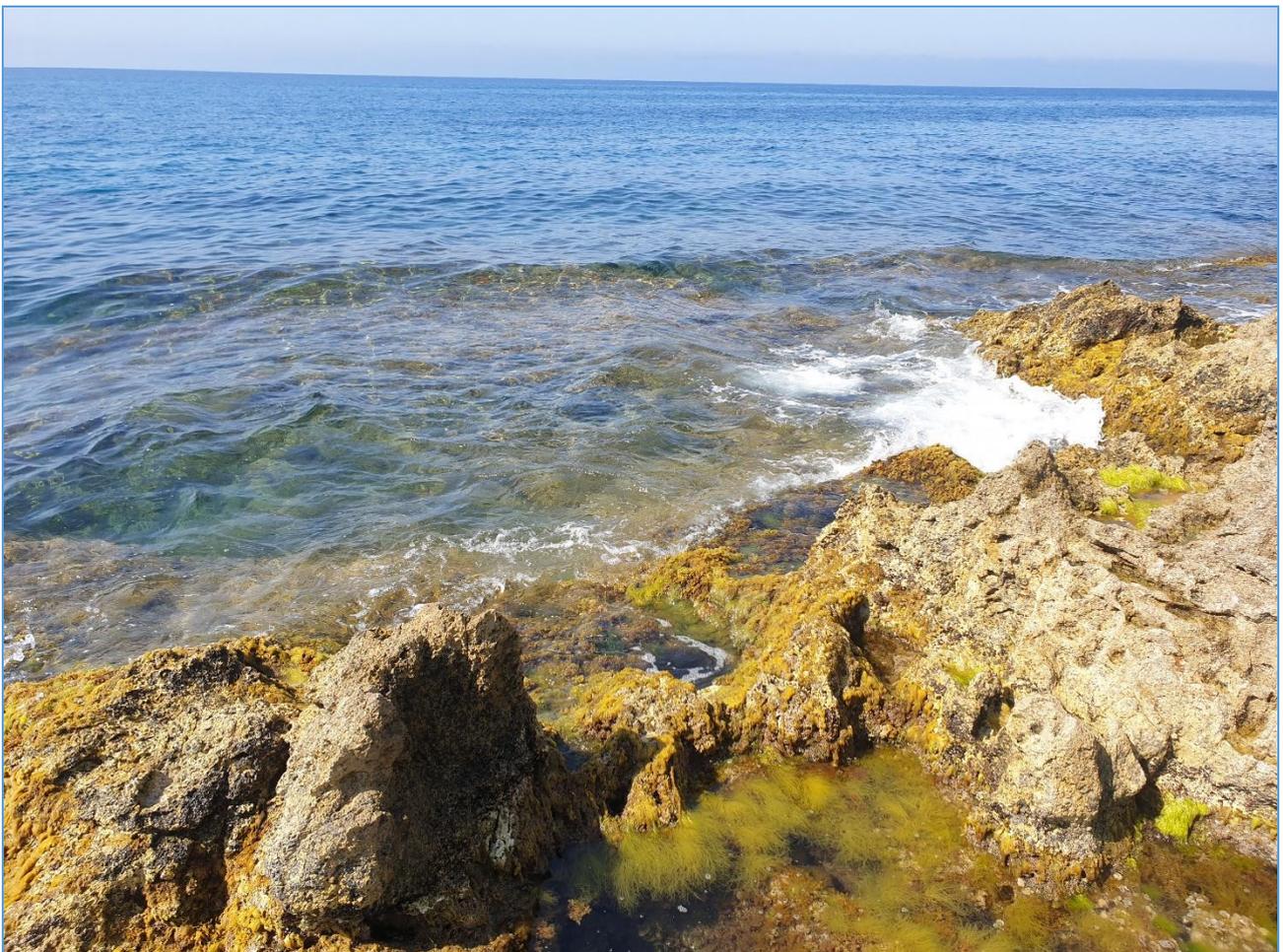


Piano di monitoraggio sperimentale di *Ostreopsis cf. ovata* e *Ostreopsis sp.p.* con metodo della siringa

Anno 2020 - Report finale



Documento realizzato da:

ARPA Lazio - Dipartimento stato dell'ambiente - Servizio monitoraggio delle risorse idriche

Dott. Marco Le Foche (dirigente responsabile)

Relazione a cura delle Dott.sse Antonella Giorgio e Elena Madeo

hanno contribuito,

per l'Unità risorse idriche di Roma:

Dott. Marco Lombardo (dirigente) e Dott.ssa Simona Calvanella

Per l'Unità risorse idriche di Latina:

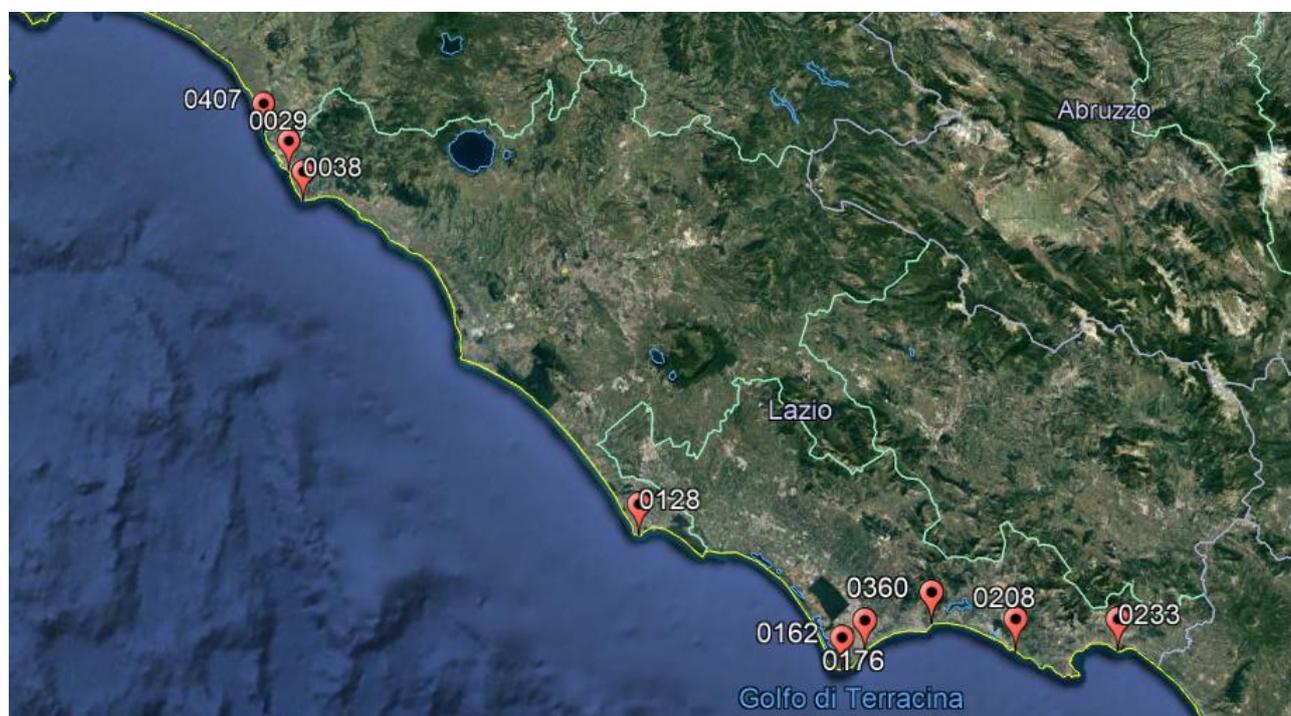
Dott.ssa Laura Aguzzi (dirigente) e Dott.ssa Ornella Chiapponi

1. Introduzione

Nell'ambito delle attività di sorveglianza di microalghe potenzialmente tossiche per l'idoneità delle acque di balneazione (D.lgs. n.116/08 e al Decreto Interministeriale del 30/03/2010, modificato dal Decreto del Ministero della Salute del 19.04.2018) l'ARPA Lazio nel 2020 ha condotto un piano di monitoraggio sperimentale con il metodo della siringa (ISPRA, Quaderni - Ricerca Marina n. 5/2012) aggiuntivo alle attività routinarie. Al fine di valutarne l'applicabilità e il vantaggio operativo, sono state prese in considerazione tutte le 9 stazioni disposte lungo il litorale laziale e ricadenti nelle province di Latina e Roma (ortofoto 1 e tabella 1). I prelievi sono stati condotti da giugno a settembre 2020, con frequenza quindicinale nelle fasi di routine e settimanale nelle fasi di allerta ed emergenza. In condizioni critiche (mare mosso, forte vento), il campionamento con il metodo della siringa è stato omesso per questioni di sicurezza. Le analisi microscopiche si sono basate sull'identificazione ed il conteggio dei dinoflagellati potenzialmente tossici *Ostreopsis cf. ovata*, *Prorocentrum lima*, *Coolia monotis* e *Amphidinium* sp.

Il metodo suppletivo rispetto a quello tradizionale, viene applicato per dimostrarne i vantaggi in termini di praticità ed utilità e per poter seguire la variabilità spaziale e temporale della proliferazione di *O. cf. ovata* e *Ostreopsis* sp.p. in un'area anche vasta, senza essere vincolati alla scelta di un solo tipo di substrato per tutti i siti (ad esempio una macroalga può essere più abbondante o frequente in un'area ma non in un'altra, e spesso non è rappresentativa o addirittura presente per tutto il periodo di osservazione).

Il numero totale di campionamenti condotti nel 2020 dall'ARPA Lazio è pari a 176 per la provincia di Latina e 134 per l'area della Città metropolitana di Roma.



Ortofoto 1: Stazioni di campionamento del programma di sorveglianza algale delle acque di balneazione lungo la costa laziale. Anno 2020.

Codice Punto	Comune	Descrizione	ID Acqua di balneazione	Coordinate (gradi decimali)
0407	Civitavecchia	Torre Sant' Agostino	IT012058032008	42.155944° 11.734056°
0029	Civitavecchia	Stabilimento Bagni Pirgo	IT012058032003	42.086128° 11.799765°
0038	S. Marinella	Capo Linaro	IT012058097004	42.029349° 11.837659°
0128	Anzio	350 m sx molo est Anzio	IT012058007006	41.444362° 12.626194°
0162	S. Felice Circeo	550m sx Faro di Torre Cervia	IT012059025002	41.221919° 13.068983°
0176	S. Felice Circeo	Colonia Marina	IT012059025010	41.249825° 13.119867°
0360	Terracina	Foce Acque Alte	IT012059032011	41.295297° 13.268456°
0208	Sperlonga	Località Bazzano	IT012059030007	41.249869° 13.44995°
0233	Formia	Porto Romano	IT012059008005	41.247667° 13.674872°

Tabella 1: Stazioni di campionamento del programma di sorveglianza algale delle acque di balneazione lungo la costa laziale. Anno 2020.

2. Materiali e Metodi

I campionamenti sono stati eseguiti applicando il "Metodo della siringa" (ISPRA, Quaderni - Ricerca Marina n. 5/2012 - ISBN 978-88-448-05586 – Capitolo 2). Per rendere più agevole e precisa l'aspirazione del volume d'acqua prestabilito (20 ml) anche in condizioni di scarsa visibilità, la siringa è stata opportunamente modificata come segue (Fig. 1):

- Il puntale della siringa è stato tagliato in modo da avere un foro di aspirazione di circa 20 mm².
- Il limite di 20 ml è stato fissato inserendo un blocco (chiodino) sulla siringa in corrispondenza del volume stabilito.



Figura 1: Siringa modificata

Come da protocollo sono state prelevate tre repliche (1-2-3) per stazione, rappresentative del substrato presente nella stazione in esame. Ogni replica è costituita da 3 prelievi da 20 ml (A-B-C) per un totale di 60 ml a replica. (Fig. 2)

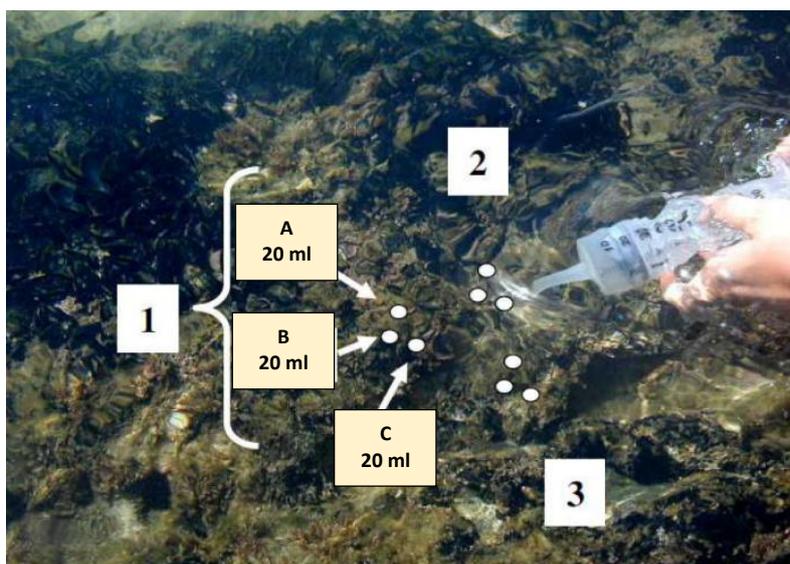


Figura 2: Schema di Campionamento: 3 repliche a stazione (1-2-3), di cui ognuna costituita da 3 prelievi da 20 ml (A-B-C). (fonte: ISPRA, Quaderni - Ricerca Marina n. 5/2012)

Il primo prelievo è stato effettuato in un punto A, all'interno dell'area scelta in base alla tipologia di substrato presente. L'aspirazione dei 20 ml di liquido è stata eseguita mantenendo la siringa leggermente inclinata rispetto alla superficie del substrato per non occludere completamente il puntale. Dopo l'aspirazione la siringa viene tenuta rivolta verso l'alto per evitare che le cellule si accumulino sui bordi interni dello stantuffo;

i 20 ml sono stati poi trasferiti in piccoli contenitori di vetro scuro opportunamente etichettati.

Nella stessa area (REPLICA 1) sono stati aspirati 20 ml di acqua in altri due punti B e C, posizionati in prossimità del primo prelievo A e svuotati nello stesso contenitore in modo da ottenere un campione di 60 ml (20+20+20) a replica.

Prima di procedere al prelievo nelle altre aree individuate, si è proceduto a sciacquare più volte la siringa.

In ogni sito sono state eseguite tre repliche sullo stesso substrato o su substrati diversi, al fine di valutare eventuali differenze nella colonizzazione da parte del dinoflagellato bentonico.

In ogni campione (di 60 ml) è stato aggiunto 1 ml di Lugol diluito al 25% con acqua di mare filtrata (Fig.3).

Il campione è stato poi conservato al buio e al fresco in contenitori termici.



Figura 3: Fasi preparative del campione; a sinistra contenitori in vetro scuro e a destra fissazione in campo dei campioni raccolti.

In laboratorio si è proceduto al conteggio dei campioni, utilizzando il metodo Utermöhl (UNI EN 15204:2006) modificato come segue. Dopo l'omogeneizzazione del campione si è proceduto immediatamente al prelievo di 2,5 ml di campione a circa un terzo dal fondo. Le subaliquote sono state versate direttamente nella camera di sedimentazione (volume di 2,5 ml), lasciando sedimentare il campione nella vaschetta aperta per circa mezz'ora. Il conteggio è stato effettuato al microscopio ottico invertito con obiettivo 10x su due transetti di lunghezza pari al diametro della camera di sedimentazione e perpendicolari uno all'altro.

Per il calcolo della densità microalgali presenti nel campione è stata applicata la seguente formula:

$$S = (N \cdot \pi \cdot r) / (2 \cdot h \cdot v \cdot n)$$

Dove:

S = densità espressa come cell/ml syr (numero di cellule per ml di campione di siringa)

N = totale del numero di cellule contate su tutti i transetti

π = pi greco

r = raggio (in mm) della camera di sedimentazione

h = altezza (in mm) del transetto orizzontale o larghezza del transetto verticale

v = ml di campione messi a sedimentare

n = numero di transetti sui quali si è effettuato il conteggio

Per la diversa natura del campionamento, i valori ottenuti con questo metodo non sono direttamente equiparabili a quelli del campionamento in colonna d'acqua, anche se le unità di misura coincidono.

Il campionamento però risulta rappresentativo della concentrazione del dinoflagellato bentonico sul fondo e sui differenti substrati.

Di seguito si mostrano alcune foto delle microalghette effettuate al microscopio ottico invertito.

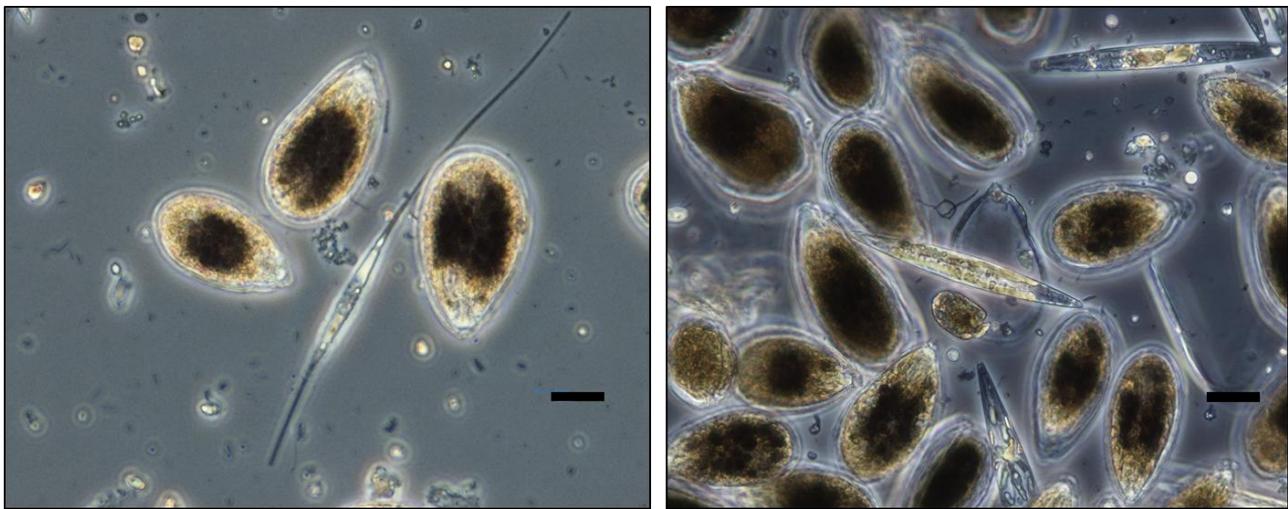


Figura 4: Fotografie scattate al microscopio ottico invertito (ingrandimento 40X; barra 15 μ m).

3. Risultati

Nel grafico 1 vengono riportati i valori di concentrazione di *O. cf. ovata* (cell/l) nei vari campioni analizzati; si omettono i risultati delle altre specie microalgali poiché solo le concentrazioni di *O. cf. ovata* sono utilizzate per determinare i limiti delle fasi di allerta ed emergenza per la sorveglianza algale. Sono messi a confronto i risultati derivanti dalla lettura dei campioni di acqua e quelli relativi all'analisi dei campioni prelevati con il metodo della siringa. Per facilità di rappresentazione i valori di concentrazione sono espressi in scala logaritmica e i risultati delle letture con metodo della siringa espressi in cell/l anziché in cell/ml syr, come da protocollo.

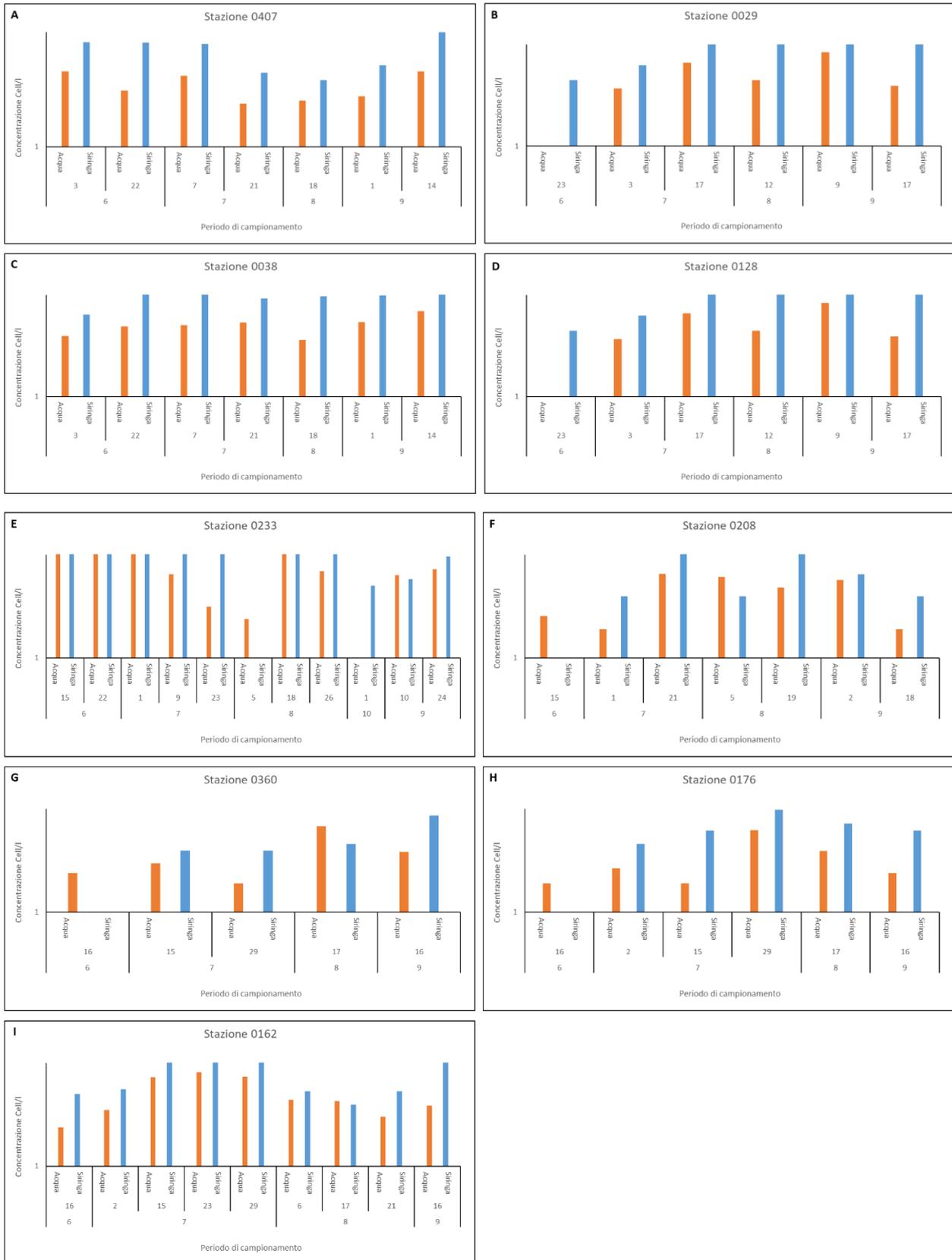


Grafico 1: Confronto tra le concentrazioni di *O. cf. ovata* nei campioni di acqua e di siringa. A-D stazioni nell'area della Città metropolitana di Roma; E-I stazioni della provincia di Latina (■ cell/l acqua; ■ cell/l siringa).

Il confronto tra le due classi di valori mostra una chiara correlazione tra le concentrazioni di *O. cf. ovata* misurate nei campioni di acqua e di siringa con valori di concentrazioni generalmente più alti nei campioni di siringa. Tale situazione è ben evidenziabile nei campioni prelevati nelle stazioni della Città metropolitana di Roma (Grafico 1 A-D) per tutto il periodo di monitoraggio dove la situazione per l'anno 2020 è sempre rientrata nella fase di routine, fatto salvo un paio di eventi di allerta. A tali osservazioni si aggiunge l'evento del 23 giugno per la stazione 0128 di Anzio; dal grafico si evidenzia che nel campione prelevato con il metodo della siringa è presente *O. cf. ovata*, anche quando questa non era stata rilevata nel campione d'acqua.

Nei campioni della provincia di Latina, oltre alla correlazione tra le due tipologie di campioni, si evidenzia, in alcuni casi, una situazione opposta: ovvero concentrazioni di *O. cf. ovata* maggiori nel campione d'acqua rispetto alla siringa (Grafico 1 E-I); in particolare nella stazione 0360, campionamento del 17 agosto 2020, dove il valore di *O. cf. ovata* nel campione di acqua ha quasi raggiunto il limite di allerta sanitaria pari a 8140 cell/l e nelle stazioni 0233 (5 agosto), 0208 (15 giugno, 5 agosto), 0360 (16 giugno), 0176 (16 giugno) e 0162 (17 e 31 agosto). Nella stazione 0233, dove i valori di concentrazione della microalga nei campioni di acqua e siringa sono elevati durante tutta la stagione balneare, l'applicazione del metodo della siringa sembra non essere di aiuto in quanto le concentrazioni del dinoflagellato superano solitamente i limiti consentiti dalla normativa e tendono al raggiungimento della fase di emergenza.

Nel grafico 2 si riporta il confronto tra i valori di concentrazione di *O. cf. ovata* (cell/l) nei campioni di siringa e quelli rinvenuti invece nei campioni di macroalga (cell/g peso fresco), al fine di valutare il potenziale utilizzo del metodo della siringa in sostituzione del metodo della macroalga.

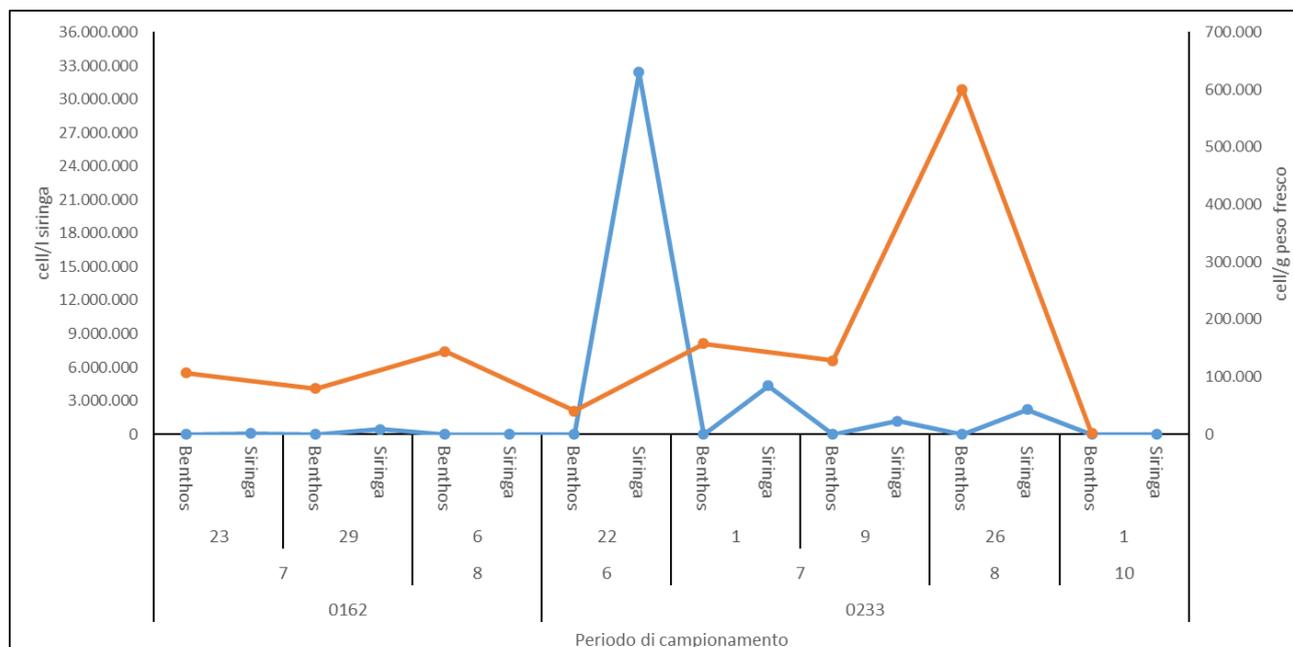


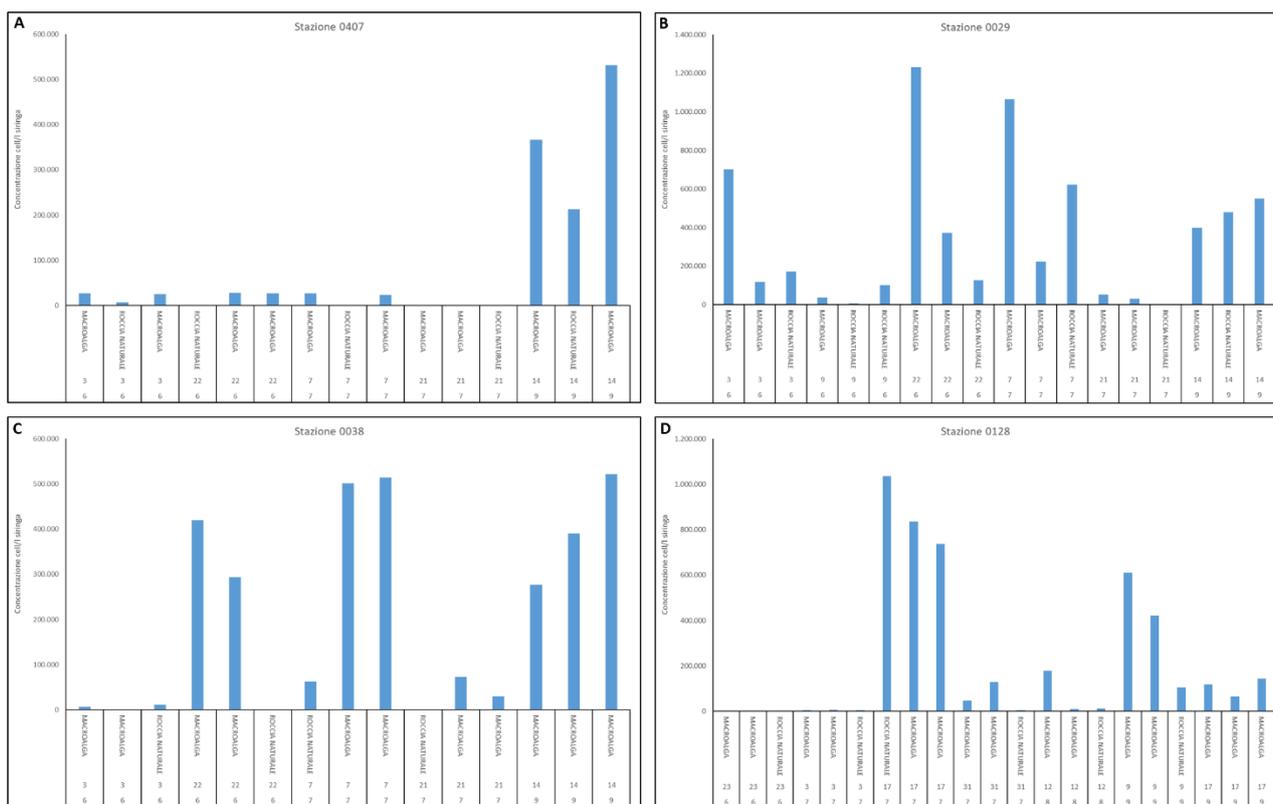
Grafico 2: Confronto tra le concentrazioni di *O. cf. ovata* nei campioni di benthos e di siringa nelle stazioni monitorate (■ cell/l siringa; ■ cell/g peso fresco).

Dal confronto tra le concentrazioni di *O. cf. ovata* emerge che la siringa risulta rappresentativa al pari del metodo classico in specifiche situazioni sperimentali, come verificato nella stazione 0233, dove i livelli di concentrazione seguono lo stesso trend e il metodo della siringa potrebbe sostituire totalmente quello classico, considerato inoltre che nel sito non sono presenti macroalghe erette e vengono campionati, come substrato, briozoi ricoperti da patina algale (substrato elettivo della microalga tossica).

In altri casi, come per la stazione 0162, poiché, per questioni tecniche, non è stato applicato il metodo della siringa nello stesso microhabitat dove sono state prelevate le macroalghe, il confronto tra i due metodi ha mostrato scarsa correlazione.

In particolare, in questa stazione, l'applicazione del metodo della siringa ha dimostrato che la macroalga eretta risulta essere substrato elettivo del dinoflagellato bentonico.

Uno dei vantaggi del metodo della siringa è quello di poter campionare substrati diversi nella stessa area; tale aspetto ha permesso di analizzare la correlazione tra substrato e concentrazioni di *O. cf. ovata*. Nel grafico 3 si riporta il confronto tra i valori di concentrazione di *O. cf. ovata* (cell/l) nei campioni di siringa prelevati sui diversi substrati presenti nelle stazioni monitorate; non sono riportati i dati delle stazioni 0233, 0360 e 0176, nelle quali è stata campionata sempre l'unica tipologia di substrato presente.



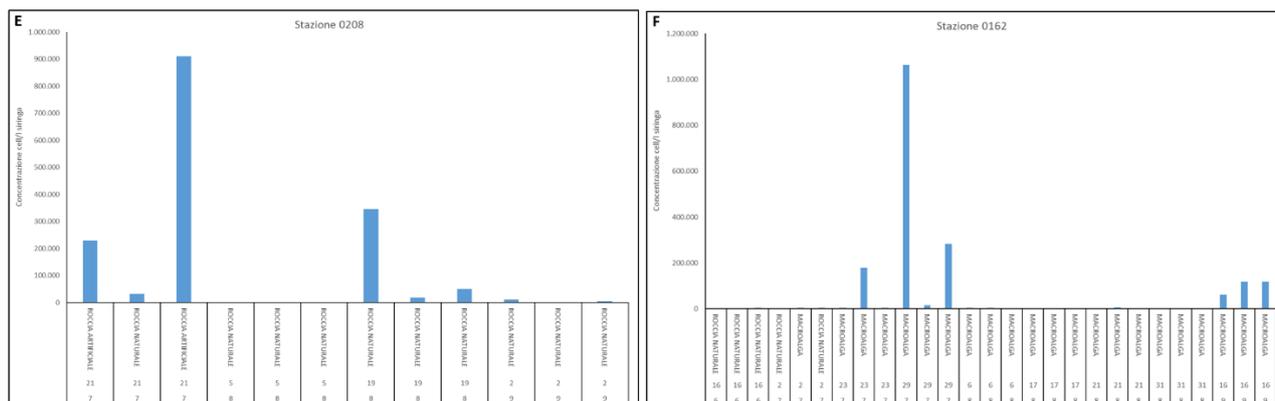


Grafico 3: Confronto tra le concentrazioni di *O. cf. ovata* nei campioni di siringa prelevati su diversi substrati (A-D stazioni nell'area della Città metropolitana di Roma; E-F stazioni della provincia di Latina).

Nelle stazioni di Roma sono stati utilizzati quali substrati di campionamento sia rocce naturali (ricoperte o meno da feltro algale), sia macroalghe. Dal confronto emerge per le stazioni 0038, 0128 e 0407 una maggior colonizzazione di *O. cf. ovata* sul substrato macroalgale, in quanto *O. cf. ovata* si addensa preferibilmente tra le sue ramificazioni. Nella stazione 0128 e in un punto della stazione 0029 la roccia naturale risulta quasi sempre ricoperta da abbondante feltro algale e la macroalga poco rappresentativa; inoltre, entrambi i siti evidenziano impatto antropico e come conseguenza diretta di tali situazioni vi è una maggiore colonizzazione del substrato roccioso da parte del dinoflagellato *O. cf. ovata*.

Anche nella provincia di Latina risulta evidente che, in presenza di rocce naturali colonizzate da macroalghe erette, il dinoflagellato bentonico predilige la macroalga al substrato roccioso, addensandosi tra le sue ramificazioni (stazione 0162). Nella maggior parte delle stazioni della provincia di Latina sono presenti rocce artificiali nude, ricoperte spesso da feltro algale. Nel caso particolare della stazione 0208, la roccia naturale nuda (non ricoperta da macroalga) coesiste insieme alla roccia artificiale ricoperta da feltro algale ed i risultati dei campionamenti evidenziano una preferenza della microalga per la roccia artificiale a discapito di quella naturale.

4. Conclusioni e Discussioni

Le attività svolte nell'ambito del programma sperimentale basato sull'applicazione del metodo della siringa hanno permesso di valutare la necessità di un operatore specializzato anche durante le fasi del campionamento, che sappia interpretare le caratteristiche del sito e di conseguenza identificare le aree da prediligere per l'applicazione del metodo della siringa. Il campionamento, infatti, deve essere correttamente effettuato al fine di garantirne la buona riuscita e la corretta interpretazione del dato da parte dell'operatore che dovrà analizzare i campioni in laboratorio.

Il metodo presenta vantaggi in termini di tempo, di praticità e di utilità, in quanto permette di eseguire il campionamento di più siti e più substrati in una stessa area di indagine. In particolare:

1. i tempi previsti per il campionamento sono dell'ordine di pochi minuti; l'area di campionamento va individuata escludendo i punti in cui sia stato rimosso il fondo e prediligendo il feltro algale e il substrato duro. Il prelievo risulta facilitato anche in condizioni di scarsa visibilità. Il metodo riduce notevolmente anche i tempi analitici di laboratorio, risultando particolarmente utile nelle fasi di emergenza e allerta quando è necessario fornire nel più breve tempo possibile un risultato attendibile.
2. Il materiale da trasportare è costituito da piccoli contenitori (che possano contenere i 60 ml di ogni replica).
3. Le informazioni ottenute riflettono, in maniera più precisa, le situazioni naturali al momento del prelievo. Il metodo classico prevede il campionamento dello stesso substrato (macroalga) che potrebbe non essere abbondante o frequente in tutte le aree ed in tutto il periodo di osservazione, risultando quindi poco rappresentativo. Inoltre *O. cf. ovata* talvolta si addensa tra le ramificazioni della macroalga (ad es. in *Dictyota dichotoma*). Altre volte, in condizioni di calma piatta del mare, forma una ragnatela di filamenti che ricoprono la superficie globosa del tallo (ad es. in *Halopteris scoparia*). In entrambi i casi riportare l'abbondanza di *O. cf. ovata* al peso (sia secco che fresco) può essere fuorviante.
4. Il metodo, essendo non distruttivo, permette di campionare *O. cf. ovata* anche su roccia nuda, senza dover asportare le superfici rocciose (come da metodo classico), evitando inoltre una risospensione di materiale che renderebbe più alto il rischio di perdere gli organismi.
5. Questo metodo permette di campionare anche su feltro algale, costituito da piccoli talli molto fitti in cui si deposita sostanza organica, sedimento fine o sabbia e in mezzo al quale *O. cf. ovata* frequentemente si sviluppa.
6. Il metodo è stato confrontato con quello "classico" su un totale di 33 campionamenti effettuati con entrambi i metodi, in due areali differenti del Mediterraneo (Mar Ligure e Adriatico Meridionale). La correlazione dei dati ottenuti con entrambi i metodi è molto alta, con pattern spaziali e temporali sovrapponibili. Inoltre questo metodo è già utilizzato nel monitoraggio da Arpa Calabria e Arpa Puglia.

Le attività condotte durante la stagione balneare 2020 ed il confronto tra i metodi applicati hanno consentito di concludere, in prima analisi, quanto segue:

- generalmente i campioni prelevati con il metodo della siringa hanno sempre valori più alti rispetto all'acqua, in accordo con la natura bentonica della microalga che vive, infatti, adesa al substrato. Inoltre, in condizioni particolari come ad esempio mareggiate e calpestio, si assiste al distacco della microalga dal substrato con conseguente risospensione in acqua. In questi casi si avranno concentrazioni di *O. cf. ovata* maggiori nel campione d' acqua rispetto alla siringa.
- L'utilizzo del metodo della siringa, congiuntamente al prelievo dell'acqua, potrebbe essere di grande aiuto in quelle stazioni coinvolte da cicli stagionali di fasi di routine ed allerta, dovuti alle caratteristiche intrinseche alla stazione stessa (condizioni microclimatiche, ecologiche e fruizione dell'area), per valutarne gli andamenti.
- Il metodo della siringa, in quanto non distruttivo, ha permesso di campionare anche su roccia nuda e su feltro algale. Per le stazioni 0208 e 0162, quest'ultima interessata da fasi di allerta, la possibilità di campionare substrati diversi ha permesso di comprendere quale fosse il substrato interessato maggiormente dalla crescita algale e quindi ha permesso di escludere, come nel caso della stazione 0162, che le concentrazioni alte di *O. cf. ovata* nell'acqua derivassero da pozze interne, formate in seguito a forti mareggiate. Per la stazione 0208, la possibilità di campionare substrati diversi, roccia naturale nuda e roccia artificiale ricoperta da feltro algale, ha permesso di individuare in quest'ultimo il substrato elettivo di *O. cf. ovata*. Nella stazione 0128 è più significativo il campionamento su roccia naturale rispetto a quello effettuato su macroalga, tra l'altro non sempre presente.

Il metodo potrebbe, inoltre, essere applicato in alternativa alla macroalga, dove questa non è presente, o eventualmente potrebbe essere scelto per il campionamento del benthos, tenendo conto che si tratta di un metodo semi-quantitativo in quanto i valori di abbondanza cellulare che si ottengono non sono riferibili né ad un'unità di peso né alla superficie del substrato campionato, ma è comunque un metodo speditivo che presenta molti vantaggi.