga catena come nei mitili italiani. Inoltre, la concentrazione di composti acidi come PFTrDA e PFTeDA, espressa come somma, è superiore a quella di PFOS in tutti i campioni. Il contributo totale del PFOS nello studio francese è di circa il 31%.

Anche Marin-Garcia et al. 2023 [4] riporta in *M. galloprovincialis* spagnoli elevate concentrazioni di acidi carbossilici a lunga catena. L'analita prevalente in questo caso è il PFTeDA (53% della contaminazione totale), seguito da PFTrDA (19%), mentre PFOS e PFOA sono <LOQ. Importante è risultato anche il contributo del PFBS (14%), mai quantificato nei nostri campioni.

Pochi sono i dati disponibili in letteratura, sicuramente quelli riportati in questo lavoro possono contribuire a comprendere meglio livelli e pattern di contaminazione sebbene la popolazione studiata, anche nel nostro caso, sia piuttosto esigua. È auspicabile raccogliere più dati per costruire un quadro esaustivo.

## Bibliografia

[1] Stecconi T. et al. (2024) A LC-MS/MS procedure for the analysis of 19 perfluoroalkyl substances in food fulfilling recent EU regulations requests. *Talanta*, 266:125054.

[2] Barhoumi B. et al. (2022) Survey of legacy and emerging per- and polyfluorinated alkyl substances in Mediterranean seafood from a North African ecosystem. *Environmental Pollution*, 262:118398.

[3] Munsch C. et al. (2019) Perfluoroalkyl substances (PFASs) in the marine environment: Spatial distribution and temporal profile shifts in shellfish from French coasts. *Chemosphere*, 228:640-648.

[4] Marin-Garcia M. et al. (2023) Accumulation and dietary risks of perfluoroalkyl substances in fish and shellfish: A market-based study in Barcelona. *Environmental research*, 237:117009.



# Le microplastiche in vongole e fasolari commercializzati in Sardegna

G. Muresu Ibba<sup>1</sup>, E. Zanardi<sup>2</sup>, F. Sardu<sup>3</sup>, A. Poeta<sup>1</sup>

<sup>1</sup>) Ausl Reggio Emilia - SSPV -Dipartimento Igiene Alimenti Origine Animale

<sup>2</sup>) Università degli studi di Parma- Dipartimento Scienze Medico Veterinarie

<sup>3</sup>) ATS Sardegna – ASL Oristano

**Keywords:** *Microplastics, Sardinian, food*

## Introduzione

Il problema della “materia plastica” o detriti in ambiente marino oggi riveste sia in campo sociale, economico, etico ma soprattutto scientifico un interesse globale.

Con il termine plastica viene spesso definita tutta la varietà di polimeri artificiali, ricavati dal petrolio, la cui produzione ha raggiunto valori nel mondo ed in Italia.

Di questa, si stima che circa 30 milioni di tonnellate siano entrate in mare nel 2021.

Attualmente la grande quantità di materiale plastico nota come microplastiche, frammenti con lunghezza < 5mm differenti per eterogeneità polimerica, forma, colore, densità, composizione costituisce il tema dominante per la sostenibilità dell'ambiente marino, la salvaguardia dei mari, laghi e grandi fiumi dove insistono insediamenti urbani e allevamento o raccolta di organismi marini accumulatori.

## Summary

Following a request, in 2016 the European Food Safety Authority (EFSA) panel for contaminants in the food chain provided a statement on the presence of microplastics and nanoplastics in food, in particular focus on seafood. As a matter of fact, this problem involves not only the marine compartment but also the rivers and lakes, where often cities and industries are nearby, as well as the environment in general.

According to the definition provided by EFSA, microplastics and nanoplastics differ in terms of size: plastics in the range from 0.1 to 5000  $\mu\text{m}$  are considered microplastics while from 0.001–0.1  $\mu\text{m}$  are referred to as nanoplastics. Primary microplastics are plastics originally manufactured to be that size, while secondary microplastics originate from fragmentation. Nanoplastics can originate from engineered material or can be produced during fragmentation of microplastic debris.

There are not maximum limits for the content of microplastics and nanoplastics as contaminants in food established by legislation.

Several methods are available for identification and quantification of microplastics and nanoplastics as contaminants in food, including seafood, although some of them are not validated.

In the present study, 111 samples from different Sardinian cities were examined for the presence of microplastics. Following a proper analytical procedure, samples were digested, filtered and the filters were observed by using a stereo-microscope. Almost the 34% of samples were contaminated with microplastic; most of them were plastic fibers.

The results of this study are important, both for the control of the level of the sea contamination (mussels are, in fact, mostly used as bio-indicator), and for the possible effect on the public health.

Occurrence data of microplastics and nanoplastics in food are still insufficient and should be generated in the future by using harmonised and validated analytical methods which can provide comparable results. Furthermore, research on toxicity is needed as is research on the degradation of microplastics and potential formation of nanoplastics in the human gastrointestinal tract.

## Materiali e metodi

Sono stati prelevati 111 campioni presso le piattaforme ittiche che erogano i servizi di approvvigionamento alle maggiori catene della grande distribuzione organizzata (GDO) della Sardegna, nei punti di vendita al dettaglio della Provincia di Oristano e nella sala aste del Mercato Ittico all'ingrosso più influente e rinomato del capoluogo cagliaritano.

Per poter garantire maggiore omogeneità nella distribuzione e tipologia dei campioni, si è proceduto al prelievo di campioni con guscio (97 campioni) e campioni congelati in confezioni in ATM sgusciati (14 campioni).

Tutti provenivano dall'area del Mar Mediterraneo, in particolare del Mar di Sardegna, zona FAO 37.1.3 e precisamente dalle tre aree precedentemente identificate e censite come la zona di raccolta dall'Autorità competente locale, nella figura dei servizi veterinari Area Igiene Alimenti di Origine Animale dell'ATS Sardegna Oristano, e precisamente, Zona Stagno di Marceddi (OR), Zona Stagno di Santa Gilla (CA), Zona stagno di Sant'Antioco (SU).

I campioni venivano conferiti e trasportati presso il laboratorio accreditato ACCREDIA secondo la norma UNI CEI EN ISO/IEC 17025 per le singole prove ai sensi della norma UNI CEI EN ISO/IEC 17011 dell'ATS Sardegna tramite delibera della giunta regionale n. 727/15247 del 15/07/2019 successivo alla determina n.870 del 08/09/2011 nel territorio Medio Campidano (MC) per essere sottoposti ad indagine.

Da ciascun campione, veniva effettuato il prelievo di polpa e liquido inter-valvare laddove presente, raggiungendo una porzione di peso tra i 6 e gli 8 grammi.

Tali porzioni venivano sottoposte a processo di sminuzzamento utilizzando pinze, forbici e bisturi opportunamente sterilizzate e riposti in beute da 250 ml a cui veniva aggiunta una quantità di 50 ml di acqua ossigenata ad una concentrazione al 30% affinché si ottenesse una digestione ottimale dei tessuti organici.

Le beute osservavano un periodo di decantazione o riposo per 36 -48 ore circa fino alla completa digestione e successivamente poste in un agitatore a temperatura controllata di 65°C e 80 RPM [6]. Nel contempo si procedeva alla preparazione di una soluzione salina concentrata sovra-satura di 1-2 g/ml utilizzando acqua distillata sottoposta precedentemente a processo di filtrazione.

Per garantire l'eliminazione di qualsiasi tipo di impurità derivante da soluzione salina, la stessa veniva ulteriormente filtrata con filtri di WATMAN AE98 con dimensione dei pori pari a 5 mm e diametro di 90 mm.

Concluso il processo di digestione, ad ogni beuta contenente il campione, veniva mescolato una soluzione soprassatura di 200 ml e versato il tutto in imbuto separatori lasciati riposare durante le ore notturne per essere sottoposte l'indomani a riesame.

In questo modo il processo di flottazione permetteva di far salire in superficie le microplastiche.

Il surnatante ottenuto veniva ulteriormente filtrato con filtri di WATMAN AE98 con dimensioni dei pori di 5 mm e diametro di 90 mm utilizzando una pompa da vuoto.

L'utilizzo delle Piastre di Petri consentiva ai filtri ottenuti di essere adagiati sulle stesse per essere ricoperti e lasciati asciugare per qualche ora.

Successivamente i filtri venivano osservati allo stereo-microscopio LEICA M205C al fine di evidenziare la presenza di corpi estranei plastici (CEP).

Su ogni filtro avveniva una osservazione visiva al fine di appurare il numero di frammenti rinvenuti.

## Risultati e discussione

Considerati i 111 campioni di MBV della Famiglia Veneridae presi in esame, ben 38 Campioni (34 %) presentavano CEP

Nei campioni positivi sono state ritrovate sia fibre che frammenti ed in particolare i frammenti erano presenti in numero maggiore (un totale di 256 pari a circa il 76% dei CEP) rispetto alle fibre (un totale di 80 pari a circa il 24% dei CEP).

Sono stati rilevati un totale di 336 CEP, il cui numero nei campioni positivi variava da un minimo di 1 ad un massimo di 10, con una concentrazione generale di 0,14 CEP/g<sub>MBV</sub>.

Per quanto riguarda il colore, circa il 25% era di colore nero/grigio, circa il 14% blu, circa il 10% marrone, circa il 5% rosso, circa il 25% trasparenti, circa il 16% bianchi e circa il 5% gialli.

Rispetto al peso totale dei campioni analizzati, è stato rilevato una concentrazione di fibre di 0,03 fibre/g<sub>MBV</sub> e una concentrazione di frammenti di 0,14 frammenti/g<sub>MBV</sub>.

La determinazione del colore è di fondamentale importanza in quanto consentirebbe di risalire all'origine delle particelle [5] oltre che ricoprire un ruolo chiave nell'impatto sugli ecosistemi marini.

A tal proposito, recenti studi [1] hanno confermato che le plastiche di colore chiaro e traslucide sono più comunemente ingerite a causa della somiglianza con plancton o con il krill.

Analizzando i risultati in base alle specie testate nel presente studio, *R. philippinarum* presentava un numero maggiore di CEP (222, di cui 181 frammenti e 41 fibre), seguita da *R. decussatus* (62 CEP di cui 42 frammenti e 20 fibre) e *C. chione* (52 CEP di cui 33 frammenti 19 fibre).

Per quanto riguarda la concentrazione di CEP per ciascuna specie, in *R. philippinarum* era di 0,28 CEP/g<sub>MBV</sub>, *R. decussatus* era di 0,08 CEP/g<sub>MBV</sub> mentre in *C. chione* era di 0,07 CEP/g<sub>MBV</sub>.

Analizzando i risultati ottenuti in funzione della provenienza, si è osservato un numero maggiore di CEP e fibre nelle specie appartenenti alla Famiglia Veneridae antistanti lo stagno di Santa Gilla (CA) dove insistono diversi insediamenti industriali e aree urbane, seguiti in ordine decrescente dallo stagno di Marceddi (OR) e da quello di Corru Mannu (OR).

Per quanto riguarda le dimensioni, circa 45% delle particelle aveva un range di dimensioni tra 0,3-0,2 mm, circa il 23% tra 0,5-0,3mm, circa il 12% tra 0,7-0,5 mm e circa il 20% tra 2,8-1 mm.

La presenza di particelle di piccole dimensioni (0,3 - 0,2 mm) in una percentuale maggiore rispetto a particelle di dimensioni maggiori desta preoccupazione in quanto indica una sempre più attiva degradazione della plastica in particelle sempre più piccole a partire da oggetti più grandi tramite processi fotochimici, meccanici e biologici.

Tale presenza è derivata dalla scomposizione di prodotti di origine plastica provenienti da attività di pesca o marittime, ma anche da ricondurre a scarichi fognari urbani come nel caso delle fibre con relativo rilascio dopo lavaggio di tessuti.

La presenza di particelle piccole sta ad indicare come la diminuzione in termini di dimensioni nella superficie del mare probabilmente possa essere il risultato della degradazione meccanica e fotochimica in mare.

Le dimensioni ridotte costituiscono un potenziale rischio per le specie che vivono in ambiente pelagico e soprattutto bentonico.



Attualmente non è stato possibile suddividere le unità campionarie per presenza o assenza di guscio nonostante i MBV fossero tutti vitali al momento del campionamento e in condizioni ottimali di temperatura e trasporto per motivi legati alla tempistica e alle risorse di laboratorio.

In riferimento all'indagine condotta i risultati ottenuti con il presente studio dimostrano la costante presenza di inquinamento da Corpi Estranei Plastici (CEP), costituiti da filamenti plastici e microplastiche, in tutte le coste del Mar di Sardegna come per le acque interne del territorio. [7]

Ciò implica che i molluschi bivalvi vivi destinati al consumo umano e allevati o raccolti nelle acque isolate sono fonte rilevante di microplastiche.

I numeri di CEP per grammo di prodotto esaminato da 0,07 a 1,04 risultano inferiori rispetto a quanto riportato da EFSA [3] che descrive valori oscillanti tra 0,9 e 4,5 CEP/g in MBV allevati nelle coste dell'Atlantico.

Questo risultato è probabilmente legato al fatto che le coste eterogenee dell'Atlantico sono soggette a zone di accumulo, essendo densamente popolate e ricche di insediamenti urbani e industriali.

È importante sottolineare il ruolo dei MBV della Famiglia Veneridae come importante veicolo di microplastiche così come evidenziato dal rapporto EFSA [3] che riferisce del peggioramento delle condizioni dei mari interni al Mar Mediterraneo come zona "hot spot" di materiale plastico.

Al fine di poter valutare al meglio l'impatto delle microplastiche veicolate dai Veneridi sulla salute pubblica e le correlazioni con batteri, virus e parassiti nei vari sistemi biologici, assume importanza rilevante la caratterizzazione per tipologia, colore e taglia dei detriti, utile a evidenziare le implicazioni future nei processi di degradazione e i tempi di permanenza nelle acque. Ulteriore fattore che merita di essere approfondito è la determinazione degli agenti inquinanti tossici che potrebbero essere veicolati mediante l'ingestione di microplastiche all'interno dei tessuti degli organismi filtratori, quali policlorobifenili (PCB), idrocarburi policiclici aromatici (IPA) e bisfenolo A (BPA), che costituiscono una fonte di preoccupazione. Anche l'andamento delle maree, correlato all'inerzia dei venti, potrebbe costituire un elemento interessante da poter verificare con indici da valutare.

A fronte di quanto riportato nel rapporto EFSA [2] in relazione ai Mitili, secondo il quale, la porzione media di consumo di cozze di circa 225 g. potrebbe contenere fino a 7 mg di microplastiche, non è da escludere che anche la contaminazione nei Veneridae possa contribuire in modo sostanziale all'ingestione da parte dell'uomo di microplastiche, oltre che agli inquinanti ad esse associate.

Oltre che un problema socio-ambientale, l'inquinamento da CEP rappresenta un problema di sicurezza alimentare su cui il legislatore deve porre l'attenzione alla luce della revisione dei regolamenti comunitari.

Attualmente non esiste un riferimento legislativo su cui normare la presenza di microplastiche presenti in alimenti destinati al consumo umano, se non il Reg. 178/02 [4] che stabilisce che "alimenti destinati a tale consumo non debbano contenere corpi estranei".

Oltre ai monitoraggi delle microplastiche negli alimenti destinati al consumo umano, è indispensabile assicurare l'implementazione di protocolli standard internazionali per la corretta identificazione dei polimeri plastici al fine di poter produrre dati utili alla valutazione del rischio igienico-sanitario legato all'assunzione di tali sostanze e dei possibili contaminanti residuali ad essi associati.

## Bibliografia

[1] Bugoni L, (2002). *Marine Debris and Human Impacts on Sea Turtles in Southern Brazil. Marine Pollution Bulletin* 42.

[2] EFSA (2016). *Presence of microplastic and nanoplastics in food, with particular focus on seafood.*

[3] EFSA (2020). *Presence of microplastic and nanoplastics in food, with particular focus on seafood.*

[4] UE Reg.178/2002. *Stabilisce i principi e requisiti generali della legislazione alimentare, istituisce l'autorità europea per la sicurezza alimentare e fissa procedure nel campo della sicurezza alimentare.*

[5] Galgani, F., Giorgetti, A., Vinci, M., Le Moigne, M., Moncoiffe, G., Brosich, A., Molina, E., Lipizer, M., Holdsworth, N., Schlitzer, R., Hanke, G., & Schaap, D. (2017). *Proposal for gathering and managing data sets on marine micro-litter on a European scale.*

[6] Li J, Yang D, Li L, (2015). *Microplastics in commercial bivalves from China, Environmental Pollution*, 207.

[7] G. Lorenzoni, A.G. Mudadu, L. Corda, G. Piras, R. Melillo, S. Salza, S. Cau, K. Usai, T. Tedde, B. Vodret, S. Virgilio, D. Meloni, (2022). *Studio preliminare sull'identificazione e quantificazione di microplastiche in molluschi bivalvi allevati in Sardegna.*

# La selezione genetica come strumento per migliorare la resilienza della molluschicoltura Europea contro gli effetti del cambiamento climatico: il progetto ShellFishBoost.

*L. Peruzza<sup>1</sup>, M. Milan<sup>1</sup>, consorzio ShellFishBoost, L. Bargelloni<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>Dipartimento di Biomedicina Comparata ed Alimentazione, Università degli Studi di Padova, Viale dell'Università 16, 35020 Legnaro, Italia.

**Keywords:** Selezione genetica, SNP chip, heritability, climate extreme events

## Introduzione:

In un mondo la cui popolazione è in costante aumento, la molluschicoltura è un settore sempre più importante della bioeconomia blu in quanto è un'attività a relativamente basso impatto ambientale capace di produrre alimenti ricchi di elementi importanti quali gli omega-3. Tuttavia è minacciata dagli effetti diretti e indiretti dei cambiamenti climatici: in particolare, entro il 2090, le aree adatte all'acquacoltura di bivalvi diminuiranno globalmente del 10% a causa dei cambiamenti climatici. Tuttavia la minaccia non deriva solo dalle variazioni medie delle condizioni fisico-chimiche, ma anche da eventi estremi come ondate di calore o siccità estreme e, indirettamente, dall'aumento della prevalenza di patogeni.

## Summary:

Bivalve aquaculture is an increasingly important sector of global blue bioeconomy however is threatened by direct and indirect effects of climate change, in particular extreme events like Marine Heatwaves.

In this context, the EU-funded ShellFishBoost project (funded via the SBEP scheme, Sustainable Blue Bioeconomy Partnership) aims at protecting and developing the blue bioeconomic sector of bivalve aquaculture by addressing key climate-related problems for the main species of bivalves farmed in EU to improve their resilience through targeted interventions:

1. The development of advanced tools for genetic selection (e.g. optimized breeding schemes);
2. The estimate of genetic parameters for key traits of interest (e.g. growth, disease resistance, resistance to heatwave).
3. Co-creating with key stakeholders best practices for selective breeding in bivalves

The ShellFishBoost partnership involves 11 different institutions between research and industry partners from 5 different Countries.

## Obiettivi e ambiti del progetto:

Il progetto Europeo ShellFishBoost, finanziato all'interno del programma SBEP (Sustainable Blue Bioeconomy Partnership) e coordinato dal Dipartimento di Biomedicina Comparata ed Alimentazione dell'Università di Padova, coinvolge 11 tra centri di ricerca e produttori da 5 paesi dell'Unione Europea e mira a proteggere e sviluppare il settore della bioeconomia blu legato all'acquacoltura di bivalvi. Il consorzio si propone di affrontare i principali problemi legati al cambiamento climatico che interessano le principali specie di bivalvi allevate nell'UE, al fine di migliorare la loro resilienza attraverso interventi mirati. In particolare ShellFishBoost mira a:

1. Sviluppare strumenti avanzati per la selezione genetica (ad esempio, schemi di allevamento ottimizzati);
2. Stimare i parametri genetici per i tratti chiave di interesse (ad esempio, crescita, resistenza alle malattie, resistenza alle ondate di calore);
3. Definire le migliori pratiche per la selezione genetica in queste specie di bivalvi tramite la co-creazione con i principali stakeholder del settore.

In questo contesto, SFB intende collaborare strettamente con i vari attori del settore, inclusi allevatori, ricercatori e politici, per sviluppare strategie che possano mitigare gli effetti negativi dei cambiamenti climatici sull'acquacoltura di bivalvi. Questo approccio integrato mira non solo a proteggere le attuali aree di produzione, ma anche a identificare nuove zone potenzialmente adatte all'acquacoltura, tenendo conto delle proiezioni climatiche future.

# La determinazione dell'Arsenico totale nei molluschi bivalvi allevati a sud della foce del Po (Mare Adriatico)

S. Rubini<sup>1</sup>, D. Accurso<sup>2</sup>, G. Minkoumba Sonfack<sup>2</sup>, M. Munari<sup>1</sup>, G. Dell'Orfano<sup>3</sup>, P. Rizzi<sup>3</sup>, E. Baldini<sup>4</sup>, S. Manfredini<sup>4</sup>, S. Vertuani<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna – Ferrara (FE)

<sup>2</sup> Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna – Reparto chimico di Bologna (BO)

<sup>3</sup> Azienda USL Ferrara – U.O.C. Igiene Alimenti di Origine Animale (FE)

<sup>4</sup> Dipartimento di Scienze della vita e biotecnologie – Sezione di farmaco e prodotti della salute – Università degli Studi di Ferrara (FE)

**Keywords:** arsenico, molluschi bivalvi, Mare Adriatico

## Introduzione

L'area marina situata a nord e a sud del delta del Po è la principale zona di produzione di molluschi bivalvi in Italia e la terza in Europa [1]. La regione Emilia-Romagna è la maggior produttrice di molluschi in Italia [2, 3]. Le specie di maggior interesse economico nella zona a sud del delta del Po sono il mitilo (*Mytilus galloprovincialis*) e la vongola verace (*Ruditapes philippinarum*). L'allevamento delle ostriche è in crescita, ma la produzione è ancora limitata. Un'altra specie raccolta in questa zona è la vongola comune o lupino (*Chamelea gallina*), con una produzione relativamente modesta.

L'arsenico (As) è un metalloide diffuso nei terreni, nei sedimenti e nelle acque. In natura, l'As può presentarsi sia in forma organica che inorganica; la forma inorganica è la più tossica quando si trova negli alimenti [4]. La quantità totale di As nella litosfera è stimata a circa  $4,01 \times 10^{16}$  kg. Le attività vulcaniche sulle terre emerse rilasciano ogni anno circa  $1,7 \times 10^7$  kg di As, mentre le attività vulcaniche sottomarine contribuiscono all'accumulo con ulteriori  $4,87 \times 10^6$  kg [5]. L'As inorganico è cancerogeno e genotossico, con effetti epigenetici aggiuntivi. La dose letale acuta per l'uomo varia tra 1 e 5 mg/kg di peso corporeo, mentre esposizioni croniche o subletali possono coinvolgere vari organi, causando danni cutanei e tumori a polmone e vescica [4].

Il Regolamento (UE) 2023/915 stabilisce tenori massimi consentiti per l'As inorganico solo per alcuni prodotti alimentari; tra questi non sono presenti i molluschi. Il fiume Po, attraversando la Pianura Padana, raccoglie vari contaminanti industriali e agricoli tra cui anche l'As e li trasporta fino al Mare Adriatico.

Lo scopo di questo lavoro è fornire informazioni sulla presenza di As nei molluschi bivalvi allevati nelle acque a sud della foce del Po in Emilia-Romagna.

## Summary

This study examined the presence of total arsenic in bivalve molluscs farmed south of the Po River mouth in Emilia-Romagna from 2019 to 2023. Analyses showed that arsenic concentrations varied significantly between sampling areas, with the highest concentrations found in veracious clams and mussels. The origin of arsenic could be either anthropogenic or natural. The concentrations found do not represent a significant concern for human health, but further studies could help clarify the sources of contamination and establish safe limits for shellfish.

## Materiali e Metodi

Tra il 2019 e il 2023 sono stati esaminati 180 campioni di molluschi bivalvi per la determinazione dell'As totale. L'area di studio si estendeva dal delta del Po alla foce del Reno ed era suddivisa in cinque macroaree: Long-line (produzione di mitili e ostriche), B-In (raccolta di vongole veraci nei canali interni), B-Out (vicino alla costa), Sacca (Sacca di Goro, produzione di vongole veraci) e Lupini (raccolta della vongola comune). L'analisi è stata condotta utilizzando la spettrometria di massa a plasma accoppiato induttivamente (ICP/MS) dopo mineralizzazione dei campioni con acido nitrico.

La **Tabella 2** riporta le concentrazioni di As totale rilevate nei diversi campioni di molluschi raccolti nelle cinque macroaree studiate. Le concentrazioni più elevate sono state rilevate nelle vongole veraci della macroarea B-In (2,6 mg/kg) e nei mitili della zona Long-line (2,4 mg/kg). Al contrario, le concentrazioni più basse sono state osservate nelle vongole veraci raccolte nella Sacca di Goro.

Questi risultati suggeriscono alcune ipotesi preliminari riguardo alla distribuzione dell'As nelle diverse macroaree. Le elevate concentrazioni di As totale riscontrate nelle zone B-In e Long-line potrebbero essere dovute ad una combinazione di fattori antropogenici e naturali. L'area B-In, situata vicino alla costa e con canali interni, è più esposta a fonti di contaminazione antropogenica come attività agricole e industriali. Questo potrebbe spiegare le concentrazioni relativamente alte di As rilevate in quest'area. Inoltre, l'area Long-line, situata più lontano dalla costa, potrebbe essere più interessata rispetto alle altre zone dall'azione di dilavamento naturale del bacino del Po e dal trasporto di prodotti di erosione delle rocce alpine e prealpine.

Un ulteriore aspetto da considerare è la possibilità che entrambi i meccanismi di contaminazione siano contemporaneamente presenti. Questa ipotesi combinata trova supporto nella letteratura esistente, che

evidenza come le zone costiere possano subire sia l'impatto delle attività umane sia l'apporto di contaminanti naturali trasportati dai fiumi [5].

Dal punto di vista della sicurezza alimentare, è importante notare che l'As totale comprende sia la forma organica, generalmente considerata meno tossica, sia quella inorganica, più pericolosa per la salute umana. Studi precedenti suggeriscono che l'As inorganico può costituire fino al 42% dell'As totale presente nei molluschi [8, 10]. Sulla base di questa proporzione, le concentrazioni di As inorganico nei campioni esaminati risultano essere al di sotto dei livelli che possono destare preoccupazione per la salute pubblica. Tuttavia, l'assenza di limiti massimi per l'As inorganico nei molluschi nel Regolamento (UE) 2023/915 pone la necessità di intraprendere ulteriori ricerche al fine di integrare la normativa vigente per garantire la sicurezza nel consumo di questi prodotti.

**Conclusioni preliminari** possono essere tratte dall'analisi dei dati disponibili, sebbene debbano essere confermati da una raccolta di dati più ampia. È infatti raccomandabile condurre ulteriori studi per comprendere meglio le dinamiche di contaminazione dell'As nell'area di studio e per determinare se la presenza di As nei molluschi sia dovuta maggiormente a fonti naturali o antropogeniche.

Infine, la crescente letteratura scientifica sulla speciazione dell'As negli alimenti supporta l'importanza di continuare a monitorare e valutare la presenza di questo metalloide nei prodotti marini, con l'obiettivo di proteggere la salute dei consumatori e promuovere pratiche commerciali sicure e sostenibili [4].

## 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](https://www.fao.org/fishery/static/Yearbook/YB2019_USBcard/navigation/index_content_aquaculture_e.htm#C).
- [2] E. Franzago, M. Toson, G. Binato, A. Gallina, M. Corazza, G. Fornasiero, et al. Valutazione dei risultati del monitoraggio igienico sanitario per la ricerca di metalli pesanti in molluschi bivalvi prodotti in Veneto dal 2014 al 2022. Atti del X Convegno Nazionale SIRAM 2023. Available at: <https://siram-molluschi.it/documenti/atti-convegni/atti-convegno-SIRAM-2023.pdf>.
- [3] Ispra (2019). Report on companies in aquaculture and production in Italy. Available at: [https://annuario.isprambiente.it/sys\\_ind/381](https://annuario.isprambiente.it/sys_ind/381).
- [4] EFSA CONTAM Panel (EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain), Schrenk, D., Bignami, M., Bodin, L., Chipman, J. K., del Mazo, J., Grasl-Kraupp, et al. (2024). Update of the risk assessment of inorganic arsenic in food. *EFSA Journal*, 22(1), e8488...
- [5] Matschullat, Jörg. "Arsenic in the geosphere—a review." *Science of the Total Environment* 249.1-3 (2000): 297-312.
- [6] Molin, Marianne, et al. "Arsenic in the human food chain, biotransformation and toxicology—Review focusing on seafood arsenic." *Journal of trace elements in medicine and biology* 31 (2015): 249-259.
- [7] INAIL. 2010. Arsenico: contaminazione ed esposizione ambientale. Quaderno informative ISPESL 86 pp.
- [8] Orletti R, Carloni C, Griffoni F, Palombo P, Velieri F, Rasmussen RR, Sloth JJ. (2015). Arsenico totale e inorganico nei mitili italiani. In Aureli F, D'Amato M, Raggi A, Barea Toscan MC, Cubadda F (Ed.). Convegno Nazionale. Arsenico nelle catene alimentari. Roma, 4-5 giugno 2015. Riassunti. Roma: Istituto Superiore di Sanità, 2015 (ISTISAN Congressi 15/C 3).
- [9] He, Y., Liu, J., Duan, Y., Yuan, X., Ma, L., Dhar, R., & Zheng, Y. (2023). A critical review of on-site inorganic arsenic screening methods. *Journal of Environmental Sciences*, 125, 453-469.
- [10] Cubadda, F., D'Amato, M., Aureli, F., Raggi, A., & Mantovani, A. (2016). Dietary exposure of the Italian population to inorganic arsenic: The 2012–2014 Total Diet Study. *Food and chemical toxicology*, 98, 148-158.

**Tabella 1 Campioni esaminati dal 2019 al 2023**

Anno	Mitili	Ostriche	Vongole veraci	Vongole comuni	Totale
2019	2	1	9	3	15
2020	6	1	28	1	36
2021	8	1	31	6	46
2022	12		28	5	45
2023	12		24	2	38
	<b>39</b>	<b>3</b>	<b>120</b>	<b>17</b>	<b>180</b>

**Tabella 2 Concentrazione di As totale rilevata nelle 5 macroaree**

Macroarea	Specie	Concentrazione di As totale (mg/Kg)	Deviazione standard
Sacca	Vongole veraci	1,9	0,57
B-In	Vongole veraci	2,6	1,19
B-Out	Vongole veraci	2,1	0,60
Lupini	Vongole comuni	2,0	0,84
Long-line	Mitili	2,4	0,73

# ***Pinna nobilis*: Storia Evolutiva e Nuove Evidenze Genetiche per una Specie in Pericolo di Estinzione**

D. Sanna<sup>1</sup>, I. Azzena<sup>2</sup>, C. Locci<sup>1,2</sup>, N. Pascale<sup>3</sup>, A. Ciccozzi<sup>1</sup>, P. Ankon<sup>4</sup>, P. Kružić<sup>4</sup>, C. Manfrin<sup>5</sup>, A. Pallavicini<sup>5</sup>, S. Ciriaco<sup>6,7</sup>, M. Segarich<sup>7</sup>, E. Batistini<sup>7</sup>, F. Scarpa<sup>1</sup>, Marco Casu<sup>2</sup>

<sup>1</sup>) Dipartimento di Scienze Biomediche, Università degli Studi di Sassari, Viale San Pietro 43b, 07100 Sassari, Italia;

<sup>2</sup>) Dipartimento di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Sassari, Via Vienna 2, 07100 Sassari, Italia;

<sup>3</sup>) Dipartimento di Scienze Chimiche, Fisiche, Matematiche, e Naturali, Università di Sassari, Via Vienna 2, 07100 Sassari, Italia;

<sup>4</sup>) Dipartimento di Biologia, Facoltà di Scienze, Università di Zagreb, Horvatovac 102a, 10000 Zagreb, Croazia;

<sup>5</sup>) Dipartimento di Scienze della Vita, Università di Trieste, Via L. Giorgieri 5, 34127 Trieste, Italia;

<sup>6</sup>) WWF AMP Miramare, Via Beirut 2/4, 34151 Trieste, Italia;

<sup>7</sup>) Shoreline Soc. Coop., AREA Science Park, Padriciano 99, 34149 Trieste, Italia.

**Keywords:** nacchera, mtDNA, COI, evoluzione, genetica di popolazione.

## **Introduzione**

*Pinna nobilis* Linnaeus, 1758, comunemente conosciuta come nacchera, è un grande bivalve marino endemico del Mar Mediterraneo [1]. Questa specie è presente nel Mediterraneo sin dall'era Miocenica [2] e si trova principalmente in sedimenti sabbiosi costieri e nei prati di *Posidonia oceanica*, dove si ancora al substrato grazie ai filamenti di bisso [3]. Storicamente, *Pinna nobilis* è stata sfruttata per il suo bisso, in particolare nel sud Italia e in Sardegna, per la produzione di tessuti pregiati [4]. Tuttavia, le attività umane, come l'ancoraggio delle imbarcazioni, l'inquinamento e la frammentazione dell'habitat, hanno causato un significativo declino delle sue popolazioni dalla fine degli anni '80 [5,6].

In risposta a questo declino, *Pinna nobilis* è stata posta sotto protezione integrale ai sensi della Direttiva Habitat dell'UE e della Convenzione di Barcellona, con l'obiettivo di conservare e ripristinare le sue popolazioni. Questi sforzi hanno portato a una ripresa delle popolazioni fino al 2016, quando un grave evento di mortalità di massa (MME) ha colpito la specie in tutto il Mediterraneo [7]. Le indagini iniziali hanno identificato *Haplosporidium pinnae* come il principale agente eziologico coinvolto [8], ma studi successivi hanno indicato che la malattia è probabilmente multifattoriale, coinvolgendo anche diverse specie batteriche e virus [9-12].

Attualmente, le popolazioni di *Pinna nobilis* sopravvissute si trovano principalmente in estuari e lagune costiere isolate, con segnalazioni di popolazioni superstiti in Spagna, Italia, Corsica, Tunisia e Turchia [13-17].

Il nostro studio ha esaminato un ampio dataset di sequenze mitocondriali (Subunità I del gene Citocromo c Ossidasi – COI) raccolte prima degli eventi di mortalità di massa, al fine di ricostruire la storia evolutiva di *Pinna nobilis*. Esaminando campioni provenienti da aree non ancora colpite dall'MME, puntiamo a ottenere una visione approfondita delle dinamiche di dispersione e del potenziale di sopravvivenza della specie e a guidare gli sforzi di conservazione per sostenere il suo recupero e la sua sopravvivenza. Inoltre, abbiamo esaminato i rapporti filogenetici con le specie della famiglia Pinnidae, focalizzandoci in particolare su *Pinna rudis*, specie che sembra aver occupato la nicchia ecologica lasciata vacante dalla scomparsa di *Pinna nobilis*.

## **Summary**

*Pinna nobilis*, commonly known as the noble pen shell, is a marine bivalve endemic to the Mediterranean Sea, currently facing a severe risk of extinction due to a multifactorial disease that began impacting its populations in 2016. This study aimed to achieve two main objectives: (i) to investigate the evolutionary history of *Pinna nobilis* and its spreading across the Mediterranean, and (ii) to elucidate its phylogenetic relationship with the congeneric species *Pinna rudis*. To meet these objectives, we conducted phylogenetic and phylogeographic analyses on a comprehensive dataset comprising 469 individual samples collected prior to the mass mortality events (MMEs) across the Mediterranean region. Our research reveals that *Pinna nobilis* diverged from its ancestor approximately 2.5 million years ago. Its Atlantic ancestor entered the Mediterranean following the Zanclean flood around 5.3 million years ago. The central part of the western Mediterranean appears to have been the initial area colonized by the species. Additionally, *Pinna rudis* has been identified as the sister taxon to *Pinna nobilis*. These findings are crucial for understanding the historical adaptation processes of *Pinna nobilis* and provide essential information for developing effective conservation strategies. Our insights can guide efforts to preserve and reestablish the species in its natural habitat by means of restoring activities in areas where *Pinna nobilis* has become extinct.

## **Materiali e Metodi**

Nel corso di questo studio sono stati creati due dataset distinti per raggiungere gli obiettivi prefissati.

Il primo dataset comprende tutte le sequenze (469) di *Pinna nobilis* raccolte prima degli eventi di mortalità di massa. Di queste, 369 sequenze sono state prelevate da GenBank [18-21], e sono state integrate con 100 nuove sequenze ottenute da tessuti freschi di campioni raccolti negli anni immediatamente precedenti la MME.

Per raccogliere i tessuti da individui vivi, è stato utilizzato un metodo di campionamento non letale sviluppato da Sanna et al. [18], che è stato eseguito da subacquei e ha minimizzato i danni ai gusci e ai tessuti molli di *Pinna nobilis*.

Il secondo dataset includeva tutte le sequenze del primo, con l'aggiunta delle sequenze di altre specie della famiglia Pinnidae presenti su GenBank. Sono state condotte analisi filogenetiche e filogeografiche dettagliate su entrambi i dataset.

## Risultati e discussione

La nostra ricerca ha dimostrato che la specie *Pinna nobilis* si è differenziata circa 2,5 milioni di anni fa, subito dopo l'evento di inondazione del periodo Zancleano [22]. Questo evento ha creato le condizioni necessarie per l'ingresso e la successiva colonizzazione del Mediterraneo da parte dell'antenato atlantico di *Pinna nobilis*. I risultati hanno rivelato che la parte centrale del Mediterraneo occidentale è stata il primo punto di colonizzazione, seguito da un accumulo di variabilità genetica e dalla successiva radiazione adattativa in tutto il Mediterraneo.

Inoltre, per la prima volta, *Pinna rudis* è stata identificata come sister taxon di *Pinna nobilis*, suggerendo una stretta relazione evolutiva tra le due specie e indicando una possibile storia condivisa di adattamenti ecologici e genetici.

Questi risultati sono particolarmente rilevanti per le strategie di conservazione, poiché forniscono informazioni essenziali per sviluppare approcci efficaci che si concentrino sul ripristino della diversità genetica originaria nelle aree dove *Pinna nobilis* è attualmente estinta. Inoltre, conoscere le affinità genetiche e la vicinanza evolutiva tra *Pinna nobilis* e *Pinna rudis* aiuterà a comprendere meglio i fenomeni di ibridazione tra le due specie [23,24] e il potenziale di resistenza alla MME.

## Bibliografia

- [1] Butler, A., Vicente, N., & de Gaulejac, B. (1993). Ecology of the pteroid bivalves *Pinna bicolor* Gmelin. *Mar Life*, 3(1-2), 37-45.
- [2] Gómez-Alba, J. (1988). *Guía de Campo de los Fósiles de España y de Europa*. Ediciones Omega.
- [3] March, J. R. G. (2005). Aportaciones al conocimiento de la Biología de *Pinna nobilis* Linneo, 1758 (Mollusca: Bivalvia) en el litoral mediterráneo Ibérico. Universitat de Valencia (Spain).
- [4] Maeder, F. (2017). Landscapes of Sea-silk. Traces of Traditional Production around Mediterranean Sea. *Project Sea-Silk*.
- [5] Vázquez-Luis, M., Borg, J. A., Morell, C., Banach-Esteve, G., & Deudero, S. (2015). Influence of boat anchoring on *Pinna nobilis*: a field experiment using mimic units. *Marine and Freshwater Research*, 66(9), 786-794.
- [6] Öndes, F., Kaiser, M. J., & Güçlüsoy, H. (2020). Human impacts on the endangered fan mussel, *Pinna nobilis*. *Aquatic conservation: Marine and freshwater ecosystems*, 30(1), 31-41.
- [7] Vázquez-Luis, M., Álvarez, E., Barrajón, A., García-March, J. R., Grau, A., Hendriks, I. E., ... & Deudero, S. (2017). SOS *Pinna nobilis*: a mass mortality event in western Mediterranean Sea. *Frontiers in Marine Science*, 4, 220.
- [8] Catanese, G., Grau, A., Valencia, J. M., Garcia-March, J. R., Vázquez-Luis, M., Alvarez, E., ... & Villalba, A. (2018). *Haplosporidium pinnae* sp. nov., a haplosporidan parasite associated with mass mortalities of the fan mussel, *Pinna nobilis*, in the Western Mediterranean Sea. *Journal of invertebrate pathology*, 157, 9-24.
- [9] Prado, P., Carrasco, N., Catanese, G., Grau, A., Cabanes, P., Carella, F., ... & Andree, K. B. (2020). Presence of *Vibrio mediterranei* associated to major mortality in stabled individuals of *Pinna nobilis* L. *Aquaculture*, 519, 734899.
- [10] Künili, İ. E., Ertürk Gürkan, S., Aksu, A., Turgay, E., Çakir, F., Gürkan, M., & Altınağaç, U. (2021). Mass mortality in endangered fan mussels *Pinna nobilis* (Linnaeus 1758) caused by co-infection of *Haplosporidium pinnae* and multiple *Vibrio* infection in Çanakale Strait, Turkey. *Biomarkers*, 26(5), 450-461.
- [11] Carella, F., Aceto, S., Pollaro, F., Miccio, A., Iaria, C., Carrasco, N., ... & De Vico, G. (2019). A mycobacterial disease is associated with the silent mass mortality of the pen shell *Pinna nobilis* along the Tyrrhenian coastline of Italy. *Scientific reports*, 9(1), 2725.
- [12] Carella, F., Prado, P., De Vico, G., Palić, D., Villari, G., García-March, J. R., ... & Aceto, S. (2023). A widespread picornavirus affects the hemocytes of the noble pen shell (*Pinna nobilis*), leading to its immunosuppression. *Frontiers in Veterinary Science*, 10, 1273521.
- [13] García-March, J. R., Tena, J., Henandis, S., Vázquez-Luis, M., López, D., Téllez, C., ... & Deudero, S. (2020). Can we save a marine species affected by a highly infective, highly lethal, waterborne disease from extinction?. *Biological Conservation*, 243, 108498.
- [14] Martínez-Martínez, P., Alonso-Sarría, F., Gomariz-Castillo, F., Reñé-Sánchez, E., Cortés-Melendreras, E., Fernández-Torquemada, Y., & Giménez-Casaldueiro, F. (2024). Looking for the surviving optimal areas for the threatened species *Pinna nobilis* in a highly anthropized coastal lagoon (Mar Menor, SE Spain). *Ocean & Coastal Management*, 255, 107265.
- [15] Cinar, M. E., Bilecenoglu, M., YOKES, M. B., & Güçlüsoy, H. A. R. U. N. (2021). The last fortress fell: mass mortality of *Pinna nobilis* in the Sea of Marmara. *Mediterranean Marine Science*, 22(3), 669-676.
- [16] Lunetta, A., Spinelli, A., Donato, G., Gatì, I. A., & Giacobbe, S. (2024). Lake faro (Central Mediterranean): A potential short-term reservoir for *Pinna nobilis*. *Journal for Nature Conservation*, 81, 126690.
- [17] Katsanevakis, S., Carella, F., Çinar, M. E., Çizmek, H., Jimenez, C., Kersting, D. K., ... & Vicente, N. (2022). The fan mussel *Pinna nobilis* on the brink of extinction in the Mediterranean. In *Imperiled: The Encyclopedia of Conservation*; DellaSala, D.A., Goldstein, M.I., Eds.; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2022; Volumes 1–3.
- [18] Sanna, D., Cossu, P., Dedola, G. L., Scarpa, F., Maltagliati, F., Castelli, A., ... & Casu, M. (2013). Mitochondrial DNA reveals genetic structuring of *Pinna nobilis* across the Mediterranean Sea. *PLoS One*, 8(6), e67372.

- [19] Katsares, V., Tsiora, A., Galinou-Mitsoudi, S., & Imsiridou, A. (2008). Genetic structure of the endangered species *Pinna nobilis* (Mollusca: Bivalvia) inferred from mtDNA sequences. *Biología*, 63, 412-417.
- [20] Rabaoui, L., Mejri, R., Tlig-Zouari, S., Bahri, L., Ben Hassine, O. K., & Tsigenopoulos, C. S. (2011). Genetic variation among populations of the endangered fan mussel *Pinna nobilis* (Mollusca: Bivalvia) along the Tunisian coastline. *Hydrobiologia*, 678, 99-111.
- [21] Wesselmann, M., González-Wangüemert, M., Serrão, E. A., Engelen, A. H., Renault, L., García-March, J. R., ... & Hendriks, I. E. (2018). Genetic and oceanographic tools reveal high population connectivity and diversity in the endangered pen shell *Pinna nobilis*. *Scientific reports*, 8(1), 4770.
- [22] Garcia-Castellanos, D., Estrada, F., Jiménez-Munt, I., Gorini, C., Fernández, M., Vergés, J., & De Vicente, R. (2009). Catastrophic flood of the Mediterranean after the Messinian salinity crisis. *Nature*, 462(7274), 778-781.
- [23] Coupé, S., Prévot, J. M., Giantsis, I., Scarpa, F., Luis, M. V., Foulquié, M., ... & Bunet, R. (2022). Toll-like receptor polymorphism in fan mussels: Does the resistance of *Pinna nobilis* to *Haplosporidium pinnae* only depends on its hybridization with *Pinna rudis*. *Authorea Prepr*, 1-24.
- [24] Catanese, G., Vázquez-Luis, M., Giacobbe, S., García-March, J.R., Zotou, M., Prado, P., ... & Grau A. (2024). Internal transcribed spacer as effective molecular marker for the detection of natural hybridization between the bivalves *Pinna nobilis* and *Pinna rudis*. *Ecology and Evolution*, 14 (8), e70227.

# Valutazione della variabilità genetica di *Callinectes sapidus* Reovirus 1 (CsRV1) nel granchio blu: implicazioni per il monitoraggio e la gestione

F. Scarpa<sup>1</sup>, M. Perra<sup>1</sup>, A. Ciccozzi<sup>1</sup>, I. Azzena<sup>2</sup>, C. Locci<sup>1,2</sup>, N. Pascale<sup>2,3</sup>, M. Campolmi<sup>4</sup>, D. Sanna<sup>1</sup>, M. Casu<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Dipartimento di Scienze Biomediche, Università degli Studi di Sassari, Viale San Pietro 43b, 07100 Sassari, Italia;

<sup>2</sup>Dipartimento di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Sassari, Via Vienna 2, 07100 Sassari, Italia;

<sup>3</sup>Dipartimento di Scienze Chimiche Fisiche Matematiche e Naturali, Università degli Studi di Sassari, Via Vienna 2, 07100 Sassari, Italia;

<sup>4</sup>Assessorato Agricoltura e riforma agro-pastorale, Regione Autonoma della Sardegna, Via Pessagno 4, 09126 Cagliari, Italia

**Keywords:** *Callinectes sapidus* Reovirus 1, CsRV1, genetica, granchio blu, *Callinectes sapidus*

## Introduzione

L'aumento della frequenza di epidemie negli ecosistemi acquatici sta causando significative interruzioni tra le specie e le comunità [1]. Questo fenomeno ha spinto numerosi studi sull'espansione delle malattie e sul modo in cui queste sono influenzate dalle strategie di vita degli ospiti [2]. Tra i fattori cruciali che regolano la composizione delle comunità virali acquatiche vi sono le barriere alla dispersione e le condizioni ambientali [3]. La variabilità genetica dei virus e i cambiamenti climatici sono fattori chiave che influenzano la patogenicità e la trasmissibilità dei virus acquatici [2]. Temperature diverse possono alterare le condizioni dell'ospite e, di conseguenza, la suscettibilità all'infezione. L'introduzione di specie alloctone, in particolare di quelle invasive, rappresenta una delle sfide principali per la conservazione della natura e la protezione della salute pubblica. Tra i rischi associati a queste introduzioni vi è la diffusione di patogeni potenzialmente dannosi per le popolazioni locali e per l'intero ecosistema.

Il granchio blu (*Callinectes sapidus*) è una specie invasiva con un notevole impatto economico e ambientale [2]. Il suo principale patogeno, il reovirus 1 di *Callinectes sapidus* (CsRV1), è un virus a RNA segmentato che può causare mortalità significativa negli esemplari [2]. Il monitoraggio genetico dei patogeni è fondamentale per identificare e comprendere i rischi associati all'introduzione di specie invasive e ai patogeni che possono accompagnarne l'arrivo. Questo tipo di monitoraggio consente di rilevare tempestivamente nuovi patogeni e valutare il loro impatto potenziale sulla salute pubblica e sull'ecosistema ospitante.

Il monitoraggio genetico dei patogeni è cruciale, soprattutto per i virus segmentati che possono subire riassortimento genetico e generare varianti più pericolose. Questo rischio aumenta con le specie alloctone, che possono introdurre patogeni sconosciuti, minacciando la salute delle popolazioni locali e l'equilibrio ecologico. Per gestire efficacemente tali rischi, è necessario un approccio integrato e multidisciplinare che coinvolga biologi, ecologi, epidemiologi, genetisti e ambientalisti, al fine di monitorare i patogeni, comprendere le loro dinamiche e sviluppare strategie di gestione adeguate.

In questo contesto, presentiamo un'analisi molecolare approfondita della variabilità genetica del virus CsRV1 utilizzando tutti i genomi e le sequenze disponibili nel database.

## Summary

The rise in disease outbreaks within aquatic ecosystems is significantly disrupting species and communities. Among the viruses involved in these epizootics, *Callinectes sapidus* reovirus 1 (CsRV1) is particularly noteworthy due to its impact on the distribution and abundance of the blue crab, *Callinectes sapidus*. CsRV1 is a pathogenic virus with a segmented double-stranded RNA genome, known for its high mutation rates, short generation times, and the ability to undergo segment recombination and reassortment. In this study, we conducted a phylodynamic reconstruction using a genome-based approach for all available CsRV1 genomes and segments from the NCBI Virus database. Molecular dating suggests that CsRV1 originated approximately 40 years ago, followed by a rise in genetic variability and an increase in population size around 10 years ago. The estimated evolutionary rates for the 12 segments are very similar, indicating that no segment is more prone to selection or has different evolutionary timescales compared to the others.

Most segments encoding highly conserved proteins are not under selective pressure and shows considerable regional and temporal variation. Ongoing monitoring of CsRV1 is crucial in regions where the blue crab, its host, is present.

## Materiali e Metodi

Il dataset analizzato è stato costruito scaricando tutte le sequenze disponibili nel database NCBI Virus (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/labs/virus/vssi/#/>). Il dataset comprendente 23 genomi completi è stato prima allineato utilizzando l'algoritmo L-INS-I in Mafft 7.471 [4] e successivamente pulito manualmente con il software Unipro UGENE v.35 [5]. L'allineamento dei segmenti è stato eseguito individualmente. I rapporti filogenetici sono stati investigati utilizzando l'algoritmo Bayesiano Markov-Chain Monte Carlo (MCMC) implementato nel



software BEAST 1.10.4 [6]. Con il software Tracer [7] sono state disegnate le curve di espansione per apprezzare il potenziale evolutivo del virus.

## Risultati e Discussione

I risultati dell'analisi filogenetica evidenziano una significativa diversità genetica del virus CsRV1, con una mancanza di strutturazione genetica basata su criteri geografici. Questo suggerisce una rapida diffusione del virus attraverso diverse aree geografiche, con un'unica eccezione rappresentata dai genomi provenienti dal Sud America, che formano un gruppo monofiletico. La presenza di una clade non monofiletica lungo la Costa Atlantica degli Stati Uniti, con sequenze provenienti da altre località, indica la possibile interazione e scambio genetico tra popolazioni di diverse aree geografiche. La datazione molecolare suggerisce un'origine del virus risalente a circa 40 anni fa, con un'espansione significativa del virus nel Sud America negli ultimi 10 anni e nella Costa Atlantica degli Stati Uniti circa 18 anni fa. Questi risultati sottolineano l'importanza di un monitoraggio continuo per comprendere l'evoluzione e la diffusione di CsRV1, al fine di gestire efficacemente le sue implicazioni ecologiche e di conservazione.

Il monitoraggio del virus CsRV1 è di fondamentale importanza nella gestione delle popolazioni di granchio blu, soprattutto nelle acque mediterranee dove la presenza e gli effetti del virus non sono ancora completamente compresi. Il CsRV1, noto per causare mortalità massiccia nel granchio blu in Nord America, potrebbe svolgere un ruolo cruciale nel controllo demografico naturale di questa specie invasiva anche in nuove aree geografiche. Verificare la presenza di CsRV1 non solo aiuta a prevedere possibili eventi di "auto-contenimento" della popolazione di granchi, ma è anche essenziale per prevenire la diffusione del virus ad altre specie autoctone. Inoltre, è di fondamentale importanza considerare che in caso di eradicazione del suo ospite, il granchio blu, il virus potrebbe cambiare in funzione di una nuova forte pressione selettiva. Infatti, se il granchio blu diventasse raro, CsRV1 potrebbe andare alla ricerca di nuovi ospiti tra la fauna locale, mettendo a rischio l'ecosistema sardo. Pertanto, un monitoraggio costante, attraverso tecniche diagnostico-molecolari come la qPCR e il sequenziamento del genoma, è cruciale per comprendere la dinamica di popolazione del virus e prendere decisioni di gestione informate che proteggano sia l'equilibrio ecologico che le attività economiche e turistiche locali.

A tal fine, all'interno del piano operativo finanziato dalla Regione Sardegna, tra i diversi obiettivi, sono previsti anche la ricerca e il monitoraggio di CsRV1 qualora fosse presente nelle popolazioni locali.

## Bibliografia

[1] Lafferty K.D., Porter J.W., Ford S.E. (2004). Are Diseases Increasing in the Ocean? *Annual Review of Ecology, Evolution, And Systematics*, 35 (2004), 31–54.

[2] Zhao M., Plough L.V., Behringer D.C., Bojko J., Kough A.S., Alper N.W., Xu L., Schott E.J. (2023). Cross-Hemispheric Genetic Diversity and Spatial Genetic Structure of *Callinectes sapidus* Reovirus 1 (CsRV1). *Viruses* (2023), 15, 563. <https://doi.org/10.3390/v15020563>

[3] Chow C.E.T., Suttle C.A. (2015). Biogeography of Viruses in the Sea. *Annual Review of Virology*, 2 (2015), 41–66.

[4] Katoh K., Standley D.M. (2013). MAFFT Multiple sequence alignment software version 7: Improvements in performance and usability. *Mol. Biol. Evol.* (2013), 30, 772–780. <https://doi.org/10.1093/molbev/mst010>

[5] Okonechnikov K., Golosova O., Fursov M. (2012). UGENE Team. Unipro UGENE: A unified bioinformatics toolkit. *Bioinformatics* (2012), 28, 1166–1167. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts091>

[6] Drummond A.J., Rambaut A. (2007). BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC Evol Biol.* (2007), 7: e214. doi: <http://doi.org/10.1186/1471-2148-7-214>

[7] Rambaut A., Lam T.T., Carvalho L.M., Pybus O.G. (2016). Exploring the temporal structure of heterochronous sequences using TempEst. *Virus Evol.* (2016), 2, vew007. <https://doi.org/10.1093/ve/vew007>

# Piano d'azione Regionale per la gestione del granchio blu in Sardegna

F. Scarpa<sup>1</sup>, I. Azzena<sup>2</sup>, C. Locci<sup>1,2</sup>, N. Pascale<sup>2,3</sup>, M. Campolmi<sup>4</sup>, D. Sanna<sup>1</sup>, M. Casu<sup>2</sup>

<sup>1</sup>) Dipartimento di Scienze Biomediche, Università degli Studi di Sassari, Viale San Pietro 43b, 07100 Sassari, Italia;

<sup>2</sup>) Dipartimento di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Sassari, Via Vienna 2, 07100 Sassari, Italia;

<sup>3</sup>) Dipartimento di Scienze Chimiche Fisiche Matematiche e Naturali, Università degli Studi di Sassari, Via Vienna 2, 07100 Sassari, Italia;

<sup>4</sup>) Assessorato Agricoltura e riforma agro-pastorale, Regione Autonoma della Sardegna, Via Pessagno 4, 09126 Cagliari, Italia

**Keywords:** *Callinectes sapidus*, granchio blu, specie invasive, alloctoni, biodiversità autoctona

## Introduzione

Il granchio blu, *Callinectes sapidus*, è una specie invasiva originaria delle coste atlantiche del Nord America, introdotta nel Mediterraneo all'inizio del secolo scorso [1]. Negli ultimi anni, la specie ha visto un aumento significativo della sua popolazione, invadendo numerose lagune in tutta Italia. Questa invasività rappresenta un problema rilevante sia per la conservazione della biodiversità locale, sia per l'economia, a causa dei danni che provoca alla pesca nelle lagune [2]. Il granchio blu, infatti, è un predatore vorace che può destabilizzare gli ecosistemi lagunari e marini, nutrendosi di vari invertebrati come molluschi, crostacei e pesci, oltre a danneggiare infrastrutture come attrezzi da pesca e boe.

In Sardegna, il granchio blu è stato segnalato per la prima volta nel 2017 nell'Oristanese [3,4], e da allora si è diffuso rapidamente con un aumento delle segnalazioni di anno in anno. La sua espansione in Sardegna, in particolare nelle aree di pesca, preoccupa le autorità locali e regionali per l'impatto economico e le implicazioni sulla biodiversità autoctona.

Per affrontare queste problematiche, la Regione Sardegna ha finanziato un piano d'azione che prevede l'azione congiunta dei due Atenei Sardi (nell'ambito della legge di stabilità 2023-2025), destinato a finanziare attività di ricerca e monitoraggio per la cattura e la quantificazione del granchio blu e di altre specie aliene nelle aree lagunari in concessione demaniale.

Nello specifico, l'obiettivo principale dell'Unità Operativa dell'Università degli Studi di Sassari sarà quello di aumentare le conoscenze relative alla presenza del granchio blu mediante l'uso di tecniche molecolari, che consentiranno di: i) definire le abitudini alimentari del GB tramite DNA ambientale, ii) verificare la presenza/assenza di CsRV1 nelle popolazioni di GB investigate, e definire il make-up genetico del GB acquisendo così informazioni essenziali sul potenziale evolutivo della specie.

## Summary

The blue crab (*Callinectes sapidus*), originally from North America's Atlantic coast, has rapidly expanded its presence in Sardinian lagoons, raising significant concerns for local biodiversity and the economy. This invasive species is a voracious predator, threatening native species and causing damage to fishing infrastructures. In response, a Sardinian regional initiative has been launched to monitor and manage the blue crab population, involving advanced molecular techniques to analyze its dietary habits, detect the presence of the CsRV1 virus, and assess genetic diversity. Understanding the presence of CsRV1 is particularly important, as this virus could act as a natural population control mechanism, potentially leading to cyclical mass mortality events. However, the virus also poses risks, as it might infect native species, thereby threatening local biodiversity and possibly human health due to its zoonotic potential. The research will provide a comprehensive understanding of the blue crab's ecological role, its impact on local food webs, and the evolutionary dynamics of its populations. These insights are crucial for developing effective management strategies aimed at mitigating the blue crab's negative impacts while preserving the biodiversity of Sardinian ecosystems. This integrated approach will ensure informed and sustainable management of this invasive species.

## Materiali e Metodi

- L'analisi dei contenuti stomacali prevede la raccolta mensile di campioni da specifiche lagune. Il DNA presente nei contenuti stomacali dei granchi blu sarà estratto e purificato utilizzando kit commerciali, minimizzando la contaminazione. Il sequenziamento del DNA verrà effettuato tramite tecniche di nuova generazione (NGS) da servizi esterni. Successivamente, i dati verranno analizzati con software di bioinformatica, assegnando le sequenze a database di riferimento per identificare le specie. Verranno poi analizzate la diversità, le frequenze relative e le interazioni tra le specie.
- Per verificare la presenza/assenza di CsRV1 si prevede il campionamento delle zampe inferiori dei granchi blu, da cui verrà estratto l'RNA dai tessuti muscolari ed epidermici. La presenza del virus CsRV1 sarà verificata tramite qPCR. Per analizzare la dinamica di popolazione del virus, l'intero genoma verrà sequenziato su un subset di campioni, mentre il Segmento 9, noto per essere il più studiato, sarà sequenziato in tutti i campioni. Questo permetterà di ricostruire le origini spaziali e

temporali del virus e di identificare eventuali contrazioni della popolazione di granchi in specifiche aree.

- Per lo studio della variabilità genetica delle popolazioni del granchio blu nelle diverse lagune si prevede il campionamento di tessuti per l'estrazione del DNA, utilizzando kit commerciali. Gli individui saranno genotipizzati con marcatori molecolari per analizzare i livelli di variabilità genetica. Questo permetterà di monitorare eventuali cambiamenti nella popolazione, come regressioni o espansioni, durante le fasi di contenimento. Le analisi prenderanno in considerazione le meta-popolazioni, che rappresentano reti di popolazioni locali connesse da flussi genetici, fondamentali per comprendere la dinamica demografica e la sopravvivenza in ambienti frammentati come le lagune.

### Risultati attesi e Discussione

Grazie agli obiettivi specifici previsti dal piano operativo, alla fine del progetto biennale sarà possibile ampliare le conoscenze relative alla specie *Callinectes sapidus*.

Nello specifico, attraverso l'analisi del DNA ambientale estratto dai contenuti stomacali dei granchi blu, ci si aspetta di ottenere una mappa dettagliata delle specie predate da questa specie invasiva. Questo approccio fornirà una comprensione approfondita delle abitudini alimentari del granchio blu, rivelando le sue preferenze predatore-preda e le sue potenziali minacce alla biodiversità locale. Le informazioni raccolte permetteranno di delineare il ruolo ecologico del granchio blu negli ecosistemi lagunari e marini, evidenziando come questa specie influenzi le catene alimentari e le dinamiche ecologiche. Inoltre, questi dati saranno fondamentali per sviluppare modelli predittivi che potranno essere utilizzati per anticipare i possibili impatti futuri del granchio blu sulle popolazioni autoctone e per guidare strategie di gestione più efficaci.

Lo studio molecolare volto alla rilevazione del virus CsRV1 nei granchi blu rappresenta un passo cruciale per comprendere il potenziale di controllo naturale delle popolazioni invasive. La conferma della presenza e della distribuzione del virus in Sardegna potrebbe indicare la possibilità di un auto-contenimento delle popolazioni di granchio blu, riducendo la necessità di interventi umani. Tuttavia, l'identificazione del virus solleva anche preoccupazioni relative alla possibile trasmissione ad altre specie autoctone, con rischi significativi per la biodiversità e la salute pubblica, data la natura zoonotica di alcuni patogeni. Lo studio fornirà una visione dettagliata della struttura e delle dinamiche del virus, permettendo di identificare eventuali contrazioni della popolazione di granchi blu in specifiche aree e di prevedere le future tendenze di diffusione del patogeno.

L'analisi genetica delle popolazioni di granchio blu nelle lagune sarde permetterà di valutare la diversità genetica all'interno e tra le diverse popolazioni locali, contribuendo a comprendere meglio le dinamiche di meta-popolazioni in ambienti frammentati come le lagune. Attraverso la genotipizzazione degli individui, sarà possibile rilevare variazioni nella struttura genetica delle popolazioni durante il monitoraggio e le fasi di contenimento, fornendo indicazioni preziose su eventuali regressioni o espansioni della specie. Questi risultati saranno essenziali per valutare la resilienza delle popolazioni di granchio blu e la loro capacità di adattamento a cambiamenti ambientali, contribuendo a informare e ottimizzare le strategie di gestione e conservazione di questo invasore nelle lagune sarde.

Tutte queste informazioni offriranno una visione integrata e approfondita del granchio blu, una specie invasiva che sta trasformando gli ecosistemi in cui si insedia. La raccolta e l'analisi dei dati su dieta, patogeni e variabilità genetica permettono di comprendere meglio l'impatto ecologico e le dinamiche delle popolazioni di granchio blu. Queste conoscenze sono fondamentali per sviluppare strategie di gestione più efficaci, orientate sia alla mitigazione dei danni economici e ambientali che alla conservazione della biodiversità locale. In sintesi, tali studi forniscono gli strumenti necessari per una gestione informata e sostenibile di questa specie invasiva.

### Bibliografia

[1] Nehring S. (2011). Invasion history and success of the American blue crab *Callinectes sapidus* in European and adjacent waters. B.S. Galil, P.F. Clark, J.T. Carlton (Eds.), In the Wrong Place – Alien Marine Crustaceans: Distribution, Biology and Impacts. Invading Nature – Springer Series in Invasion Ecology, Springer, Netherlands (2011), pp. 607-624.

[2] Marchessaux G., Mangano M.C., Bizzarri S., M'Rabet C., Principato E., Lago N., Vetssiere D., Garrido M., Scyphers S.B., Sarà G. (2023). Invasive blue crabs and small-scale fisheries in the Mediterranean Sea: Local ecological knowledge, impacts and future management. *Marine Policy*, 148, (2023), 105461. <https://doi.org/10.1016/j.marpol.2022.105461>

[3] Culurgioni J., Diciotti R., Satta C.T., Camedda A., de Lucia G.A., Pulina S., Lugliè A., Brundu R., Fois N. (2018). First data on the appearance of *Callinectes sapidus* (Rathbun, 1896) in Sardinia (western Mediterranean). Atti del XXVIII Congresso Società Italiana di Ecologia - Cagliari 12-14 settembre 2018, p 112, <https://www.ecologia.it/images/pdf/2018/AttiXXVIII.pdf>

[4] Piras P., Esposito G., Meloni D. (2019). On the occurrence of the blue crab *Callinectes sapidus* (Rathbun, 1896) in Sardinian coastal habitats (Italy): a present threat or a future resource for the regional fishery sector? *BiolInvasions Records* (2019), 8, 134–141. <https://doi.org/10.3391/bir.2019.8.1.15>

# Panoramica legislativa in materia di biosicurezza in molluschicoltura: novità dall'Europa al contesto nazionale

*E. Schiavon<sup>1</sup>, E. Franzago<sup>1</sup>, S. Rizzo<sup>1</sup>, L. Bille<sup>1</sup>, A. Toffan<sup>1</sup>, A. Marsella<sup>1</sup>, A. Fabris<sup>2</sup>, G. Prioli<sup>3</sup>, M. Dalla Pozza<sup>1</sup>*

<sup>1</sup> Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie – Legnaro (PD)

<sup>2</sup> Associazione Piscicoltori Italiani (API) – Verona (VR)

<sup>3</sup> AMA - Associazione Mediterranea Acquacoltori – Roma (RM)

**Keywords:** Biosicurezza, Manuale di buone prassi, Molluschi.

## Introduzione

Il Regolamento (UE) 2016/429, noto come “Animal Health Law” (AHL), aggiorna e sostituisce precedenti normative sulla sanità animale, come la Direttiva CE 2006/88 recepita in Italia con il D.lgs. 148/08, stabilendo un quadro normativo armonizzato basato sul principio “prevenire è meglio che curare”. L’AHL adotta un approccio basato sul rischio, promuovendo la sorveglianza come strumento di individuazione precoce di malattie ed enfatizzando la prevenzione e le buone pratiche di allevamento, favorendo l’adozione di misure di biosicurezza negli stabilimenti per ridurre e ottimizzare l’uso di antimicrobici. Questo approccio sostiene il principio “One Health”, evidenziando il legame tra benessere animale, salute umana e ambientale. La biosicurezza, diventa responsabilità dell’operatore, e richiede la stesura di un piano specifico per ciascun stabilimento e la nomina di un responsabile per la sua attuazione. Il Regolamento delegato (UE) 2020/691 integra l’AHL, fornendo direttive dettagliate sulle misure di biosicurezza da adottare negli stabilimenti di acquacoltura, inclusa la molluschicoltura, e durante il trasporto di animali acquatici, al fine di prevenire l’introduzione di malattie elencate o emergenti. Le misure di biosicurezza in questione includono la separazione funzionale degli spazi, il controllo degli accessi, la sanificazione di attrezzature e veicoli, e il monitoraggio della salute degli animali. Queste misure devono essere attuate per prevenire l’ingresso di patogeni (attraverso mezzi di trasporto o visitatori di ogni tipologia) oltre che per limitarne la diffusione attraverso cross-contaminazioni tra le unità produttive dello stabilimento, nonché l’ulteriore diffusione del patogeno ad altri allevamenti. In risposta al contesto europeo, l’Italia ha emanato il D.lgs. 136/2022, che enfatizza l’importanza della prevenzione attraverso la sorveglianza dello stato di salute degli animali da parte dell’operatore formato e sensibilizzato da parte dell’Autorità competente anche in relazione alla capacità di identificare e valutare i rischi sanitari nei propri stabilimenti. La conoscenza approfondita delle malattie principali, compresi i patogeni specifici per i molluschi, e dei relativi fattori di rischio è essenziale per applicare efficacemente le misure di biosicurezza, facilitando la prevenzione e la tempestiva identificazione di problemi sanitari.

Il personale dell’Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie (IZSve), con sede del Centro di Referenza Nazionale per lo studio e la diagnosi delle patologie di pesci, molluschi e crostacei, in collaborazione con l’Associazione Piscicoltori Italiani (API), l’Associazione Mediterranea Acquacoltori (AMA) e, insieme alle autorità competenti locali hanno raccolto materiale informativo e identificato le principali misure di biosicurezza necessarie per tutelare la salute di pesci e molluschi.

Nell’ambito del Piano Nazionale Triennale della Pesca e Acquacoltura (2023), il Ministero dell’Agricoltura, della Sovranità Alimentare e delle Foreste (MASAF) ha finanziato la realizzazione di una guida operativa sulle buone prassi di biosicurezza negli stabilimenti di acquacoltura. Tale guida raccoglie le informazioni frutto della collaborazione tra ricerca scientifica e realtà territoriali.

## Summary

Regulation (EU) 2016/429, known as the Animal Health Law (AHL), replaces previous animal health legislation. Under this regulation, biosecurity becomes the responsibility of operators, requiring the drafting of a specific plan for each establishment to ensure its application and implementation. Delegated Regulation (EU) 2020/691 complements the AHL by providing specific guidelines for biosecurity in aquaculture and the transport of aquatic animals. In Italy, Legislative Decree 136/2022 requires mollusc farming operators to identify and manage health risks, based on a thorough understanding of diseases and mollusc-specific pathogens. A working group involving the Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie (IZSve) and aquaculture trade associations has developed a manual of good practices for biosecurity in mollusc farming. The manual outlines procedures for identifying and mitigating risks, staff training, and maintaining documentation for inspections. Once a forthcoming Ministerial Decree is enacted, official guidelines will assist operators in creating biosecurity plans and help authorities verify compliance using checklists.

## Materiali e metodi

Nell’ambito del Piano Nazionale Triennale Pesca e Acquacoltura – Annualità 2023 (CUP J38H23001060001) è stato creato un manuale che raccoglie una guida operativa sulle le buone pratiche di biosicurezza da inserire nel piano di biosicurezza applicabile a tutti gli stabilimenti di acquacoltura. Le informazioni contenute nel

manuale derivano dal gruppo di lavoro che ha coinvolto l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie (IZSVe), l'Associazione Piscicoltori Italiani (API) e l'Associazione Mediterranea Acquacoltori (AMA). Il manuale ha lo scopo di supportare gli operatori nella progettazione e attuazione di una serie di procedure e attività volte a individuare e mitigare i rischi di introduzione e diffusione delle malattie.

### **Risultati e discussione**

Il manuale di buone prassi in materia di biosicurezza negli stabilimenti di acquacoltura si articola in due macro aree di applicazione: una riguardante il gruppo dei "pesci" e l'altra il gruppo dei "molluschi". Esso fornisce linee guida per progettare e attuare il piano di biosicurezza, come richiesto dal Regolamento (UE) 2016/429, dai regolamenti delegati ed esecutivi e, nel contesto italiano, dal Decreto Ministeriale, in corso di pubblicazione che disciplinerà la biosicurezza negli stabilimenti di acquacoltura e nel trasporto di animali acquatici. In concreto, il manuale permette di evidenziare i principali rischi di introduzione e diffusione di patogeni durante le fasi di allevamento degli animali acquatici (es. movimentazione di animali, predazione da parte di animali selvatici, tipologia della fonte idrica, presenza di altri stabilimenti vicini), consente di registrarli e propone sistemi per la loro gestione e prevenzione. Le indicazioni del piano di biosicurezza prevedono misure di protezione strutturali e di gestione igienico-sanitaria, che devono essere adattate a ogni stabilimento in base alle specie allevate, all'habitat, alla collocazione geografica, ai rischi di esposizione alle malattie e alle misure di prevenzione adottabili. Il manuale è articolato in diverse sezioni:

1. Identificazione del responsabile della biosicurezza e raccolta dei dati dello stabilimento;
2. Individuazione dei rischi specifici per la molluschicoltura, misure di mitigazione e formazione del personale;
3. Modelli di registri per la tracciabilità e la gestione degli eventi sanitari, oltre alla documentazione necessaria durante le ispezioni delle Autorità Competenti.
4. Allegati che riportano un *fac-simile* per la redazione di un proprio piano di biosicurezza.

### **Conclusioni**

Con l'entrata in vigore del Decreto Ministeriale, di imminente promulgazione, verranno pubblicate specifiche linee guida che avranno lo scopo di aiutare gli operatori della molluschicoltura nella redazione di un piano di biosicurezza applicabile ai loro stabilimenti, e le Autorità Competenti nella verifica dell'efficacia delle misure adottate, tramite l'utilizzo di apposite checklist.

### **Bibliografia:**

[1] Regolamento (UE) 2016/429 del 9 marzo 2016 del Parlamento europeo e del Consiglio relativo alle malattie animali trasmissibili e che modifica e abroga taluni atti in materia di sanità animale («normativa in materia di sanità animale»).

[2] Regolamento delegato (UE) 2020/691 del 30 gennaio 2020 della Commissione che integra il regolamento (UE) 2016/429 del Parlamento europeo e del Consiglio per quanto riguarda le norme relative agli stabilimenti di acquacoltura e ai trasportatori di animali acquatici.

[3] Associazione Piscicoltori Italiani (API) (2012). Manuale di corretta prassi operative per le specie ittiche, relative all'allevamento, alla prima trasformazione e alla vendita di specie ittiche di acqua dolce, salmastra e marina. I quaderni dell'acquacoltura – 22.

[4] Decreto legislativo 5 agosto 2022, n. 136. Attuazione dell'articolo 14, comma 2, lettere a), b), e), f), h), i), l), n), o) e p), della legge 22 aprile 2021, n. 53 per adeguare e raccordare la normativa nazionale in materia di prevenzione e controllo delle malattie animali che sono trasmissibili agli animali o all'uomo, alle disposizioni del regolamento (UE) 2016/429 del Parlamento europeo e del Consiglio, del 9 marzo 2016. Gazzetta Ufficiale n.213 del 12-09-2022).

# Dal laboratorio alla tavola: esperimenti di cucina su molluschi bivalvi sperimentalmente contaminati per abbattere il rischio microbiologico

G. Talevi<sup>1\*</sup>, G. Angelico<sup>1\*</sup>, S. Nardi<sup>1\*</sup>, F. Piangerelli<sup>1\*</sup>, S. Di Lullo<sup>1</sup>, S. Pieralisi<sup>1</sup>, E. Rocchegiani<sup>1</sup>, F. Barchiesi<sup>1</sup>, A. Antognini<sup>2</sup>, C. Baldi<sup>2</sup>, C. Spinsanti<sup>2</sup>, D. Ottaviani<sup>1</sup>

<sup>1</sup>) Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche – Ancona (AN)

<sup>1\*</sup> *Tutti gli autori hanno contribuito equamente*

<sup>2</sup>) CO.PE.MO - Cooperativa Pescatori Molluschicoltori – Ancona (AN)

**Keywords:** *Chamelea gallina*, *Mytilus galloprovincialis*, Batteri patogeni, Cottura

## Introduzione

I Molluschi Eduli Lamellibranchi (MEL) sono uno dei prodotti ittici più consumati dagli italiani, ma sono anche alimenti a rischio perché sono organismi filtratori e quindi bioaccumulano agenti patogeni e sostanze tossiche. Per questo motivo i MEL rappresentano un rischio batterico (*Salmonella spp*, *Shigella spp.*, *E. coli*, *Campylobacter spp*, *Vibrio spp.* e *Aeromonas spp.*), virale (virus dell'epatite A, Norwalk virus e Norwalk like virus), chimico (metalli pesanti, sostanze tossiche e biotossine algali) e parassitario. In Italia è diffuso il consumo di molluschi bivalvi crudi o parzialmente cotti. Questa modalità di consumo incrementa notevolmente il rischio di malattie di origine alimentare legate ai MEL poiché c'è un forte inquinamento microbiologico dell'acqua di mare soprattutto nelle zone più popolate e molti lotti di molluschi venduti sul mercato ittico non vengono sottoposti a sorveglianza ufficiale perché provengono da fondali clandestini. L'aumento della distribuzione e del consumo di MEL negli ultimi decenni [1] ha spinto le Autorità Nazionali ed Europee ad adottare nuovi decreti e regolamenti. L'Agenzia Europea per la Sicurezza Alimentare (EFSA) ha più volte suggerito ai produttori di molluschi di indicare in etichetta che il prodotto "deve essere consumato previa cottura", ma senza indicare i tempi e le temperatura di trattamento [2]. Durante la fase di produzione è importante la sorveglianza dei molluschi bivalvi e di conseguenza la loro depurazione, ma è altrettanto importante dare al consumatore ulteriori informazioni su come cucinarli per evitare effetti nocivi. Il progetto assume un'importanza rilevante perché mira a mettere a disposizione dei consumatori informazioni corrette ed esaustive (Reg. UE n. 1169/11) su come cucinare e quindi consumare questi alimenti [3]. Lo scopo del presente progetto sperimentale è stato quello di standardizzare le condizioni ottimali di cottura dei MEL che permettano di abbattere il rischio batteriologico da *E.coli*, *Salmonella*, *Vibrio parahaemolyticus* e *Vibrio cholerae*; di verificare se anche per i batteri patogeni sono sufficienti 2' di cottura dall'apertura di tutte le valve come per i virus [4]; di fornire ai produttori dati sperimentali che permettano l'esposizione in etichetta di una ricetta in termini di tempistiche e modalità di cottura.

## Summary

Edible lamellibranch molluscs (MEL) are filter-feeding organisms that bioaccumulate nutrients but also contaminants such as bacteria and viruses. The use of raw or undercooked molluscs is recognized as a vehicle for the fecal-oral transmission of pathogens. The aim of this experimental project was to standardize MEL cooking conditions that could be reproduced in a domestic environment capable of minimizing the bacteriological risk from *E. coli*, *Salmonella*, *V. parahaemolyticus* and *V. cholerae* without altering the organoleptic characteristics of the product.

## Materiali e metodi

I MEL scelti per le sperimentazioni sono stati la Vongola lupino (*Chamelea gallina*) e la Cozza (*Mytilus galloprovincialis*) entrambi forniti dall'Azienda Co.pe.mo. di Ancona. E' stato utilizzato il sacchetto da 1 kg di molluschi per lavorare con la quantità che generalmente viene acquistata in ambito domestico e corrispondente alla massima quantità che una padella può contenere. Abbiamo scelto per la sperimentazione ceppi batterici indigeni (*E.coli*, *Salmonella* Napoli, *Vibrio parahaemolyticus* e *Vibrio cholerae*), isolati da molluschi e crostacei, ognuno con specifiche caratteristiche di tossicità/ patogenicità. I microrganismi sono stati testati singolarmente e nel caso di *V. parahaemolyticus* e *Salmonella* Napoli anche in combinazione. E' stata effettuata una contaminazione artificiale dei molluschi bivalvi per tre ore in vasche sperimentali utilizzando concentrazioni dei microorganismi di circa 10<sup>8</sup> UFC/ml. Si tratta di concentrazioni volutamente molto più elevate di quelle presenti naturalmente nell'ambiente marino ma che potessero rappresentare la condizione di massimo rischio legata ad un prodotto già contaminato al momento dell'acquisto e contestualmente ad una cattiva conservazione dello stesso da parte del consumatore. Dopo il bioaccumulo i molluschi bivalvi sono stati prelevati asepticamente e portati in laboratorio per la cottura e l'analisi microbiologica. Tre sacchetti da 1 Kg, rappresentavano il "bianco campione" e sono stati analizzati per verificare il livello di contaminazione raggiunto. Altrettanti sacchetti rappresentavano "il test campione" e sono invece stati sottoposti a cottura e successivamente analizzati per la presenza dei microrganismi target. Le prove sono state effettuate in triplo per ogni tempo stabilito in due esperimenti separati. I valori finali delle

conte dei patogeni per ogni esperimento sono stati calcolati facendo la media dei valori ottenuti sulle 6 determinazioni. Preliminarmente sono stati effettuati esperimenti di cottura su padelle di differenti misure utilizzando un quantitativo di mitili pari a quello presente in un normale sacchetto del commercio per valutare quale dimensione permettesse una più veloce apertura delle valve. Le condizioni ottimali erano raggiunte con una padella del diametro di 28 cm e quindi le successive sperimentazioni sono state effettuate ricorrendo a padella di queste dimensioni con un numero di mitili pari a quello presente in un sacchetto del commercio (circa 230 individui per *Chamelea gallina* e circa 90 individui per *Mytilus galloprovincialis*).

## Risultati e discussione

La *Chamelea gallina* inizia ad aprirsi a 95°C e a 100°C si completa l'apertura di tutti gli individui in un tempo di 3'(195"). Per quanto riguarda il *Mytilus galloprovincialis* si ha l'inizio dell'apertura valve al raggiungimento di 93°C e a 100°C si ha l'apertura di tutti i molluschi in un tempo di 3,5' (210"). Le conte sono state effettuate in 3 tempi di cottura che permettessero l'abbattimento dei patogeni ma allo stesso tempo conservassero le caratteristiche organolettiche del prodotto. I tre tempi di cottura scelti per la *Chamelea gallina* erano 3', corrispondente al tempo della totale apertura valve, 5' rappresentante il tempo minimo che consente l'eliminazione dei virus [4] e 6', scelto empiricamente come tempo massimo di cottura possibile che permettesse di conservare le caratteristiche organolettiche del prodotto. I risultati delle conte preliminari su bianco campione mostrano che le vongole hanno bioaccumulato i batteri ottenendo buoni livelli di contaminazione sia nel caso dei patogeni testati singolarmente che nel caso della combinazione *V. parahaemolyticus* + *Salmonella* Napoli. La cottura è stata efficace già a tre minuti permettendo l'abbattimento totale della carica dei microrganismi. I tre tempi di cottura del *Mytilus galloprovincialis*, scelti con lo stesso criterio usato per *Chamelea gallina* sono 3,5', 5,5' e 6,5'. La cottura è stata efficace per l'abbattimento di *E. coli* e *V. parahaemolyticus* già a 3,5' mentre per *V. cholerae* e *Salmonella* Napoli è stato necessario prolungare la cottura a 5,5'. Alla luce dei nostri risultati, tenendo conto dei Reg. 1169/2011 e Reg. 178/2002 art. 14 [5] e dei tempi necessari per l'abbattimento virale [4] si potrebbero riportare in etichetta le seguenti ricette di cottura per un sacchetto di molluschi da 1 kg.

Per *Chamelea gallina* "versare il prodotto in una padella con diametro di 28 cm coprire e lasciare cucinare per almeno 5'. Assicurarsi l'apertura totale delle valve."

Per *Mytilus galloprovincialis*: versare il prodotto in una padella con diametro di 28 cm, coprire e lasciare cucinare per almeno 5,5'. Assicurarsi l'apertura totale delle valve".

Sarebbe preferibile a nostro avviso non dare informazioni sulla temperatura di cottura in quanto non è scontato che ogni cittadino sia dotato di un termometro. In questo progetto sono stati testati quei patogeni alimentari più frequentemente contaminanti dei MEL e, per di più i ceppi utilizzati sono ceppi di campo isolati proprio dai MEL e questo rappresenta un valore aggiunto alla sperimentazione perché riproduce in laboratorio situazioni che si potrebbero verificare realisticamente quando il consumatore acquista un prodotto già in origine contaminato e lo conserva in condizioni non idonee fino al momento della cottura. Quindi riportare in etichetta informazioni corrette relativamente a tempi di cottura, per tutelare la salute del consumatore diventa strategico ai fini di ridurre al massimo i rischi tossinfettivi per il consumatore.

Il progetto non vuole ridurre l'importanza della classificazione e mantenimento delle aree di raccolta MEL ma offrire un'arma in più nelle mani del consumatore finale a garanzia della propria salute.

## Bibliografia

[1] Cattaneo, P. (2010). *Molluschi bivalvi vivi ed echinodermi, tunicati e gasteropodi marini vivi*. Università degli studi di Milano.

[2] EFSA BIOHAZ Panel (EFSA Panel on Biological Hazards), 2015. Scientific opinion on the evaluation of heat treatments, different from those currently established in the EU legislation, that could be applied to live bivalve molluscs from B and C production areas, that have not been submitted to purification or relaying, in order to eliminate pathogenic microorganisms. EFSA Journal 2015;13(12):4332, 76 pp. doi:10.2903/j.efsa.2015.4332.

[3] Regolamento (UE) N. 1169/2011 del Parlamento europeo e del Consiglio del 25 ottobre 2011 relativo alla fornitura di informazioni sugli alimenti ai consumatori.

[4] Pascoli F, Pezzuto A, Buratin A, Piovesana A, Fortin A, Arcangeli G, Toffan A. Efficacy of domestic cooking inactivation of human hepatitis A virus in experimentally infected manila clams (*Ruditapes philippinarum*). J Appl Microbiol. 2016 Oct;121(4):1163-71. doi: 10.1111/jam.13242. Epub 2016 Aug 28. PMID: 27451131.

[5] Regolamento(CE) N. 178/2002 del Parlamento europeo e del Consiglio del 28 gennaio 2002 che stabilisce i principi e i requisiti generali della legislazione alimentare, istituisce l'Autorità europea per la sicurezza alimentare e fissa procedure nel campo della sicurezza alimentare.



# Biotossine marine emergenti: quattro anni di monitoraggio delle Immine Cicliche (CIs) in aree di produzione molluschi dell'Emilia-Romagna

T. M. Vollaro<sup>1</sup>, D. Ippoliti<sup>1</sup>, D. Lenzo<sup>1</sup>, S. Dall'Ara<sup>2</sup>, M. Cangini<sup>2</sup>, A. Calfapietra<sup>2</sup>, F. Pino<sup>2</sup>, S. Milandri<sup>2</sup>

<sup>1</sup>) Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia-Romagna "Bruno Umbertini" – Bologna (BO)

<sup>2</sup>) Fondazione Centro Ricerche Marine – Cesenatico (FC)

**Keyword:** Biotossine Emergenti, Immine Cicliche, Molluschi Bivalvi, LC-MS/MS

## Introduzione

Il rischio di consumo di molluschi bivalvi naturalmente contaminati da biotossine marine riguarda in primo luogo la presenza di biotossine responsabili delle sindromi da intossicazione denominate ASP, PSP e DSP, il cui controllo è regolamentato dal Reg. (UE) 2017/625 e dal Reg. (UE) 2019/627<sup>1,2</sup>. Trattandosi di un rischio sanitario, i principali strumenti per garantire la salute dei consumatori sono il monitoraggio sistematico delle aree di produzione e l'ispezione regolare dell'acqua di mare in cui i molluschi vivono per la ricerca di specie di fitoplancton tossico. Esistono però altri gruppi di biotossine marine considerate a "rischio emergente" la cui ricerca non è attualmente regolamentata, per le quali non è previsto il monitoraggio e non ne sono fissati i valori limite<sup>3</sup>.

Le Immine Cicliche (CIs) sono un gruppo eterogeneo di tossine lipofile naturalmente prodotte da fitoplancton tossico<sup>4</sup> e ricadono nelle tossine c.d. "a rischio emergente".

Spirolidi (SPXs), Gymnodimine (GYMs) e Pinnatossine (PnTXs) sono i sottogruppi di tossine più comuni all'interno delle CIs; queste condividono caratteristiche macrocicliche comuni e la presenza di una funzione imminica, presentando un alto grado di somiglianza strutturale<sup>5</sup>. Si presume che proprio il gruppo imminico sia il farmacoforo bioattivo che causa la tossicità di queste molecole<sup>5</sup>. Ad oggi, comunque, i meccanismi di tossicocinetica delle CIs, ovvero i meccanismi di azione e di accumulo di queste tossine all'interno del corpo umano, sono ancora in fase di studio<sup>6</sup>. In un parere del 2010, l'Autorità Europea per la Sicurezza Alimentare (EFSA) ha quindi dichiarato che non ci sono dati sufficienti per poter determinare la pericolosità delle CIs, né per stabilire un limite di concentrazione<sup>7</sup>.

Il Dipartimento di Sanità Pubblica dell'Emilia-Romagna, dato che la presenza di CIs è stata ormai accertata nei molluschi di allevamento europei<sup>8-13</sup>, compreso in quelli del mar Adriatico<sup>14-16</sup>, e data l'assenza di uno studio approfondito in materia, ha ritenuto opportuno approfondire le conoscenze circa la diffusione di tali tossine, in collaborazione con la Fondazione Centro Ricerche Marine di Cesenatico – Laboratorio Nazionale di Riferimento per le biotossine marine e il fitoplancton tossico (LNR-MB) – nelle proprie aree di produzione: dal 2021 alla prima metà del 2024 ha messo in campo un monitoraggio specifico per le CIs su un totale di 476 campioni di MB. Su questi campioni, utilizzando la tecnica in LC-MS/MS, sono state ricercate le tossine: 13,19-didesmethyl Spirolide C, Gymnodimina, Pinnatossina G, Spirolide G e 13-desmethyl Spirolide C.

In questo lavoro sono raccolti ed elaborati i dati circa la presenza e la diffusione di tali biotossine nelle aree di produzione dell'Emilia-Romagna con lo scopo di fornire alle autorità competenti dati utili per la corretta gestione del rischio associato a queste tossine.

## Summary

The consumption of bivalve molluscs can be harmful to human health, as they may be contaminated by marine biotoxins, which are naturally produced by toxic phytoplankton. To protect consumer health, the European Union imposes strict safety controls through continuous monitoring of production areas.

However, not all groups of Biotoxins are regulated, and among these are the Cyclic Imines (CIs), for which the European Food Safety Authority (EFSA) has stated that there is insufficient data to define their dangerousness or to determine recommended concentration limits.

The Department of Public Health of Emilia-Romagna has therefore deemed it necessary to further investigate to deepen knowledge about the spread of these toxins. In collaboration with the Fondazione Centro Ricerche Marine of Cesenatico, they have conducted a monitoring program for CIs on samples from the production areas of Emilia-Romagna, using a method implemented by the Laboratory that employs the LC-MS/MS technique for the identification and quantification of these toxins.

The aim of this work is to analyze the data obtained from the monitoring of CIs, from the beginning of 2021 to early 2024, to determine which toxins may be present along the Emilia-Romagna coasts, the maximum concentration reached and whether it is possible to identify seasonal trends from this data.

## Materiali e Metodi

Dall'inizio del 2021, il LNR-MB ha iniziato l'attività analitica di ricerca delle CIs su campioni di molluschi bivalvi provenienti dalle aree di produzione dell'Emilia-Romagna. In particolare, sono stati analizzati campioni di *Mytilus galloprovincialis*, *Ruditapes philippinarum*, *Chamelea gallina*, *Ostrea edulis*. Durante la campagna di



indagine, durata 4 anni, sono stati monitorati in totale 70 aree di produzione presenti lungo le coste delle province di Rimini, Forlì-Cesena, Ravenna e Ferrara.

Durante i quattro anni di monitoraggio delle CIs sono stati analizzati 476 campioni, dei quali 384 di mitili (80,6%), 90 di vongole (19%) e 2 campioni di ostriche (0,4%); sono così ripartiti negli anni: 100 campioni nel 2021 (74 di mitili, 26 di vongole), 180 nel 2022 (144 di mitili, 36 di vongole), 116 nel 2023 (103 di mitili, 13 di vongole), 80 nel 2024 (63 di mitili, 15 di vongole, 2 di ostriche).

Il metodo impiegato per la ricerca delle Immine Cicliche, AECOSAN-EURLMB Marine Biotoxins v.5 2015, è il metodo di riferimento per la ricerca delle Biotossine Lipofiliche DSP<sup>17,18</sup>, ed è stato utilizzato in particolare per la determinazione delle tossine 13,19-didesmethyl Spirolide C, 20-methyl Spirolide G, Gymnodimina, Pinnatossina G e 13-desmethyl Spirolide C. Il LOQ sperimentale per le CIs è di 10 µg/kg per la 20-methyl Spirolide G, mentre è di 4µg/kg per tutte le altre CIs prese in esame.

## Risultati e Discussione

Dei 476 campioni totali, 128 pari a ≈26,5% hanno presentato una concentrazione di CIs superiore al LOQ e 14 di questi sono risultati positivi a più di una CIs; in particolare 13 campioni sono risultati positivi a due spirolidi diversi, mentre un campione è risultato positivo a tutti e 3 gli spirolidi ricercati.

I campioni positivi possono essere così ripartiti durante gli anni: 6 nel 2021 (6%), 55 nel 2022 (30,5%), 24 nel 2023 (20,5%), 42 nel 2024 (52%).

Analizzando i campioni positivi, troviamo che la tossina maggiormente presente è la 13-desmethyl Spirolide C, riscontrata in 117 campioni (93,6%), seguita dalla 13,19-didesmethyl Spirolide C presente in 13 campioni (10,4%), la Gymnodimina in 7 campioni (5,6%), la 20-methyl Spirolide G in 3 campioni e, infine, la Pinnatossina G riscontrata in 2 campioni (0,5%)<sup>19</sup>.

Andando ad analizzare le concentrazioni più alte che sono state trovate nei vari anni di studio possiamo notare: nel 2021 la tossina trovata in maggior quantità è stata la 20-methyl Spirolide G, con una concentrazione di 15,75 µg/kg; nel 2022 la concentrazione maggiore è stata di 28,2 µg/kg per la 13-desmethyl Spirolide C; nel 2023 il risultato maggiore è stato trovato per la 13-desmethyl Spirolide C, con un valore di 19,5 µg/kg. Il valore più alto in assoluto è stato riscontrato nel 2024, con una concentrazione di 13-desmethyl Spirolide C pari a 37,2 µg/kg.

I mitili si sono confermati come la specie che presenta le maggiori capacità di accumulare Immine Cicliche in quanto 122 campioni su 384 (31,7%) sono risultati positivi alle CIs mentre dei 90 campioni di vongole, solo 6 sono risultati positivi (6,7%), confermando la loro bassa propensione nell'accumulare biotossine.

Tra le CIs, gli Spirolidi sono il sottogruppo più comune; confrontando inoltre i valori ottenuti nei diversi anni, si può riscontrare che solo 22 dei 120 (18,3%) campioni positivi sono stati trovati nei mesi caldi, da maggio a settembre. Questo dato concorda con quelli riportati in letteratura scientifica che trattano del principale organismo produttore di Spirolidi, il dinoflagellato *Alexandrium ostenfeldii*<sup>4</sup>, identificandolo come una specie di acque fredde<sup>16,20</sup>. Questo dato viene ulteriormente confermato dalle concentrazioni di Spirolidi trovate nel corso dell'anno, che hanno valori maggiori nei mesi invernali.

La Gymnodimina è stata riscontrata in 7 campioni, tutti raccolti in un unico giorno in altrettanti allevamenti delle acque antistanti la provincia di Ravenna.

La Pinnatossina G è stata riscontrata per la prima volta in campioni del mar Adriatico nel 2022, insieme all'alga che la produce, il *Vulcanodinium rugosum*<sup>19</sup>, in un campione di vongole proveniente da un allevamento vallivo sito tra le province di Ravenna e quella di Ferrara. Un secondo ritrovamento di Pinnatossina G è stato fatto nel 2023 nello stesso punto di campionamento, senza però traccia dell'alga produttrice.

Le CIs sono state rilevate in oltre il 25% dei molluschi analizzati per gran parte dell'anno, e principalmente in inverno, con le condizioni ambientali e climatiche che possono influenzare il loro accumulo negli organismi marini. Questi risultati sono in accordo con uno studio precedente svolto dall'IZS dell'Umbria e delle Marche "Togo Rosati", che conferma la presenza degli stessi tipi di Spirolidi e con lo stesso andamento stagionale nel nord Adriatico<sup>16</sup>. In questo contesto, nonostante concentrazioni di CIs generalmente basse, è sicuramente raccomandato l'implementazione di un monitoraggio continuo per poter cogliere eventuali cambiamenti nell'andamento di tali tossine negli anni.

Il ritrovamento della Pinnatossina G, per la prima volta segnalato sulla costa italiana dell'Adriatico centro-settentrionale, arricchisce ulteriormente la conoscenza sulla distribuzione geografica delle Immine Cicliche.

## Bibliografia

[1] COMMISSION IMPLEMENTING REGULATION (EU) 2019/ 627 - 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 (2019).

[2] REGULATION (EU) 2017/625 OF THE EUROPEAN PARLIAMENT AND OF THE COUNCIL - On Official Controls and Other Official Activities Performed to Ensure the Application of Food and Feed, Rules on Animal Health and Welfare, Plant Health and Plant Protection Products. Official Journal of the European Union (2017).

- [3] Finch, S. C., Harwood, D. T., Boundy, M. J. & Selwood, A. I. A Review of Cyclic Imines in Shellfish: Worldwide Occurrence, Toxicity and Assessment of the Risk to Consumers. *Mar Drugs* 22, (2024).
- [4] Cembella, A. D., Lewis, N. I. & Quilliam, M. A. The marine dinoflagellate *Alexandrium ostenfeldii* (Dinophyceae) as the causative organism of spirolide shellfish toxins. *Phycologia* 39, 67–74 (2000).
- [5] Cembella, A. D. & Krock, B. Cyclic imine toxins: Chemistry, biogeography, biosynthesis, and pharmacology. in *Seafood and Freshwater Toxins: Pharmacology, Physiology, and Detection* 561–580 (2008).
- [6] Molgó, J. et al. Cyclic Imine toxins from dinoflagellates: a growing family of potent antagonists of the nicotinic acetylcholine receptors. *J Neurochem* 142, 41–51 (2017).
- [7] Scientific Opinion on marine biotoxins in shellfish – Cyclic Imines (Spirolides, Gymnodimines, Pinnatoxins and Pteriatoxins). *EFSA Journal* 8, (2010).
- [8] González, A. V., Rodríguez-Velasco, M. L., Ben-Gigirey, B. & Botana, L. M. First evidence of Spirolides in Spanish shellfish. *Toxicon* 48, 1068–1074 (2006).
- [9] Rundberget, T., Aasen, J. A. B., Selwood, A. I. & Miles, C. O. Pinnatoxins and Spirolides in Norwegian blue mussels and seawater. *Toxicon* 58, 700–711 (2011).
- [10] Rambla-Alegre, M. et al. Occurrence of Cyclic Imines in European commercial seafood and consumers risk assessment. *Environ Res* 161, 392–398 (2018).
- [11] Otero, P. et al. Detection of Cyclic Imine toxins in dietary supplements of green lipped mussels (*Perna Canaliculus*) and in shellfish *Mytilus Chilensis*. *Toxins (Basel)* 12, (2020).
- [12] Otero, P. & Silva, M. Emerging Marine Biotoxins in European Waters: Potential Risks and Analytical Challenges. *Mar Drugs* 20, (2022).
- [13] Estévez, P., Leao, J. M. & Gago-Martinez, A. Marine Biotoxins as natural contaminants in seafood: European perspective. Present Knowledge in Food Safety: A Risk-Based Approach through the Food Chain 115–127 (2022) doi:10.1016/B978-0-12-819470-6.00044-5.
- [14] Ciminiello, P. et al. Toxin profile of *Alexandrium Osterfeldii* (Dinophyceae) from the Northern Adriatic Sea revealed by liquid chromatography-mass spectrometry. *Toxicon* 47, 597–604 (2006).
- [15] Pigozzi, S. et al. First Evidence of Spirolide Accumulation in Northwestern Adriatic Shellfish. <https://www.researchgate.net/publication/235907717> (2006).
- [16] Bacchiocchi, S. et al. Cyclic Imines (CIs) in mussels from north-central Adriatic sea: First evidence of Gymnodimine A in Italy. *Toxins (Basel)* 12, (2020).
- [17] EUROPEAN UNION REFERENCE LABORATORY FOR MARINE BIOTOXINS EU-Harmonised Standard Operating Procedure for Determination of Lipophilic Marine Biotoxins in Molluscs by LC-MS/MS. <http://aesan.mssi.gob.es/en/CRLMB/web/home.shtml> (2015).
- [18] Gerssen, A., Mulder, P. P. J., McElhinney, M. A. & de Boer, J. Liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the detection of marine lipophilic toxins under alkaline conditions. *J Chromatogr A* 1216, 1421–1430 (2009).
- [19] Cangini, M. et al. First Report of Pinnatoxin-G (PnTX-G) in a Marine–Coastal Area of the Adriatic Sea Associated with the Presence of the Dinoflagellate *Vulcanodinium rugosum*. *Mar Drugs* 22, (2024).
- [20] Gribble, K. E. et al. Distribution and toxicity of *Alexandrium Osterfeldii* (Dinophyceae) in the Gulf of Maine, USA. *Deep Sea Res 2 Top Stud Oceanogr* 52, 2745–2763 (2005).

# RELAZIONI A INVITO

# MUSSEL-AID: un approccio multidisciplinare per mitigare i danni causati dalle mortalità estive e dalle fioriture algali negli allevamenti di mitili (*M. galloprovincialis*) off-shore in Veneto

G. Arcangeli

Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie

## Riassunto

L'allevamento di mitili off-shore, con sistema long-line, negli ultimi anni sta attraversando difficoltà soprattutto nel periodo estivo.

In alcuni eventi di mortalità di mitili sono stati identificati recentemente dal Centro di Referenza nazionale (National Reference Laboratory – NRL) per le malattie dei pesci, molluschi e crostacei, protozoi patogeni emergenti appartenenti al genere *Haplosporidium*. Segnalata anche la presenza di un altro protozoo, il *Perkinsus olseni*, endemico in vongola verace e per la prima volta insolitamente causa di gravi infestazioni in mitili nell'estate 2023 nelle aree di allevamento venete.

La mortalità estiva in mitili allevati in mare in passato era stata associata ad altre cause, come la micosi della ghiandola del bisso, non più riconfermata negli anni recenti.

Invece è sempre più segnalata la non costante disponibilità di fitoplancton che può portare a prolungati periodi di digiuno fino ad emaciazione dei mitili che divengono così più vulnerabili ai suddetti patogeni. Anche la composizione del fitoplancton stesso è in fase di cambiamento, predominando specie con dimensioni diverse da quelle solitamente utilizzate dai mitili.

Poter applicare un approccio multidisciplinare e disporre di una modalità di indagine predittiva mediante la valutazione di diversi dati come la velocità di crescita dei molluschi, la presenza di patogeni allo stadio precoce, parametri fisico-chimici dell'acqua e presenza/composizione del seston potrebbe costituire uno strumento utile per l'allevatore, per gestire in modo ottimale le produzioni ed individuare i migliori periodi di raccolta.

## Summary

Mussel farming with the long-line system has shown serious difficulties in recent years, especially in the summer.

In some mussel mortality events, emerging pathogenic protozoa belonging to the genus *Haplosporidium* have recently been identified by the National Reference Laboratory (NRL) for fish, mollusc and crustacean diseases. The presence of another protozoan, *Perkinsus olseni*, has also been reported, endemic in clams and for the first time unusually causing serious infestations in mussels in the summer of 2023 in the Veneto farming areas. Summer mortality in mussels farmed at sea in the past had been associated with other causes, such as mycosis of the byssus gland, no longer confirmed in recent years.

Instead, the non-constant availability of phytoplankton is increasingly reported, which can lead to prolonged periods of fasting until emaciation of the mussels, which thus become more vulnerable to the aforementioned pathogens. The composition of phytoplankton itself is also changing, with species with different sizes than those usually used by mussels predominating.

The application of a multidisciplinary approach and having a predictive investigation method through the evaluation of different data such as the growth rate of molluscs, the presence of pathogens at the early stage, physical-chemical parameters of the water and presence/composition of seston could constitute a useful tool for the farmer, to optimally manage production and identify the best harvest periods.

# Il programma di ricerca GFCM sui granchi blu: un'iniziativa per l'intero Mediterraneo The GFCM Research Programme on Blue Crabs: A Mediterranean-Wide Initiative

L. Bolognini

GFCM – General Fisheries Commission for the Mediterranean

**Keywords:** Granchio blu americano, Granchio blu nuotatore, *Callinectes sapidus*, *Portunus segnis*, programma di ricerca

## Riassunto

Il programma di ricerca GFCM sui granchi blu è stato lanciato nel 2023 in risposta alla raccomandazione GFCM/42/2018/7 adottata dalla commissione per affrontare i problemi e le opportunità associati all'espansione della popolazione di granchi blu nel Mediterraneo. Tale programma di ricerca mira a ottenere le informazioni necessarie per gestire in modo responsabile la pesca del granchio blu del Mediterraneo secondo un protocollo comune e scientificamente fondato. In dettaglio, l'obiettivo è delimitare e ottenere tutte le informazioni necessarie per poter valutare correttamente lo stato delle popolazioni di due specie non indigene di granchi: *Callinectes sapidus* (granchio blu americano) e *Portunus segnis* (granchio blu nuotatore) e stabilire una pesca sostenibile e responsabile. Il programma di ricerca include la raccolta di dati dipendenti e indipendenti dalla pesca, nonché ricerche specifiche su biologia, ecologia, genetica, valutazione degli stock, analisi socioeconomica e opzioni di gestione. È stato strutturato in 6 Work Package (WP), in particolare, il WP2 riguarda la raccolta di dati indipendenti dalla pesca (FID) con l'obiettivo di raccogliere informazioni in campo in aree non necessariamente soggette a pesca, attraverso indagini specifiche progettate ad hoc per raccogliere le diverse fasi della vita e nei diversi habitat di distribuzione. Tale programma includerà anche studi su biologia/ecologia/dispersione larvale, insediamento/reclutamento/giovanili e aspetti comportamentali e genetici. Il WP3 mira a ottenere tutte le informazioni di base necessarie alla pesca del granchio blu lungo le coste del Mediterraneo per raggiungere un livello di conoscenza che potrebbe fornire la giusta struttura e processo di gestione. Le caratteristiche di sfruttamento dovranno essere note in tutta l'area di studio, in particolare per quanto riguarda i dati di cattura e sforzo (giornalieri, mensili, stagionali, annuali), gli attrezzi utilizzati (trappole, reti da posta, reti a strascico) e le loro caratteristiche tecniche e metodologie. Nel 2023-2024 la prima fase è stata eseguita in 12 paesi applicando gli stessi protocolli standardizzati concordati al fine di ottenere dati comparabili in tutta la regione del Mediterraneo. Nella seconda fase del programma di ricerca saranno presi in considerazione altri aspetti rilevanti, come la produzione di una valutazione preliminare degli stock per tali specie, la definizione della pesca del granchio blu, della tecnologia di pesca, degli elementi socioeconomici e della catena del valore, oltre alla produzione di una proposta di gestione che includa elementi tecnici per la gestione della pesca del granchio blu.

## Summary

The GFCM Research Programme on blue crabs was launched in 2023 as a response to the Recommendation GFCM/42/2018/7 adopted by the commission in order to address the problems and opportunities associated with blue crab population expansions in the Mediterranean. It aims at obtaining the necessary information to responsibly manage Mediterranean blue crab fisheries under a common, scientifically based protocol. In detail, the objective is to delimit and obtain all the necessary information to be able to correctly evaluate the state of the populations of two non-indigenous species of crabs: *Callinectes sapidus* (American blue crab) and *Portunus segnis* (blue swimming crab) and to establish a sustainable and responsible fishery. The Research Programme includes fisheries-dependent and fisheries-independent data collection as well as specific research on the biology, ecology, genetics, stock assessment, socio-economic analysis, and options for management. It was structured in 6 Work Packages (WP), in particular, the WP2 is about collecting fishery-independent data (FID) with the aim to gather information from the field in areas not regularly fished, through specific surveys designed ad hoc to collect the different life stages and in the different distribution habitats. It will also include studies on larval biology/ecology/dispersion, settlement/recruitment/juveniles, and behavioral and genetic aspects. WP3 aims at obtaining all the basic necessary information on blue crab fisheries along the Mediterranean coasts to reach a level of knowledge that could provide the right management structure and process. Exploitation characteristics need to be known throughout the study area, especially so concerning catch and effort data (daily, monthly, seasonal, annual), gear used (traps, gillnets, trawls), and their technical characteristics and methodologies. In 2023-2024 the first phase has been running in 12 countries applying the same agreed standardized protocols in order to obtain data comparable throughout the whole Mediterranean region. During the second phase of the research programme other relevant tasks will be taken into account, such as producing a preliminary stock assessment for those species, defining the blue crab fisheries, fishing technology, socio-economic elements, and value chain, other than producing a management proposal including technical elements for the management of blue crab fisheries.

# Il declino del bivalve *Pinna nobilis* nel bacino del Mar Mediterraneo

F. Carella

Dipartimento di Biologia, università degli studi di Napoli Federico II, Via Cinthia, Complesso di MSA

**Keywords:** MMEs; penshell; picornavirus;

## Riassunto

Negli ultimi anni fenomeni di morbidità e mortalità hanno colpito diverse specie di invertebrati marini del Mar Mediterraneo. In particolare, a partire dal 2016, eventi di mortalità di massa (MME) sono stati riportati nel mollusco bivalve *Pinna nobilis*, causandone la quasi totale estinzione. Attualmente, la popolazione residua è riportata solo in baie e lagune in un numero limitato di aree geografiche, e la specie risulta localmente estinta nel suo precedente areale di distribuzione. Dal 2019 la specie è segnalata come in pericolo critico di estinzione dalla Lista Rossa dell'IUCN. Ad oggi, la comunità scientifica ha compiuto notevoli sforzi per la conservazione *in situ* ed *ex situ* della specie; sebbene tali sforzi non si siano ancora dimostrati pienamente efficaci, sono stati registrati notevoli progressi nella conoscenza dei meccanismi riproduttivi della specie in cattività a fini conservativi, nella comprensione del ruolo delle popolazioni residue per un potenziale recupero, e delle dinamiche della pandemia e dei fattori biotici e abiotici coinvolti.

I primi studi eziopatogenetici delle mortalità hanno visto al centro dello studio un parassita appartenente al Phylum *Haplosporidium* dal nome *Haplosporidium pinnae*; ulteriori indagini hanno visto invece il coinvolgimento di infezioni batteriche di diversa natura nella patogenesi delle mortalità, anche in assenza di *H. pinnae*. Solo recentemente, 8 anni dopo l'inizio delle mortalità, è stato compreso che alla base del fenomeno è presente un'infezione virale dovuta a un Picornavirus (*P. nobilis Picornavirus PnPV*) capace di replicarsi attivamente al livello emocitario, e scoperto in popolazioni naturali e individui mantenuti in cattività in Spagna e Italia (Carella et al., 2023). Il virus è in grado di ridurre il numero totale di emociti inducendo apoptosi e di diminuire la capacità delle cellule immunitarie di fagocitare stimoli patogeni (Carella et al., 2024). Le diagnostiche utilizzate per l'indagine degli MME è ancora scarsamente standardizzata e richiede la competenza di patologi veterinari e para-veterinari, che potrebbero valutare simultaneamente una varietà di fattori, dai segni clinici alle condizioni ambientali.

## Summary

Disease outbreaks in several ecologically or commercially important invertebrate marine species have been reported in recent years all over the world. Mass mortality events (MMEs) have affected the noble pen shell (*Pinna nobilis*), causing its near extinction. Currently, residual population are present only in enclosed bays and lagoons in few countries and conservation efforts have been made to maintain individuals in indoor facilities. The species has become locally extinct in most of its previous range and has therefore been flagged Critically Endangered by IUCN's Red List in 2019. Substantial efforts have been made since 2016 by the scientific community for the *in situ* and *ex situ* conservation of the species. Although, these have not yet proven fully successful, there has been substantial progress in efforts to breed the species in captivity in disentangling the role of unaffected populations for potential recovery as well as in understanding the dynamics of the pandemic.

Early studies investigating the causative etiological agent focused on a novel protozoan parasite, *Haplosporidium pinnae*, and other further investigations suggested that concurrent polymicrobial infections could have been pivotal in some MMEs, even in the absence of *H. pinnae*. Recently, 8 years after the first mortality episodes, the presence of a Picornavirus (*P. nobilis Picornavirus PnPV*) actively replicating into the hemocytes of the pen shell have been reported in natural populations and captive individuals from Spain and Italy (Carella et al., 2023). The virus is capable of reduce the total number of hemocyte bringing to cell apoptosis and decrease immune cells capability to phagocyte pathogenic stimuli (Carella et al., 2024). The diagnostic processes used for the investigation of MMEs are still not standardized and require the expertise of veterinary and para-veterinary pathologists, who could simultaneously evaluate a variety of factors, from clinical signs to environmental conditions. Here, we review the available literature on mortality events in *P. nobilis* and discuss approaches to define MMEs in *P. nobilis*.

# È possibile trasformare un'invasione biologica in un'opportunità commerciale? Il caso di *Anadara* spp. nel Mar Adriatico

*M. Chiappi*<sup>1,2,3</sup>, *E. Azzurro*<sup>2,3</sup>, *C. Ferrà*<sup>2,3</sup>, *F. Luzzi*<sup>2</sup>, *S. Guicciardi*<sup>2</sup>, *G. Mancinelli*<sup>4</sup>, *A. Bonaldo*<sup>3,5</sup>, *A. De Marco*<sup>5</sup>, *B. Fracasso*<sup>4</sup>, *S. Mancarella*<sup>4</sup>, *C. R. Girelli*<sup>4</sup>, *F. P. Fanizzi*<sup>4</sup>, *P. Strafella*<sup>2,3</sup>, *G. Scarcella*<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup>) Department of Biological, Geological and Environmental Sciences (BIGEA), University of Bologna (UNIBO), Bologna, Italy

<sup>2</sup>) National Research Council (CNR), Institute for Biological Resources and Marine Biotechnologies (IRBIM), Ancona, Italy

<sup>3</sup>) NBFC, National Biodiversity Future Center, Palermo, Italy

<sup>4</sup>) Department of Biological and Environmental Sciences and Technologies (DiSTeBA), University of Salento, Lecce, Italy

<sup>5</sup>) Department of Veterinary Medical Sciences, University of Bologna, Bologna, Italy

**Keywords:** Specie invasive, bivalvi, *Anadara*, gestione sostenibile, distribuzione e densità, MSY, analisi nutrizionale, invasivismo

## Riassunto

I bivalvi *Anadara kagoshimensis* (Tokunaga, 1906) e *Anadara transversa* (Say, 1822) hanno invaso il Mar Adriatico, classificandosi tra le 100 peggiori specie invasive del Mediterraneo. Sono inclusi anche in una lista di specie marine aliene e criptogeniche con impatti significativi sulla biodiversità, sui servizi ecosistemici o sulla salute umana. La raccolta dei dati e il campionamento di queste specie sono stati condotti nell'ambito del progetto SoleMon, una campagna di pesca sperimentale effettuata per mezzo del rapido. Dal 2008 al 2023, sono stati raccolti dati per valutare l'abbondanza, la distribuzione e lo stato di queste specie in relazione ai punti di riferimento del massimo rendimento sostenibile (MSY) utilizzando il modello AMSY. I subcampioni sono stati sottoposti ad analisi nutrizionali. Entrambe le specie mostrano alte densità nelle acque italiane, dove sono stati delineati due stock distinti per specie. I risultati dell'AMSY indicano che entrambe le specie sono sotto sfruttate, con un MSY relativamente alto. L'analisi nutrizionale ha rivelato che *A. transversa* ha un contenuto di carboidrati più elevato, mentre *A. kagoshimensis* è più ricca di proteine. I nostri risultati forniscono una prima visione del potenziale economico delle specie *Anadara* in Italia.

## Summary

The ark clams *Anadara kagoshimensis* (Tokunaga, 1906) and *Anadara transversa* (Say, 1822) have invaded the Adriatic Sea, ranking among the 100 worst invasive species in the Mediterranean. They are also included in an inventory of alien and cryptogenic marine species with significant impacts on biodiversity, ecosystem services, or human health. Data collection and sampling of these species were conducted within the framework of the SoleMon project, an experimental trawl survey utilizing a modified beam trawl known as "rapido". From 2008 to 2023, data were gathered to assess the abundance, distribution, and status of these species in relation to Maximum Sustainable Yield (MSY) reference points using the AMSY model. Sub-samples underwent nutritional analyses. Both species exhibit high densities in Italian waters, wherein two distinct stocks per species were delineated. AMSY results indicate that both species are under-exploited, with relatively high MSY. Nutritional analysis revealed that *A. transversa* has a higher carbohydrate content, while *A. kagoshimensis* is richer in protein. Our findings provide a preliminary insight into the economic potential of *Anadara* spp. in Italy.

## **Cambiamenti climatici: ripercussioni per la molluschicoltura**

*G. Coppini*

CMCC Centro euromediterraneo sui cambiamenti climatici

### **Riassunto**

La presentazione evidenzierà l'impatto dei cambiamenti climatici nel Mediterraneo, con particolare attenzione alle ondate di calore marine (MHW) e gli eventi estremi. I dati forniti dal Copernicus Marine Service mostrano come queste ondate stiano alterando la temperatura dell'acqua, con possibili effetti negativi sulla crescita e salute dei molluschi. I sistemi di monitoraggio e le previsioni marine sono integrate in sistemi di supporto alle decisioni per aiutare a identificare aree idonee per promuovere un'acquacoltura sostenibile e resiliente e fornire sistemi di allerta precoce per gli eventi estremi.

### **Summary**

The presentation will highlight the impact of climate change in the Mediterranean, focusing on marine heatwaves (MHW) and extreme events. Data provided by the Copernicus Marine Service show how these heatwaves are altering water temperatures, potentially affecting the growth and health of mussels. Monitoring systems and marine forecasts are integrated into decision support systems to help identify suitable areas for promoting sustainable and resilient aquaculture, as well as providing early warning systems for extreme events.



## Ricerca sociale sul “lavoro in molluschicoltura”.

*L. Ferro*

Fondazione Fai Cisl Studi e Ricerche – Università di Padova

**Keywords:** mussel farming, aquaculture, work, regional models, tradition, innovation

### Riassunto

Dopo anni di studio del lavoro nel settore della pesca di cattura in mare la Fondazione Fai Cisl Studi e Ricerche ha impostato un programma di ricerca pluriennale per continuare lo studio sui settori dell’acquacoltura. Il primo step di tale programma ha considerato l’ambito della mitilicoltura in Italia. Lo studio si è svolto nell’arco di alcuni mesi tra marzo e ottobre del 2023. Nel periodo di osservazione era in corso l’emergenza orate nel Golfo della Spezia ed è emerso in tutta la sua gravità il fenomeno del granchio blu. La metodologia utilizzata si è basata su osservazione diretta del lavoro anche tramite telecamera, con interviste, visite degli impianti e degli stabilimenti e raccolta ed analisi dei dati statistici disponibili. Sono stati individuati 5 ambiti regionali (Liguria, Veneto, Marche, Emilia-Romagna, Puglia) con l’approfondimento di 10 casi territoriali. Attraverso l’utilizzo combinato delle varie metodologie è stato possibile realizzare un quadro abbastanza preciso del settore della mitilicoltura italiana con l’evidenziazione di tratti e caratteristiche comuni e vari ambiti di specificità riscontrabili non solo tra modelli regionali, ma anche tra territori della stessa regione. Dal punto di vista dell’analisi dei dati disponibili è stato possibile analizzare le dimensioni della produzione e quelle economiche considerando il loro andamento nel tempo. Le analisi sono state condotte sia confrontando i dati italiani con quelli di alcuni altri paesi europei particolarmente interessanti (principalmente Spagna, Francia e Grecia), sia portando l’analisi al livello del confronto tra diverse province. A fronte di una ricchezza di dati sulla produzione e sul valore economico abbiamo riscontrato una grave carenza sul fronte dei dati sul numero di aziende e sul numero dei lavoratori. Alla fine della nostra rilevazione, in sede di stesura del rapporto di ricerca, ci siamo quindi occupati di realizzare delle stime su queste dimensioni assolutamente fondamentali per la conoscenza del settore e per una valutazione della sua reale entità in termini occupazionali, imprenditoriali e sociali. L’osservazione diretta e l’interlocuzione con gli addetti del settore (sono state realizzate oltre 30 ore di interviste), ci ha permesso di definire una serie di modelli suddivisi in macro aree e distinti in base al livello anche combinato di modelli tradizionali e modelli semi industriali. Sia a livello nazionale che a livello territoriale è stato quindi possibile individuare per alcune aree tematiche (lavoro e mansioni, filiere, impatto e contesto ambientale, concorrenza, legislazione europea, nazionale e locale, inquadramento contrattuale, indennizzi e incentivi, tradizione e innovazione) gli elementi di criticità, ma anche di solidità, del settore.

### Summary

After years of studying work in the marine capture fishing sector, the Fai Cisl Studi e Ricerche Foundation set up a multi-year research program to continue the study of aquaculture sectors. The first step of the program considered the area of mussel farming in Italy. The study took place over several months between March and October 2023. During the observation period, the sea bream emergency in the Gulf of Spezia was underway and the blue crab phenomenon emerged in all its severity. The methodology used was based on direct observation of the work also through camera, with interviews, plant and factory visits, and collection and analysis of available statistical data. Five regional areas were identified (Liguria, Veneto, Marche, Emilia-Romagna, Puglia) with in-depth study of 10 territorial cases. Through the combined use of the various methodologies, it was possible to create a fairly accurate picture of the Italian mussel farming sector with the highlighting of common traits and characteristics and various areas of specificity found not only between regional models, but also between territories in the same region. From the standpoint of analyzing the available data, it was possible to analyze production and economic dimensions by considering their trends over time. Analyses were conducted both by comparing Italian data with those of some other particularly interesting European countries (mainly Spain, France and Greece) and by taking the analysis to the level of comparing different provinces. In the face of a wealth of data on production and economic value, we found a serious lack of data referring the number of firms and the number of workers. Direct observation and interlocution with those working in the sector (more than 30 hours of interviews were conducted), allowed us to define a series of models divided into macro areas and distinguished according to the level even combined of traditional and semi-industrial models. Both at the national and territorial levels, it was thus possible to identify for certain thematic areas (labor and tasks, supply chains, environmental impact and context, competition, European, national and local legislation, contractual framing, compensation and incentives, tradition and innovation) the elements of criticality, but also of solidity, of the sector.

# Gli impatti del granchio blu atlantico, *Callinectes sapidus*, Rathbun, 1896, sulla produttività secondaria della Sacca di Goro, Delta del Po

A. Gavioli<sup>1</sup>, E. Turolla<sup>2</sup>, M. Lanzoni<sup>1</sup>, G. Castaldelli<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Università di Ferrara – Dipartimento di Scienze dell'Ambiente e della Prevenzione

<sup>2</sup>Istituto Delta Ecologia Applicata

**Keywords:** Specie invasive, *Callinectes sapidus*, predazione, molluschicoltura, *Ruditapes philippinarum*

## Riassunto

Il numero di specie aliene introdotte dall'uomo è in costante crescita. Il Mar Mediterraneo, in particolare, è un hotspot di introduzione di specie aliene e, tra queste, il granchio blu atlantico, *Callinectes sapidus*, Rathbun, 1896, sta avendo un notevole impatto sulla biodiversità e sulle attività di pesca.

Questo studio ha analizzato l'andamento della popolazione di granchio blu e gli effetti sulle attività di pesca e acquacoltura, ed in particolare sulla vongola filippina (*Ruditapes philippinarum*) in Sacca di Goro, delta del Po, Adriatico nord-occidentale. Nell'area, le attività di pesca e acquacoltura sono la principale fonte economica e riescono ad impiegare 1600 addetti, più del 60% della popolazione attiva nel comune di Goro. Partendo dalle analisi dei dati del mercato ittico di Goro, i risultati mostrano che la diffusione del granchio blu coincide con il declino di diverse specie commerciali, evidenziando gli impatti ecologici ed economici dovuti a questa specie invasiva. Alcune specie predatrici quali i ghiozzi, *Gobius paganellus* e *Zosterisessor ophiocephalus*, il branzino, *Dicentrarchus labrax*, e l'orata, *Sparus aurata*, mostrano invece una tendenza positiva, evidenziando l'importanza che queste specie possono avere nel limitare la popolazione di granchio blu predandone i giovanili. Dallo studio è evidente l'importanza di strategie di gestione integrata, tra cui oltre alla creazione di una filiera di sfruttamento del granchio blu, può avere un ruolo centrale il ripristino dell'omeostasi ecosistemica tramite, in particolare, l'incremento della predazione sui giovanili del granchio blu. Questa ricerca è la prima a fornire un'analisi degli effetti dell'espansione del granchio blu sulle attività di pesca lagunare, in Italia, offrendo importanti approfondimenti per la gestione.

## Summary

The number of alien species introduced by humans is constantly increasing. The Mediterranean Sea in particular is a hotspot for the introduction of alien species, and among them, the Atlantic blue crab, *Callinectes sapidus*, Rathbun, 1896, has a significant impact on biodiversity and fishing activities.

This study analyzed the population trend of the blue crab and its impact on fishing and aquaculture activities, particularly on the Manila clam (*Ruditapes philippinarum*) in Sacca di Goro, Po Delta, northwestern Adriatic Sea. In this area, fishing and aquaculture activities are the main economic source, employing 1600 workers, more than 60% of the active population in the municipality of Goro. Based on the analysis of data from the Goro fish market, the results show that the spread of the blue crab coincides with the decline of several commercial species, highlighting the ecological and economic impact caused by this invasive species. Some predatory species, such as gobies, *Gobius paganellus* and *Zosterisessor ophiocephalus*, sea bass, *Dicentrarchus labrax*, and gilthead seabream, *Sparus aurata*, show a positive trend, highlighting the importance of these species in limiting the blue crab population by preying on its juveniles.

The study highlights the importance of integrated management strategies, including the creation of a blue crab exploitation chain and the restoration of ecosystem homeostasis, particularly through increased predation on blue crab juveniles. This research is the first to provide an analysis of the effects of blue crab expansion on lagoon fisheries in Italy, providing important insights for management.

# Nuove specie aliene associate agli allevamenti di mitili ed ostriche nel Mediterraneo

B. Mikac<sup>1</sup>, E. Fossi, M. A. Colangelo, G. Prioli, F. Costantini

<sup>1</sup>) Università degli Studi di Bologna  
Dipartimento di Beni Culturali  
Settore scientifico disciplinare: BIOS-05/A Ecologia

**Keywords:** Non-indigenous species, *Mytilus galloprovincialis*, *Magallana gigas*, acquacoltura

## Riassunto

Il seguente studio condotto dall'Università di Bologna si è concentrato sull'identificazione e l'analisi di specie aliene (Non-Indigenous Species, NIS) legate agli allevamenti di mitili (*Mytilus galloprovincialis*) e ostriche del Pacifico (*Magallana gigas*) nell'Adriatico, con particolare attenzione alla costa dell'Emilia-Romagna. Le specie aliene rappresentano una delle principali minacce alla biodiversità marina, in particolare nelle aree di acquacoltura, che fungono spesso da vettori per l'introduzione e diffusione di queste specie. Le indagini sono state condotte sia su popolazioni di mitili e ostriche in ambienti naturali sia in contesti di allevamento, rivelando significative differenze nella composizione faunistica tra questi due tipi di habitat. La nostra ricerca ha rilevato un totale di 149 taxa di invertebrati associati ai mitili, di cui il 12% sono stati classificati come specie aliene. Tra le ostriche, sono stati trovati 103 taxa, con un'incidenza del 17% di specie non indigene. Di particolare rilevanza è il fatto che molte di queste specie aliene non erano mai state segnalate prima d'ora nel Mediterraneo in associazione a questi molluschi, segnalando l'urgenza di affrontare il fenomeno. Lo studio ha riportato per la prima volta nel Mediterraneo la presenza di due specie aliene del genere *Polydora* infestanti per i mitili e le ostriche. Inoltre, è stato osservato anche il parassitismo del mollusco *Rocellaria dubia* nelle ostriche, un fenomeno non documentato fino a questo momento. Questi risultati mettono in evidenza il ruolo cruciale degli allevamenti di mitili e ostriche nella diffusione delle NIS, che pongono potenziali rischi per l'equilibrio degli ecosistemi locali. Lo studio sottolinea l'importanza di una sorveglianza continua e mirata delle aree di acquacoltura, nonché la necessità di una collaborazione tra istituzioni di ricerca e agricoltori per mitigare gli impatti negativi delle specie aliene. Questo lavoro è parte di un progetto finanziato dalla Regione Emilia-Romagna e si inserisce nel quadro di un dottorato di ricerca collaborativo tra l'Università di Bologna e la M.A.R.E. Soc. coop.

## Summary

The following study conducted by the University of Bologna is focused on the identification and analysis of alien species (Non-Indigenous Species, NIS) associated with mussel (*Mytilus galloprovincialis*) and Pacific oyster (*Magallana gigas*) farming in the Adriatic Sea, with particular attention to the coast of Emilia-Romagna. Alien species represent one of the main threats to marine biodiversity, particularly in aquaculture areas, which often act as vectors for the introduction and spread of these species. The investigations were carried out on both mussel and oyster populations in natural environments and in farming contexts, revealing significant differences in the faunal composition between these two habitat types. Our research detected a total of 149 invertebrate taxa associated with mussels, 12% of which were classified as alien species. Among the oysters, 103 taxa were found, with a 17% incidence of non-native species. Particular relevance is the fact that many of these alien species had never been reported before in the Mediterranean in association with these mollusks, highlighting the urgency of addressing this phenomenon. The study reported for the first time in the Mediterranean the presence of two alien species of the genus *Polydora* that infest mussels and oysters. Additionally, parasitism of oysters by the mollusk *Rocellaria dubia* was also observed, a phenomenon not previously documented. These findings underscore the crucial role of mussel and oyster farming in the spread of NIS, which pose potential risks to the balance of local ecosystems. The study emphasizes the importance of continuous and targeted monitoring of aquaculture areas, as well as the need for collaboration between research institutions and farmers to mitigate the negative impacts of alien species. This work is part of a project funded by the Emilia-Romagna Region and is included in a collaborative doctoral research program between the University of Bologna and M.A.R.E. Soc. coop.

## **Movimentazioni di *Ruditapes philippinarum* e rischi sanitari anche correlati alla situazione emergenziale.**

*D. Pandolfo<sup>1</sup>, P. Fumelli<sup>2</sup>*

<sup>1</sup>Azienda ULSS n.3 Serenissima  
Dipartimento di Prevenzione  
*Dipartimento funzionale di sanità pubblica veterinaria e sicurezza alimentare*

<sup>2</sup>Azienda ULSS n.5 Polesana  
Dipartimento di Prevenzione  
*Servizio Veterinario - Unita' di Adria*

### **Riassunto**

La produzione nazionale di vongola verace (*Ruditapes philippinarum*), storicamente molto rilevante in ambito europeo, è concentrata nel comparto ittico del nord Adriatico, in particolare nelle Lagune di Marano e Grado, nella Laguna di Venezia, nelle Lagune del Polesine e nella Sacca di Goro e nelle Valli di Comacchio. L'ultima decade ha visto, pur con alcune differenze, una continua contrazione produttiva dovuta a fattori ambientali, alla carenza di materiale e, da ultimo, all'introduzione del granchio blu (*Callinectes sapidus*).

L'introduzione di materiale seminale di vongola verace negli allevamenti è, pertanto, fortemente legato al reperimento di tale materiale da schiuditori e/o da banchi naturali sia nazionali che esteri.

Questo contesto produttivo richiede, conseguentemente, un'elevata necessità di spostamento di materiale seminale che, data la scarsa reperibilità in ambito locale e nazionale, va sempre più ad interessare zone produttive extra nazionali, con problematiche sanitarie nuove e, talora, di difficile gestione dato il coinvolgimento di altri Paesi e di contesti produttivi poco noti.

La movimentazione tra zone di produzione italiane è normata prevalentemente dall'Intesa Stato-Regioni Rep. Atti n. 79/CSR dell'8 luglio 2010, dal Regolamento UE 2016/429, dal D. Lgs 134/2022 e dal Decreto Ministero della Salute del 7 marzo 2023.

La movimentazione tra zone di produzione può riguardare esemplari giovanili (novellame) o anche prodotto di taglia commerciale. La normativa di settore regola i requisiti e la documentazione necessari per lo spostamento in funzione anche della classificazione delle zone di produzione di origine e di destino.

Se la movimentazione di vongole veraci avviene tra due paesi comunitari, il quadro normativo di riferimento, la documentazione che accompagna tale spostamento e i requisiti richiesti per le zone di produzione di origine varia anche in questo a seconda che tale movimentazione avvenga per una reimmersione del prodotto in zona di produzione o per l'immersione in commercio per il consumo umano.

In conclusione, le mutate necessità del settore di trovare nuove zone di produzione dalle quali approvvigionarsi sia di prodotto destinato al consumo umano sia di prodotto destinato alla reimmersione, zone geograficamente distanti e con caratteristiche molto diverse tra loro, comporta un rischio non trascurabile per la salute pubblica, la sanità animale e l'ambiente, rischi che possono essere gestiti mediante l'adeguata formazione degli operatori e con controlli armonizzati da parte delle autorità competenti coinvolte.

# Ricostruzione di banchi naturali di ostrica piatta *Ostrea edulis* in Adriatico (progetto PNRR MER - Marine Ecosystem Restoration): la molluschicoltura a servizio dell'ambiente

T. Petochi

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

**Keywords:** ostrica piatta, *Ostrea edulis*, acquacoltura, conservazione

## Riassunto

I banchi naturali di ostrica piatta *Ostrea edulis* Linnaeus, 1758 sono tra gli habitat marini più minacciati d'Europa. La loro ricostruzione è oggetto di un intervento del progetto "Marine Ecosystem Restoration (MER)" il più grande progetto sul mare nell'ambito del Piano nazionale di Ripresa e Resilienza. Il ripristino dei banchi di ostriche sarà effettuato in zone costiere in cinque Regioni adriatiche: Friuli-Venezia Giulia, Veneto, Emilia-Romagna, Marche e Abruzzo. Saranno utilizzate ostriche piatte ottenute con tecniche di acquacoltura e di pesca. Le attività di allevamento prevedono i) la raccolta di individui riproduttori da banchi naturali, svolta in collaborazione con la Cooperativa M.A.R.E., ii) l'allestimento di un parco riproduttori e attività di riproduzione in condizioni controllate presso lo schiudatoio *Naturedulis* di Goro (FE), iii) attività di preingrasso in siti idonei a cura di operatori del settore. Esemplari subadulti/adulti saranno quindi collocati in appositi substrati nei siti di ripristino e monitorati.

Inoltre, in collaborazione con l'Istituto Zooprofilattico delle Venezie (IZSVe) sono effettuati i controlli sanitari degli esemplari di ostrica finalizzati alla verifica della presenza/assenza di patologie notificabili (*Bonamia ostreae*, *B. exitiosa*; *Marteilia refrigens*). In collaborazione con l'Università di Padova, viene effettuata la mappatura genetica dei riproduttori al fine di ottimizzare i piani d'incrocio per ridurre i rischi di introgressione nella progenie di ostriche e sono valutati gli effetti di fattori di stress ambientale sulle performance dei giovanili per migliorarne la gestione nelle fasi di allevamento e rilascio.

Tale intervento mostra come le attività di molluschicoltura possano contribuire attivamente al conseguimento degli obiettivi della Strategia Europea per la Biodiversità e della "Nature Restoration Law".

*ISPRA è soggetto attuatore del progetto MER a seguito dell'accordo con il Ministero per l'Ambiente e la Sicurezza Energetica (MASE), amministrazione centrale titolare di intervento PNRR.*

## Summary

The natural flat oyster reefs *Ostrea edulis* Linnaeus, 1758 are among the most threatened marine habitats in Europe. Their reconstruction is one of several interventions of the Marine Ecosystem Restoration (MER) project, the largest one on the sea in the context of the National Recovery and Resilience Plan. The restoration of oyster reefs will be carried out in coastal areas in five Adriatic regions: Friuli-Venezia Giulia, Veneto, Emilia-Romagna, Marche and Abruzzo. Flat oysters obtained through both aquaculture and fishing techniques will be used. The breeding activities envisage i) the collection of adult individuals from natural beds, carried out in collaboration with Cooperativa M.A.R.E., ii) the setting up of a broodstock and reproduction activities under controlled conditions at the *Naturedulis* hatchery in Goro (FE), iii) pre-fattening activities in suitable sites by shellfish farmers. Sub-adult/adult specimens will then be placed in appropriate substrates at the recovery sites and monitored.

In addition, the sanitary status of oysters is checked in collaboration with the Istituto Zooprofilattico delle Venezie (IZSVe), to verify the presence/absence of notifiable diseases (*Bonamia ostreae*, *B. exitiosa*; *Marteilia refrigens*). In collaboration with the University of Padua, the genetic mapping of the broodstock is carried out to optimise the selective breeding, reducing the risks of introgression, and to assess the effects of environmental stress factors on the performance of juveniles to improve their management under farming conditions and release.

This intervention shows how shellfish farming activities can actively contribute to the objectives of the European Biodiversity Strategy and the Nature Restoration Law.

*ISPRA is the implementing party of the MER project following the agreement with the Ministry for the Environment and Energy Security (MASE), the central administration in charge of the PNRR intervention.*

# Progetto di ricerca per la valorizzazione della specie alloctona invasiva *Callinectes sapidus* (granchio blu) nelle aree marine costiere e di transizione del Nord Adriatico

T. Pretto

Centro Specialistico Ittico - Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Legnaro (PD)

**Keywords:** Atlantic blue crab, *Hematodinium spp.*, Adriatic Sea, real-time PCR, histology, haemolymph

## Riassunto

Il granchio blu atlantico, o granchio nuotatore, *Callinectes sapidus* (Rathbun 1896) è una specie alloctona presente nel Mar Mediterraneo sin dalla seconda metà del secolo scorso, ma solo di recente la sua presenza ha provocato importanti impatti negativi nei settori della pesca e dell'acquacoltura. Le grandi dimensioni ed il comportamento aggressivo, l'elevata tolleranza alla variazione dei parametri ambientali, l'elevata fecondità e capacità di dispersione, la rendono una specie ad alto potenziale invasivo. A partire dall'estate del 2023 le attività di venericoltura delle zone del Delta del Po sono state negativamente influenzate dall'aumento in numero di questo crostaceo e dalla sua attività di predazione nei confronti di molluschi bivalvi fossori. Ciò ha causato ingenti perdite nell'allevamento delle vongole veraci filippine (*Ruditapes philippinarum*) e la progressiva paralisi della venericoltura in alcune lagune. In questo contesto il Ministero dell'Agricoltura, della Sovranità Alimentare e delle Foreste (MASAF), ha manifestato l'interesse di avviare delle attività di studio per la valutazione di strategie di controllo, raccolta e immissione sul mercato del granchio blu. Nasce così tramite un accordo di collaborazione tra MASAF e IZSve un progetto di ricerca con un duplice obiettivo: i) valutare la sicurezza igienico-sanitaria del granchio blu in relazione al possibile accumulo nelle carni di metalli pesanti (Hg, Pb, Cd, As) e di contaminanti organici, composti clorurati PCB indicatori, diossine e PCB-CL; ii) valutare lo stato di salute delle popolazioni ricercando la presenza di specifici patogeni del granchio blu, tra i quali il parassita dinoflagellato *Hematodinium sp.*, responsabile della "bitter crab disease", principale causa di rarefazione della popolazione di *C. sapidus* nell'areale di provenienza. I siti di campionamento sono stati identificati nelle principali aree lagunari del Veneto (Scardovari, Laguna di Venezia, Laguna di Caorle), Emilia Romagna (Goro, Ravenna) e Friuli Venezia Giulia (Laguna di Marano e Grado). Da ciascun sito sono stati prelevati nel periodo primaverile (aprile-maggio 2024) 30 esemplari per sito per valutazione sanitaria e nel periodo estivo (luglio-agosto-settembre 2024) 30-50 esemplari per le analisi chimiche. La laguna di Scardovari è stata valutata mensilmente con prelievo di 30 esemplari a partire da gennaio 2024 per monitorare l'andamento della prevalenza di *Hematodinium sp.* Le analisi sanitarie hanno previsto la raccolta dei dati morfometrici, prelievo di emolinfa per ricerca di *Hematodinium sp.* mediante real-time PCR, caratterizzazione del dinoflagellato mediante end-point PCR ed analisi di sequenza, esame istologico dei principali tessuti ed analisi batteriologiche. I risultati preliminari dello studio evidenziano, nel periodo primaverile, granchi infestati da *Hematodinium sp.* con elevata prevalenza nelle lagune emiliane (90-97%), variabile nelle lagune venete (12-32%) e assente nelle lagune di Caorle, Marano e Grado. L'analisi mensile della laguna di Scardovari ha evidenziato prevalenze del 20% tra maggio e settembre ed un incremento invernale a gennaio (77%). La variabilità osservata nella prevalenza dell'infezione nella laguna di Scardovari indica una stagionalità nello sviluppo del parassita nell'ospite granchio che mostra il suo picco a fine inverno. La riduzione della prevalenza nella popolazione di taglia commerciale durante la tarda primavera-estate può essere imputabile alla morte di parte degli esemplari gravemente infetti nel periodo invernale. Osservazioni da parte di pescatori di esemplari letargici e moribondi durante le fasi di raccolta nel periodo marzo-maggio 2024 presso i siti di Scardovari e Goro (confermati positivi ad *Hematodinium*) corroborano questa ipotesi. Inoltre, variazioni della qualità delle carni conseguenti alla presenza di *Hematodinium* in esemplari letargici durante il periodo primaverile sono state già aneddoticamente riportate dai pescatori/consumatori. Sarebbe opportuno considerare queste evidenze nella gestione e definizione dei periodi di prelievo di *C. sapidus* destinato al consumo nelle lagune affette da *Hematodinium sp.*

## Summary

The Atlantic blue crab *Callinectes sapidus* (Rathbun 1896) is an alien species detected in the Mediterranean Sea since the second half of the last century, but only recently, its presence has caused important negative impacts on the fishing and aquaculture sectors. The Italian Ministry of Agriculture, Food Sovereignty and Forestry (MASAF) has expressed interest in studies targeted to the evaluation of control, collection and marketing strategies for this invasive species. Thus, through a collaboration agreement between MASAF and IZSve, a research project was design with a dual objective: i) evaluate the food hygiene and safety of the blue crab regarding to the possible accumulation of heavy metals (Hg, Pb, Cd, As) and other compounds (i.e. organic contaminants, chlorinated indicator PCBs, dioxins and PCB-CLs; ii) evaluate the health status of the crab populations by targeted analysis of specific pathogens of the blue crab, including the dinoflagellate parasite *Hematodinium sp.*, responsible for the bitter crab disease. The sampling sites were selected in the main lagoon areas of Veneto (Scardovari, Venice Lagoon, Caorle), Emilia Romagna (Goro, Ravenna) and

Friuli Venezia Giulia (Marano and Grado Lagoon). From each site, 30 specimens were collected in spring (April-May 2024) for health assessment while in summer (July-August-September 2024) 30-50 specimens were collected for chemical assessments. Moreover, the Scardovari lagoon was evaluated monthly to monitor the trend in the prevalence of *Hematodinium* sp. The health analyses involved the collection of morphometric data, haemolymph sampling for research of *Hematodinium* sp. by real-time PCR, characterization of the dinoflagellate by end-point PCR and sequence analysis, histological examination of the main tissues and bacteriological analyses. The preliminary results of the study highlight, in the spring period, crabs infested with *Hematodinium* sp. with high prevalence in the Emilian lagoons (90-97%), variable in the Venetian lagoons (12-32%) and absent in the lagoons of Caorle, Marano and Grado. The variability observed in the prevalence of the infection in the Scardovari lagoon indicates a seasonality in the development of *Hematodinium* sp. in the crab host, which peaks at the end of winter.

# Fattori ambientali e impatti sui molluschi bivalvi: l'ostrica come specie modello

R. Sussarellu

IFREMER Centre Atlantique (Francia)

**Keywords:** ostrica concava, *Crassostrea gigas*, stress ambientale, inquinamento, riproduzione

## Riassunto

I molluschi bivalvi, a causa delle loro caratteristiche fisiologiche (sessili, filtratori, a fecondazione esterna) sono particolarmente esposti a una moltitudine di stress ambientali. Inoltre degli stress, anche deboli, durante la gametogenesi o gli stadi precoci dello sviluppo larvale possono avere degli impatti ulteriori sul ciclo di vita e sulle generazioni seguenti. L'ostrica concava (*Crassostrea* o *Magallana gigas*) è diffusamente allevata e rappresenta la specie d'ostrica più allevata al mondo. Il controllo del suo ciclo di vita, della sua eco-fisiologia, e la disponibilità recente di risorse genomiche, ne hanno fatto un organismo modello in eco-tossicologia. In questa relazione si descriveranno le recenti ricerche sugli impatti di microplastiche, pesticidi, alghe tossiche et acidificazione degli oceani, sull'ostrica concava. Un interesse particolare sarà portato a casi di studio relativi agli effetti à lungo termine e multigenerazionali.

## Summary

Bivalve mollusks, due to their physiological characteristics (sessile, filter feeders, external fertilization) are particularly exposed to many environmental stresses. Furthermore, even mild stresses during gametogenesis or the early larval development can have further impacts on the life cycle and on subsequent generations. The Pacific oyster (*Crassostrea* or *Magallana gigas*) is a widely farmed species and represents the most farmed oyster in the world. The control of its life cycle, its eco-physiology, and the recent availability of genomic resources have made the Pacific oyster a model organism in eco-toxicology. This talk will describe recent research advances on the impacts of microplastics, pesticides, toxic algae and ocean acidification on the Pacific oyster. Particular interest will be brought to case studies concerning long-term and multigenerational effects.



# Stato dell'arte e previsioni sul comparto venericoltura

E. Turolla

Istituto Delta Ecologia Applicata srl – Ferrara (FE)

**Keywords:** Vongola verace filippina, (*Ruditapes philippinarum*), Venericoltura, Predazione, Specie aliene, Granchio blu, (*Callinectes sapidus*)

## Riassunto

La venericoltura si è sviluppata in Italia con l'introduzione della vongola filippina (*Ruditapes philippinarum*), il cui allevamento si è consolidato negli ultimi 40 anni nelle lagune alto-adriatiche. Questo comparto ha raggiunto le massime dimensioni negli anni '90 con produzioni di 60-65.000 t/anno realizzate soprattutto nella laguna di Venezia. Varie problematiche ne hanno poi determinato il ridimensionamento fino alle attuali 20.000 t prodotte in gran parte nelle lagune del Delta del Po. La perdita di aree produttive e il calo della disponibilità di seme selvatico sono le cause principali di questa flessione e comunque sono state fronteggiate con interventi di miglioramento idraulico e ricorrendo alla fornitura di seme presso schiudatoi italiani, ma soprattutto esteri. Tuttavia nella primavera del 2023 una serie di concause, tra cui l'alluvione di maggio, ha favorito la diffusione massiva del granchio blu (*Callinectes sapidus*) all'interno delle lagune del Delta provocando gravi perdite alle venericolture a causa dell'intensa predazione esercitata da questa specie sia sul seme che sulle taglie commerciali. Nell'immediato gli allevatori sono stati colti impreparati dall'evento improvviso per poi adottare misure di contrasto di difficile applicazione per i numerosi vincoli normativi. Per difendere le produzioni dalla pressione predatoria del granchio blu sono state messe in atto varie soluzioni tecniche, come la realizzazione di serragli e la copertura dei fondali con reti di protezione. In contemporanea è stata organizzata inoltre un'intensa attività di cattura del granchio mediante diversi metodi di pesca. Nella seconda metà del 2023 sono state pescate ed avviate alla distruzione circa 1000 t di granchi blu, quantità che nel 2024 è già stata superata e potrebbe raddoppiare. Nonostante la mancata attivazione di un adeguato monitoraggio finalizzato alla definizione spaziale e quantitativa della diffusione della specie aliena, i dati raccolti confermano che il suo picco demografico non sembra ancora essere stato raggiunto. Allo stato attuale le produzioni hanno subito un calo dell'80-85% con un significativo incremento dei costi dovuti alle misure di protezione e contenimento. La predazione del granchio blu ha inoltre quasi azzerato la funzionalità delle aree di nursery con effetti che si avranno nei prossimi anni. In questo momento formulare una previsione sul futuro della venericoltura italiana è un'impresa quanto mai ardua giacché mancano le informazioni di base sulle reali dimensioni del problema.

## Summary

Clam farming has developed in Italy since the introduction of Manila clam (*Ruditapes philippinarum*), which has been cultivated in the lagoons of the northern Adriatic for the last 40 years. The 1990s saw the peak of this sector with a production of 60-65,000 tonnes/year, mainly from the Venice lagoon. Since then, several problems, such as the loss of productive areas and the reduction in the availability of wild seeds, have led to a decline in production to the current level of 20,000 tonnes, for the most part produced in the lagoons of the Po Delta. These obstacles have been temporarily overcome by hydraulic improvements and the supply of seeds from Italian nurseries and, above all, from abroad. However, in the spring of 2023, some unexpected new events, including the May flood, facilitated the massive invasion of the blue crab (*Callinectes sapidus*) in all the lagoons of the Delta provoking dramatic production losses due to its intense predation on both clam seeds and commercial sizes.

Farmers were unprepared for the suddenness of the event and had to take rapid countermeasures, which were difficult to implement due to numerous legal constraints. The predatory pressure of the blue crab on production was counteracted by various technical solutions, such as building barriers or covering the seabed with protective nets.

At the same time, an intensive crab fishing campaign has been carried out using different fishing techniques. In the second half of 2023, around 1000 tonnes of blue crabs were caught and sent to be destroyed, a quantity that has already been exceeded in 2024, and has the potential to double. Although there has been no adequate monitoring to define the spatial and quantitative distribution of this alien species, the data collected indicate that the population has not yet peaked. At present, clams production has declined by 80-85%, with a significant increase in costs due to protection and containment measures. Blue crab predation has almost completely eliminated the functionality of the clam nursery areas and its effects will continue for several years to come. Predicting the future of Italian clam farming is very difficult due to the lack of basic information on the true extent and evolution of the problem.

## Case study sulla mortalità di mitili avvenuta nel corso del 2023 nell'Adriatico

A. Vetri

Centro Specialistico Ittico - Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Legnaro (PD)

**Keywords:** mitili, *Mytilus galloprovincialis*, mortalità, *Perkinsus olseni*, *Haplosporidium*, Adriatico

### Riassunto

Nell'estate del 2023 è stato registrato un episodio di mortalità anomala in un allevamento di mitili situato al largo dell'isola di Pellestrina (VE), nell'Adriatico nord-occidentale. I mitili (*Mytilus galloprovincialis*) affetti da moria erano allevati long-line e provenivano da seme raccolto e allevato *in loco*. La mortalità registrata negli animali di taglia commerciale è stata del 20% a luglio e ha raggiunto il 70% ad agosto. L'Autorità Competente (ASL 3, Serenissima) ha effettuato due campionamenti composti da soli esemplari moribondi/morti: il primo a fine agosto 2023 (20 esemplari) e il secondo a metà settembre 2023 (30 esemplari) nello stesso sito di allevamento. Ogni esemplare è stato campionato ed analizzato in parallelo con analisi citologiche, istologiche e molecolari. Inoltre, 10 esemplari per ogni campionamento sono stati sottoposti ad analisi batteriologica su omogenato di mantello, ghiandola digestiva e branchie (crescita in Marine Agar e TCBS). Le analisi molecolari sono state eseguite su omogenato di ghiandola digestiva e connettivo periviscerale per: i) identificazione e quantificazione di *P. olseni* mediante qPCR (Rios *et al.*, 2020); ii) regione ITS del rRNA di *P. olseni* (Moss *et al.*, 2006); iii) PCR end point mirata a *Haplosporidium* sp. (metodo interno IZSve). Le analisi citologiche ed istologiche hanno evidenziato nel primo campionamento una grave infestazione di parassiti riferibili a *Perkinus* sp. in 2/20 esemplari (lieve in 3/20) evidente nel tessuto connettivo intorno alla ghiandola digestiva e ai tubuli gonadici. L'analisi molecolare, eseguita mediante qPCR, ha identificato *Perkinsus olseni* in 7/20 esemplari. L'identificazione di *P. olseni* è stata confermata dal sequenziamento della regione ITS che ha mostrato alta somiglianza con *P. olseni* segnalato in mitili allevati nel delta dell'Ebro. L'esame batteriologico ha rivelato la presenza di diverse specie appartenenti al genere *Vibrio* (*V. harveyi*, *V. tubiashii*, *V. alginolyticus*, *V. chagasii*, *Vibrio xuii*, *V. europaeus*). La valutazione istologica del secondo campionamento ha permesso di osservare, oltre alla grave infestazione da *Perkinus* sp. in 8/30 esemplari, anche la presenza di *Haplosporidium* sp., evidente negli spazi emolinfatici del tessuto connettivo intorno alla ghiandola digestiva e ai tubuli gonadici, alle branchie e al tessuto muscolare in 5/30 esemplari. Le analisi filogenetiche hanno dimostrato che le sequenze ottenute da mitili infettati da *Haplosporidium* clusterizzavano con *Haplosporidium* sp. identificato nel gasteropode *Haliotis iris*. Questa è la prima segnalazione della presenza di *Perkinsus olseni* in mitili (*Mytilus galloprovincialis*) allevati in Mare Adriatico settentrionale associata a un evento di mortalità e sottolinea la presenza ricorrente di *Haplosporidium* sp., già segnalato negli anni precedenti, che causa moria stagionale (fine estate - inizio autunno) nei mitili allevati in quest'area.

### Summary

An abnormal mortality episode affecting a mussel farm, located off Pellestrina island (VE) in North-Western Adriatic Sea, was recorded during summer 2023. Affected *Mytilus galloprovincialis* were farmed in long-lines and were obtained from seed collected and bred locally. The recorded mortality was 20% in July and reached 70% in August in marketable-size mussels. Samplings of mussels was carried out in by the Competent Authority consisting of only moribund/dead specimens collected in late August 2023 (20 specimens) and mid-September 2023 (30 specimens) from the same farming site. Each specimen was sampled in parallel for cytological, histological and molecular analyses. Moreover 10 specimens for each sampling were subjected to bacteriological analysis from homogenate of mantle, digestive gland, and gill (growth in Marine Agar and TCBS). Molecular analyses were performed on homogenate of digestive gland and perivisceral connective for: i) identification and quantification of *P. olseni* by qPCR (Rios *et al.*, 2020); ii) ITS region of the *P. olseni* rRNA gene complex (Moss *et al.*, 2006); iii) End point PCR targeting *Haplosporidium* sp. (in-house method). Cytology and histology highlighted in the first sampling severe presence of parasite referable to *Perkinus* sp. in 2/20 specimens (mild in 3/20) apparent in the connective tissue around digestive gland and gonadic tubules. Molecular analysis, performed by qPCR, identified *Perkinsus olseni* in 7/20 specimens. *P. olseni* identification was confirmed by sequencing of the ITS region showing highest similarity with *P. olseni* from mussels collected from Ebro delta. Bacteriological examination revealed several species belonging to the genus *Vibrio* (*V. harveyi*, *V. tubiashii*, *V. alginolyticus*, *V. chagasii*, *Vibrio xuii*, *V. europaeus*). Histological evaluation of the second sampling revealed together with severe presence of *Perkinus* sp. in 8/30 specimens also presence of *Haplosporidium* sp., apparent in the hemolymphatic spaces in the connective tissue around digestive gland and gonadic tubules, gills and muscle, in 5/30 specimens. Sequences obtained from *Haplosporidium* infected mussels clustered with *Haplosporidium* sp. identify in the gastropod *Haliotis iris*. This is the first description of *Perkinsus olseni* infection in mussels (*Mytilus galloprovincialis*) in Northern Adriatic Sea associated with mortality event and provides recurrent evidence of *Haplosporidium* sp. infection causing seasonal mortality (late summer - early autumn).

# INDICE PRIMO AUTORE

Antonini A.	<i>Azienda Sanitaria Territoriale Ascoli Piceno, specialista ICPPA</i>	14
Arcangeli G.	<i>Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie – Legnaro (PD)</i>	84
Bacchiocchi S.	<sup>1</sup> <i>Unità Operativa Specialistica - Laboratorio Contaminanti Organici, Inorganici e Biotossine Algali - Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche "Togo Rosati" - Via Cupa di Posatora 3, 60131 Ancona (AN)</i> <sup>2</sup> <i>CRN 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)</i>	18
Bolognini L.	<i>GFCM – General Fisheries Commission for the Mediterranean</i>	85
Brundu G.	<i>Centro Marino Internazionale – IMC, Loc. Sa Mardini 09170, Torregrande, Oristano</i>	20
Carella F.	<i>Dipartimento di Biologia, università degli studi di Napoli Federico II, Via Cinthia, Complesso di MSA</i>	22, 86
Casarotto C.	<i>Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie – Legnaro (PD)</i>	24
Chiappi M.	<sup>1</sup> <i>Department of Biological, Geological and Environmental Sciences (BIGEA), University of Bologna (UNIBO), Bologna</i> <sup>2</sup> <i>National Research Council (CNR), Institute for Biological Resources and Marine Biotechnologies (IRBIM), Ancona</i> <sup>3</sup> <i>NBFC, National Biodiversity Future Center, Palermo</i>	87
Coppini G.	<i>CMCC Centro euromediterraneo sui cambiamenti climatici</i>	88
Cordovani E.	<i>Azienda Sanitaria Territoriale Pesaro Urbino - ASTPU</i>	26
De Marco V.	<i>Department of Veterinary Medical Sciences, University of Bologna, Via Tolara di Sopra 50, 40064, Ozzano Emilia, Bologna</i>	29
De Simoni C.	<i>Veterinaria specialista ICPPA</i>	31
Di Taranto P.	<i>Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Puglia e della Basilicata – Foggia</i>	37
D'Onofrio C.	<i>Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie – Legnaro (PD)</i>	39
Esposito M.	<i>Centro di Referenza Nazionale per l'Analisi e Studio di Correlazione tra Ambiente, Animale e Uomo, IZSM – Portici, Napoli</i>	41
Ferro L.	<i>Fondazione Fai Cisl Studi e Ricerche – Università di Padova</i>	89
Franzago E.	<i>Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie – Legnaro (PD)</i>	43
Gavioli A.	<i>Università di Ferrara – Dipartimento di Scienze dell'Ambiente e della Prevenzione</i>	90

Gentili S.	<i>Veterinaria specialista ICPPA</i>	47
Ippoliti D.	<i>Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia-Romagna – Bologna</i>	54
Lanci L.	<i>Facoltà di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Teramo</i>	56
Locci C.	<sup>1</sup> <i>Dipartimento di Medicina Veterinaria, Università di Sassari, Via Vienna 2, 07100 Sassari</i> <sup>2</sup> <i>Dipartimento di Scienze Biomediche, Università di Sassari, Viale San Pietro 43b, 07100 Sassari</i>	58
Lucidi E.	<i>Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche “Togo Rosati” - Via Cupa di Posatora 3, 60131 Ancona (AN)</i>	61
Mikac B.	<i>Università degli Studi di Bologna - Dipartimento di Beni Culturali Settore scientifico disciplinare: BIOS-05/A Ecologia</i>	91
Muresu Ibba G.	<i>Ausl Reggio Emilia - SSPV -Dipartimento Igiene Alimenti Origine Animale</i>	63
Pandolfo D.	<i>Azienda ULSS n.3 Serenissima - Dipartimento di Prevenzione - Dipartimento funzionale di sanità pubblica veterinaria e sicurezza alimentare</i>	92
Peruzza L.	<i>Dipartimento di Biomedicina Comparata ed Alimentazione, Università degli Studi di Padova, Viale dell'Università 16, 35020 Legnaro</i>	66
Petochi T.	<i>Istituto Superiore per la Protezione e la Ricerca Ambientale (ISPRA), Roma</i>	93
Pretto T.	<i>Centro Specialistico Ittico - Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Legnaro (PD)</i>	94
Rubini S.	<i>Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna – Ferrara</i>	67
Sanna D.	<i>Dipartimento di Scienze Biomediche, Università degli Studi di Sassari, Viale San Pietro 43b, 07100 Sassari, Italia</i>	69
Scarpa F.	<i>Dipartimento di Scienze Biomediche, Università degli Studi di Sassari, Viale San Pietro 43b, 07100 Sassari, Italia;</i>	72,74
Schiavon E.	<i>Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Legnaro (PD)</i>	76
Sussarellu R.	<i>IFREMER Centre Atlantique (Francia)</i>	96
Talevi G.	<i>Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche – Ancona</i>	78
Turolla E.	<i>Istituto Delta Ecologia Applicata srl – Ferrara (FE)</i>	97
Vetri A.	<i>Centro Specialistico Ittico - Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Legnaro (PD)</i>	98
Vollaro T.M.	<i>Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia-Romagna “Bruno Umbertini” – Bologna</i>	80

## CONTATTI MAIL DEI RELATORI (primo autore)

### Relazioni ad invito

Giuseppe Arcangeli (IZSve) [garcangeli@izsvenzie.it](mailto:garcangeli@izsvenzie.it)

Luca Bolognini (CNR-IRBIM) [luca.bolognini@irbim.cnr.it](mailto:luca.bolognini@irbim.cnr.it)

Francesca Carella (UNINA) [francesca.carella@unina.it](mailto:francesca.carella@unina.it)

Marina Chiappi (CNR-IRBIM) [marina.chiappi@irbim.cnr.it](mailto:marina.chiappi@irbim.cnr.it)

Giovanni Coppini (CMCC - centro euro-mediterraneo sui cambiamenti climatici) [giovanni.coppini@cmcc.it](mailto:giovanni.coppini@cmcc.it)

Ludovico Ferro (UNIPD) [ludovico.ferro@unipd.it](mailto:ludovico.ferro@unipd.it)

Piergiorgio Fumelli (Az. ULSS 3 e 5 Veneto) [piergiorgio.fumelli@aulss5.veneto.it](mailto:piergiorgio.fumelli@aulss5.veneto.it)

Anna Gavioli (UNI Ferrara) [anna.gavioli@unife.it](mailto:anna.gavioli@unife.it)

Barbara Mikac (UNIBO) [barbara.mikac@unibo.it](mailto:barbara.mikac@unibo.it)

Dario Pandolfo (Az. ULSS 3 e 5 Veneto) [dario.pandolfo@aulss3.veneto.it](mailto:dario.pandolfo@aulss3.veneto.it)

Tommaso Petochi (ISPRAMBIENTE) [tommaso.petochi@isprambiente.it](mailto:tommaso.petochi@isprambiente.it)

Tobia Pretto (IZSve) [tpretto@izsvenzie.it](mailto:tpretto@izsvenzie.it)

Francesco Regoli (UNIVPM) [f.regoli@univpm.it](mailto:f.regoli@univpm.it)

Emanuele Rossetti (Consorzio Coop. Pescatori del Polesine - Consorzio Con.1) [rossetti@consorzioscardovari.it](mailto:rossetti@consorzioscardovari.it)

Rossana Sussarellu (IFREMER) [rossana.sussarellu@ifremer.fr](mailto:rossana.sussarellu@ifremer.fr)

Edoardo Turolla (Istituto Delta Ecologia Applicata SRL) [veliger@istitutodelta.it](mailto:veliger@istitutodelta.it)

Alessia Vetri (IZSve) [avetri@izsvenzie.it](mailto:avetri@izsvenzie.it)