

STUDIO SULLA PROLIFERAZIONE DI OSTREOPSIS OVATA LUNGO IL LITORALE COSTIERO CAMPANO - ATTIVITÀ 2020

| |
|-----------------------------------------------------------------------------------|
| U |
| ARPA CAMPANIA Agenzia Regionale per la Protezione dell'Ambiente della Campania |
| COPIA CONFORME ALL'ORIGINALE DIGITALE |
| Protocollo N.0039993/2021 del 30/06/2021 Firmatario: LUCIO DE MAIO |

Gruppo di lavoro

- **U.O. Mare – Direzione Tecnica**

Dirigente Responsabile - Dott. Lucio De Maio

Collaboratori tecnici professionali – campionamenti, elaborazione dati, relazioni tecniche.

Dott. Stefano Capone

Dott. Ciro Pignalosa

Dott. Andrea Celentano

Dott. Dario Monaco

Dott. Fabrizio D'Apice

Dott. Rosario Carbone

Dott.ssa Emma Lionetti

- **U.O. Laboratorio Regionale Mare - Area Analitica Napoli – Dipartimento di Napoli**

Dirigente Responsabile - Dott.ssa Maria Grazia Aquila

Collaboratori tecnico professionali - Analisi di laboratorio, elaborazione dati, relazioni tecniche

Dott.ssa Anna Montanino

Dott. Salvatore De Filippo

Dott. Silvestro Lubrano Lavadera

- **Università di Napoli “Federico II” - Dipartimento di Farmacia – Gruppo MarBioTox**

Responsabile Scientifico - Prof.ssa Carmela Dell'Aversano, Professore Ordinario di Chimica Analitica

Responsabile Tecnico - Prof.ssa Luciana Tartaglione, Professore Associato di Chimica Organica

Operatore di laboratorio – Dott. Fabio Varriale, Dottorando di Ricerca in Scienza del Farmaco

Ringraziamenti: ARPA Campania: Rosaria D'Arenzio – Resp. Unità Operativa Acque Interne e Marino Costiere (Area Territoriale del Dipartimento Provinciale di Salerno); (Maria Luisa Gallo) – Resp. Unità Operativa Acque Interne e Marino Costiere (Area Territoriale del Dipartimento Provinciale di Napoli); il personale afferente alle Unità Operativa Acque Interne e Marino Costiere dei Dipartimenti Provinciali di Napoli e Salerno.

U
ARPA CAMPANIA
Agenzia Regionale per la Protezione dell'Ambiente della Campania
COPIA CONFORME ALL'ORIGINALE DIGITALE
Protocollo N.0039993/2021 del 30/06/2021
Firmatario: LUCIO DE MAIO

1. Introduzione

In applicazione del Piano Regionale Integrato e nel rispetto dei criteri sanciti dallo stesso d.lgs. n.116/08, l'ARPAC con nota n. 29931/2020 del 16/06/2020 ha trasmesso alla Regione il piano di monitoraggio annuale sulla gestione del rischio associato alle fioriture di *Ostreopsis cf. ovata* lungo il litorale costiero campano.

Tale piano, coerentemente alla rimodulazione del 2017, assicura la prosecuzione dei controlli sulla matrice macroalgale, solo in pochi siti sistematicamente interessati da alte concentrazioni della microalga potenzialmente tossica.

La sorveglianza effettuata sulla matrice acqua in attuazione del d.lgs. n. 116 del 30/05/2008 e dalle linee guida dell'ISS (rapporti ISTISAN 14/19), è stata effettuata in 53 punti appartenenti ai controlli per la qualità delle acque di balneazione.

A supporto delle attività del Piano alcuni campioni di acqua di mare e di macroalghe sono stati analizzati dal Dipartimento di Farmacia dell'Università di Napoli "Federico II" per la determinazione del profilo e del contenuto di ovatossine (OVTXs), ovvero tossine del gruppo delle Palitossine (PLTXs).

2. Attività di campionamento

2.1 Matrice acqua di mare

Le attività di campionamento di acqua di mare, sono state svolte nel periodo da inizio giugno a fine settembre, in circa 53 punti selezionati tra quelli appartenenti alla rete di monitoraggio per i controlli sulla qualità delle acque di balneazione ai fini d.lgs. 116 del 30 maggio 2008. La frequenza di campionamento è mensile per le 53 stazioni riportate nelle tabelle 1 e 2, ed è intensificata ad una frequenza quindicinale per le stazioni riportate in tabella 2 nei mesi di luglio, agosto e settembre.

In ciascuna stazione sono stati prelevati campioni di acqua per la quantificazione della microalga. Durante l'intero periodo di attività, inoltre, il personale a bordo dei battelli ha effettuato una sorveglianza visiva, contestualmente ai controlli della balneazione, rilevando

U
ARPA CAMPANIA
Agenzia Regionale per la Protezione dell'Ambiente della Campania
COPIA CONFORME ALL'ORIGINALE DIGITALE
Protocollo N.0039993/2021 del 30/06/2021
Firmatario: LUCIO DE MAIO

l'eventuale presenza di schiume superficiali, opalescenza delle acque e colorazioni anomale, presenza di aggregati mucilluginosi, effettuando in tali casi ulteriori prelievi e controlli.

Tabella n. 1 - Stazioni prelievo acqua con frequenza mensile (Coordinate geografiche sistema di riferimento WGS84).

| Cod. Stazione | Comune | Nominativo Stazione | LATITUDINE (WGS 84) | LONGITUDINE (WGS 84) |
|----------------|-------------------|-------------------------------|---------------------|----------------------|
| IT015063006005 | BACOLI | Arenile Dragonara ed Esercito | 40,7844 | 14,0835 |
| IT015063006010 | BACOLI | Spiaggetta verde | 40,7863 | 14,0885 |
| IT015063061008 | PROCIDA | Spiaggia del Cimitero | 40,7629 | 14,0081 |
| IT015063049003 | NAPOLI | Nisida | 40,7998 | 14,0364 |
| IT15063084005 | TORRE DEL GRECO | Litoranea Sud | 40,7613 | 14,3922 |
| IT15063084006 | TORRE DEL GRECO | Mortelle | 40,7573 | 14,4007 |
| IT15063084007 | TORRE DEL GRECO | Staz. di S. Maria La Bruna | 40,7546 | 14,4059 |
| IT015063044001 | MASSA LUBRENSE | Marina di Puolo | 40,6271 | 14,3458 |
| IT015063044002 | MASSA LUBRENSE | San Montano | 40,6149 | 14,3386 |
| IT015063044008 | MASSA LUBRENSE | Baia di Ieranto | 40,5739 | 14,3403 |
| IT015063044011 | MASSA LUBRENSE | Recommone | 40,5850 | 14,3637 |
| IT015063044012 | MASSA LUBRENSE | Marina Crapolla | 40,5928 | 14,3811 |
| IT015063037002 | ISCHIA | Spiaggia San Pietro | 40,7453 | 13,9464 |
| IT015063037003 | ISCHIA | Punta Molino | 40,7397 | 13,9556 |
| IT015063037005 | ISCHIA | Carta Romana | 40,7238 | 13,9596 |
| IT015063007002 | BARANOD'ISCHIA | Punta della Signora | 40,6996 | 13,9154 |
| IT015063019003 | CASAMICCIOLATERME | Punta della Scrofa | 40,7512 | 13,9182 |
| IT015063038002 | LACCO AMENO | S. Restituta | 40,7555 | 13,8861 |
| IT015063078002 | SERRARA FONTANA | S. Angelo | 40,6384 | 14,3993 |
| IT015063004002 | ANACAPRI | Punta del Pino | 40,5432 | 14,2509 |
| IT015063014002 | CAPRI | Faraglioni | 40,5461 | 14,2431 |
| IT015063014003 | CAPRI | Via Krupp | 40,5450 | 14,2357 |
| IT015063014004 | CAPRI | Marina Piccola | 40,5374 | 14,1985 |
| IT015063014006 | CAPRI | Bagno di Tiberio | 40,5597 | 14,2299 |
| IT015065102001 | PRAIANO | Spiagge le Praie/la Gavitella | 40,6143 | 14,5198 |
| IT015065102002 | PRAIANO | Vèttica Maggiore | 40,6108 | 14,5374 |
| IT015065053001 | FURORE | Sant' Elia | 40,6132 | 14,5394 |
| IT015065044002 | CONCA DEI MARINI | Marina di Conca | 40,6171 | 14,5765 |
| IT015065104002 | RAVELLO | Spiaggia Marmorata | 40,6458 | 14,6200 |
| IT015065157001 | VIETRI SUL MARE | Punta Fuenti | 40,6608 | 14,7132 |

U
 ARPA CAMPANIA
 Agenzia Regionale per la Protezione dell'Ambiente della Campania
COPIA CONFORME ALL'ORIGINALE DIGITALE
 Protocollo N.0039993/2021 del 30/06/2021
 Firmatario: LUCIO DE MAIO

| | | | | |
|----------------|--------------|------------------|---------|---------|
| IT015065031001 | CASTELLABATE | Punta Tresino | 40,3375 | 14,9506 |
| IT015065031012 | CASTELLABATE | Ogliastro Marina | 40,2332 | 14,9428 |
| IT015065039002 | CENTOLA | Palinuro | 40,0432 | 15,2837 |
| IT015065039003 | CENTOLA | Spiaggia Porto | 40,0302 | 15,2788 |
| IT015065021009 | CAMEROTA | Porto Infreschi | 39,9979 | 15,4253 |

Tabella n. 2 - Stazioni prelievo acqua con frequenza quindicinale nei mesi di luglio, agosto e settembre (Coordinate geografiche sistema di riferimento WGS84).

| COD. STAZ | PROVINCIA | COMUNE | NOMINATIVO STAZIONE | LATITUDINE (WGS 84) | LONGITUDINE (WGS 84) |
|----------------|-----------|-------------------|--------------------------|---------------------|----------------------|
| IT015063047001 | NAPOLI | MONTE DI PROCIDA | Capo Schiano | 40,800 | 14,036 |
| IT015063047002 | NAPOLI | MONTE DI PROCIDA | Spiaggia Acquamorta | 40,795 | 14,043 |
| IT015063006004 | NAPOLI | BACOLI | Spiaggia Miliscola | 40,7874 | 14,0725 |
| IT015063049004 | NAPOLI | NAPOLI | Trentaremi | 40,7962 | 14,1829 |
| IT015063049006 | NAPOLI | NAPOLI | Marechiaro | 40,7941 | 14,1911 |
| IT015063049007 | NAPOLI | NAPOLI | Punta Nera | 40,7974 | 14,1992 |
| IT015063049008 | NAPOLI | NAPOLI | Capo Posillipo | 40,8029 | 14,2077 |
| IT015063049009 | NAPOLI | NAPOLI | Posillipo | 40,8145 | 14,2107 |
| IT015063049010 | NAPOLI | NAPOLI | Donn' Anna | 40,8208 | 14,2156 |
| IT015063046001 | NAPOLI | META | Scutolo | 40,6512 | 14,4076 |
| IT015063046002 | NAPOLI | META | Stella Maris | 40,6474 | 14,4066 |
| IT015063046003 | NAPOLI | META | Purgatorio | 40,6458 | 14,4066 |
| IT015063053001 | NAPOLI | PIANO DI SORRENTO | Sopramare | 40,6397 | 14,4022 |
| IT015063071001 | NAPOLI | SANT'AGNELLO | Spiaggia di Sant'Agello | 40,6394 | 14,3995 |
| IT015063080001 | NAPOLI | SORRENTO | Riviera Massa | 40,6330 | 14,3872 |
| IT015063080002 | NAPOLI | SORRENTO | Est Porto Marina Piccola | 40,6319 | 14,3841 |
| IT015063080003 | NAPOLI | SORRENTO | Sorrento | 40,6290 | 14,3726 |
| IT015063080005 | NAPOLI | SORRENTO | Marina Grande - lato Est | 40,6283 | 14,3669 |

Il prelievo del campione di acqua, nel rispetto delle norme tecniche previste per i controlli sulla qualità delle acque di balneazione, è stato effettuato ad una distanza dalla battigia tale che il fondale abbia una profondità di circa 80 – 120 cm e circa 30 cm sotto il pelo dell'acqua. I

U
 APPA CAMPANIA
 Agenzia Regionale per la Protezione dell'Ambiente della Campania
 COPIA CONFORME ALL'ORIGINALE DIGITALE
 Protocollo N.0039993/2021 del 30/06/2021
 Firmatario: LUCIO DE MAIO

campioni sono stati stabilizzati con una soluzione di *Lugol* acida e mantenuti al buio ed alla temperatura di 4° C fino al loro successivo trattamento

2.2 Matrice macroalga

Sulla base delle risultanze analitiche ottenute dai precedenti piani di monitoraggio (2008 - 2016), già nel 2017, sono stati individuati quattro stazioni per i prelievi delle macroalghe, caratterizzate storicamente sia da elevate concentrazioni di *Ostreopsis cf. ovata* che dall'elevato interesse turistico balneare (vedi tabella n.3a).

Nel periodo compreso tra luglio e inizio ottobre, sono state svolte sei campagne di campionamento per la matrice macroalgha (due al mese) su quattro punti (tabella 3a) ed il campionamento degli organismi marini eduli (tabella 3b) esclusivamente durante le fasi di attenzione ed emergenza.

Tabella n. 3a – Stazioni prelievo macroalgha previste dal piano di monitoraggio (Coordinate geografiche sistema di riferimento WGS84).

| Cod. Stazione | Nominativo Staz. | Comune | lat | long |
|---------------|------------------|--------------|----------|----------|
| OS 42 | Seiano | Vico Equense | 40,6612 | 14,4171 |
| OS 17 | Sorrento | Sorrento | 40,62838 | 14,36896 |
| OS 39 | Bagni Elena | Napoli | 40,8171 | 14,2123 |
| OS 41 | Cala San Basilio | Napoli | 40,7932 | 14,1880 |

Nei casi in cui sono state riscontrate concentrazioni superiori a 10.000 Cell/L d'acqua e 10.000 cell/g su macroalghe, il piano prevede il prelievo di campioni di organismi marini eduli, consegnati poi da ARPAC all'Istituto Zooprofilattico di Portici per le successive determinazioni analitiche.

Nel corso di specifiche missioni mediante la tecnica dello snorkeling, i tecnici specializzati dell'Agenzia hanno prelevato, in ogni stazione di campionamento, talli di macroalghe, appartenenti alla stessa specie, campionati in più punti all'interno di un'area circoscritta e

U
 ARPA CAMPANIA
 Agenzia Regionale per la Protezione dell'Ambiente della Campania
 COPIA CONFORME ALL'ORIGINALE DIGITALE
 Protocollo N.0039993/2021 del 30/06/2021
 Firmatario: LUCIO DE MAIO

raccolti in un sacchetto di plastica. Tale metodo è stato adottato per meglio raggiungere l'obiettivo di sorvegliare ed individuare potenziali fioriture in relazione alla grande variabilità spaziale che la microalga ha mostrato quale propria peculiarità ecologica.

Il prelievo è stato effettuato, ove possibile, a una profondità compresa tra -0,20 e -0,50m (infralitorale superiore) e le macroalghie scelte per questa analisi sono state prevalentemente alghe brune e rosse, ramificate ed arborescenti, che negli anni hanno dimostrato essere il miglior substrato della microalga in oggetto.

A bordo dell'imbarcazione i campioni sono stati mantenuti al buio e a temperatura di 4° C fino al loro successivo trattamento. Dopo ogni prelievo è stata compilata una scheda di monitoraggio, redatta *ad hoc*.

Il Laboratorio Regionale Mare del Dipartimento Provinciale di Napoli dell'ARPAC ha avuto il compito di effettuare le analisi quali-quantitative di *Ostreopsis cf. ovata* sia su macroalga che nei campioni di acqua.

Contestualmente ai prelievi sono stati rilevati i parametri chimico - fisici della colonna d'acqua (temperatura, salinità, pH, torbidità, saturazione % di Ossigeno, clorofilla "a", trasparenza) ed i dati meteo-marini.

Nei punti in cui è stato necessario prelevare organismi eduli sono stati, come pratica consolidata, campionati ricci o mitili.

I campioni di ricci, costituiti da circa 20 individui, sono stati trattati direttamente a bordo prelevando le uova e le gonadi e successivamente trasferiti in contenitori da conservare in congelatore fino alla consegna al laboratorio di riferimento dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale di Portici.

Tabella n. 3b – Stazioni prelievo organismi marini eduli

| Data | Codice ARPAC | Località | Organismi eduli |
|------------|--------------|--------------|-----------------|
| 31/07/2020 | OS17 | Sorrento | Ricci |
| 31/07/2020 | OS41 | Napoli | Ricci |
| 13/08/2020 | OS42 | Vico Equense | Ricci |

U
 ARPA CAMPANIA
 Agenzia Regionale per la Protezione dell'Ambiente della Campania
COPIA CONFORME ALL'ORIGINALE DIGITALE
 Protocollo N.0039993/2021 del 30/06/2021
 Firmatario: LUCIO DE MAIO

2.3 Campionamenti acqua e macroalghe per il Dipartimento di Farmacia

I campioni di acqua di mare e di macroalghe analizzati da UniNa-DF sono stati raccolti dagli operatori dell'ARPA Campania nei 4 siti di tabella n.3 (Seiano, Sorrento, Bagni Elena e Cala S. Basilio) nel corso di 3 spedizioni avvenute nel periodo Agosto-Ottobre. Le aliquote destinate all'analisi chimica sono state consegnate al gruppo di lavoro UniNa-DF generalmente il giorno stesso in cui il campionamento è stato effettuato. Le date e i luoghi di campionamento e i codici identificativi dei campioni assegnati dall'ARPAC e dal UniNa-DF sono riportati in tabella n.4. Tutti i campioni sono stati conservati in freezer a -20°C, e lasciati ambientare a temperatura ambiente il giorno stesso delle analisi.

Tabella n. 4. Data e luogo di campionamento e codici assegnati dall'ARPAC e dal UniNa-DF ai campioni di acqua di mare (2L) e di macroalghe.

| Data | Codice ARPAC | Località | Acqua Codice UniNa-DF |
|-----------|--------------|-----------------|-----------------------|
| 24/8/2020 | OS42 | Seiano | A |
| 24/8/2020 | OS17 | Sorrento | B |
| 24/8/2020 | OS39 | Bagni Elena | C |
| 24/8/2020 | OS41 | Cala S. Basilio | D |
| 11/9/2020 | OS42 | Seiano | E |
| 11/9/2020 | OS17 | Sorrento | F |
| 11/9/2020 | OS39 | Bagni Elena | G |
| 11/9/2020 | OS41 | Cala S. Basilio | H |
| 1/10/2020 | OS42 | Seiano | I |
| 1/10/2020 | OS17 | Sorrento | L |
| 1/10/2020 | OS39 | Bagni Elena | M |
| 1/10/2020 | OS41 | Cala S. Basilio | N |

1. 3. Attività analitiche

3.1 Metodi di analisi

L' U.O. Laboratorio Regionale Mare del Dipartimento Provinciale di Napoli ha svolto attività di controllo relativo alla presenza delle microalghe bentoniche (*Coolia monotis*, *Ostreopsis cf. ovata* e *Prorocentrum lima*) mediante analisi quali-quantitative su campioni di acqua di mare e di macroalga prelevati lungo la costa della Regione Campania.

Il protocollo utilizzato per la matrice è stato il “metodo classico” riportato nelle linee guida «*Ostreopsis cf. ovata*: linee guida per la gestione delle fioriture negli ambienti marino costieri in relazione a balneazione e altre attività ricreative», pubblicate dall'Istituto Superiore di Sanità (Parte C -Indicazioni tecniche per campionamento, raccolta di dati sanitari e metodi di analisi), così come previsto dal DM 19 aprile 2018 che, tra l'altro, modifica l'articolo 3 del DM 30 marzo 2010. Per il conteggio delle microalghe sia su campioni di matrice acqua che su quelli di matrice macroalga è stato utilizzato il metodo di prova UNI EN ISO 15204:2006 (*Water quality-Guidance standard on the enumeration of phytoplankton using inverted microscope – Utermöhl technique*).

Matrice acqua

I campioni sono stati omogeneizzati mediante agitazione manuale alternando lente rotazioni orizzontali e verticali per 100 volte. La camera di sedimentazione è stata caricata con un sub-campione di volume noto e si è atteso che tutte le cellule sedimentassero sul fondo prima di iniziare l'analisi al microscopio ottico invertito.

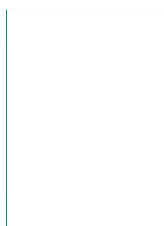
In base alla concentrazione di microalghe presente nella camera di sedimentazione, è stata scelta una differente strategia di conteggio: campi casuali, transetti, conteggio di metà camera di sedimentazione o della intera camera di sedimentazione.

Matrice macroalga

Il recipiente contenente la macroalga e la sua acqua di raccolta è stato agitato per due minuti in modo da consentire il rilascio nell'acqua delle microalghe epifittiche. L'acqua di raccolta è stata recuperata e conservata in un contenitore. Al fine di rimuovere completamente le epifite dal tallo della macroalga, lo stesso tallo è stato prelevato e risciacquato per almeno tre volte con acqua di mare filtrata (0,45 µm). Il campione costituito dall'acqua dei risciacqui e dall'acqua di raccolta recuperata in precedenza è stato fissato con soluzione di *Lugol* (0,5 – 1 ml di soluzione ogni 250 ml di campione) ed è stato analizzato seguendo la tecnica di *Utermöhl*.

La macroalga è stata identificata arrivando, laddove possibile, a livello di specie.

U
ARPA CAMPANIA
Agenzia Regionale per la Protezione dell'Ambiente della Campania
COPIA CONFORME ALL'ORIGINALE DIGITALE
Protocollo N.0039993/2021 del 30/06/2021
Firmatario: LUCIO DE MAIO



Il peso fresco della macroalga, è stato ottenuto facendo prima sgocciolare la macroalga su carta assorbente e poi determinandone il peso.

Il numero di cellule di *Ostreopsis cf. ovata* per grammo di peso fresco della macroalga (cell g⁻¹ fw) è stato ottenuto applicando la seguente formula:

$$\text{cell g}^{-1} \text{ fw} = \frac{\text{c_cont} * \text{fattore} * \text{vol_fin}}{\text{vol_sed}} \text{ fw}$$

c_cont = cellule contate;
 fattore = rapporto tra area della camera e area esplorata (1 o 2 transetti, n campi casuali, mezza camera, 1 camera);
 se si osserva tutta la camera il fattore è = 1;
 vol_fin = volume finale del campione (in ml);
 vol_sed = volume di campione sedimentato (in ml);
 fw = peso fresco del tallo (g).

3.2 Campioni analizzati

Per l'attività di controllo sulla matrice acqua, prevista dall'art. 3 del Decreto 30 marzo 2010 e s.m.i. in attuazione del decreto legislativo n. 116 del 2008, relativa alla gestione della qualità delle acque di balneazione, sono stati analizzati 218 campioni della provincia di Napoli e 44 campioni della provincia di Salerno nel periodo giugno-settembre, per un totale di 262 campioni.

Per la matrice macroalga e per le acque prelevate in prossimità della macroalga le stazioni di prelievo sono state quattro (tabella n.3): OS 39 Bagni Elena (Napoli), OS 17 Sorrento, OS 42 Seiano (Vico Equense) e OS 41 Cala San Basilio (Napoli), con prelievi effettuati da luglio a ottobre.

Sono stati, inoltre, prelevati campioni di acqua in prossimità della macroalga: 2 campioni a luglio; 2 campioni ad agosto, 1 campione a settembre e 4 campioni ad ottobre.

3.3 Estrazione delle tossine dall'acqua di mare

I campioni di acqua di mare (2.0 L) sono stati estratti secondo la metodica descritta da Tartaglione et al. (2016) opportunamente ottimizzata in relazioni ai volumi di campione a disposizione. In particolare, ciascun campione di acqua di mare è stato sottoposto a filtrazione sotto vuoto mediante l'impiego di filtri a membrana (0.45 µm) che sono stati conservati ed estratti a loro volta per l'analisi del particolato raccolto. Successivamente, il filtrato ottenuto è stato sonicato per 10 minuti in bagno di

U
 ARPA CAMPANIA
 Agenzia Regionale per la Protezione dell'Ambiente della Campania
COPIA CONFORME ALL'ORIGINALE DIGITALE
 Protocollo N.0039993/2021 del 30/06/2021
 Firmatario: LUCIO DE MAIO

ghiaccio mediante l'ausilio di un omogenizzatore ad ultrasuoni settato in modalità pulsata ed al 20% di ampiezza dell'onda (AMP). L'acqua di mare filtrata e sonicata è stata quindi sottoposta ad estrazione in fase solida (SPE), mediante caricamento su cartucce SPE Oasis HLB LP, 500 mg (Waters, USA) precedentemente condizionate con metanolo 100% (6 mL), metanolo-acqua 8:2 v/v (6 mL), metanolo-acqua 1:9 v/v (6 mL) ed acqua 100%. Successivamente al caricamento di ciascun campione (Load), la cartuccia è stata sottoposta a 2 step di lavaggio (Wash): W1 acqua 100% (6 mL) e W2 metanolo-acqua 1:9 v/v (6 mL). L'eluizione (Elution) è stata condotta in 3 step: E1 metanolo-acqua 8:2 + acido trifluoroacetico (TFA) 0.1 % v/v (1mL), E2 metanolo-acqua 8:2 + acido trifluoroacetico (TFA) 0.1 % v/v (5mL), ed E3 metanolo 100% (1 mL). Un'aliquota di ciascun eluato (200 µL) è stata trasferita in vial ed analizzata mediante cromatografia liquida accoppiata a spettrometria di massa ad alta risoluzione (LC-HRMS) entro 1 ora dall'eluizione per evitare la degradazione delle tossine indotta dalla presenza dell'acido trifluoroacetico. La metodica descritta da Tartaglione et al. (2016) garantiva un recupero del 71% misurato mediante esperimenti di spiking condotti su aliquote di 100 mL di acqua di mare addizionata di PLTX standard ad una concentrazione di 2 µg/L. La riottimizzazione della procedura per l'analisi chimica di campioni di acqua di mare a volume maggiore (2.0 L) è stata effettuata addizionando a 2.0 L di acqua di mare 4 µg di PLTX standard (2 µg/L). Il recupero ottenuto è stato del 90 %.

I filtri utilizzati per filtrare l'acqua di mare (0.45 µm) sono stati estratti come riportato da Tartaglione et al. (2017) per investigare la presenza di PLTXs nel particolato eventualmente presente nell'acqua di mare e/o delle tossine adsorbite sui filtri. In particolare, i filtri, tagliati in strisce sottili, sono stati posti in tubi da centrifuga da 15 mL e completamente ricoperti con una soluzione metanolo-acqua 1:1 v/v (3.0 mL), sonicati per 10 minuti in modalità pulsata al 20% AMP e costantemente tenuti in bagno di ghiaccio. In seguito, ciascuna miscela (filtro/solvente) è stata centrifugata a 3500 RPM per 10 minuti ed un'aliquota del surnatante è stato analizzato mediante LC-HRMS.

3.4 Estrazione delle tossine dalle macroalghe

Ciascun campione di macroalghe è stato trasferito in un tubo da centrifuga da 50 mL insieme all'acqua di mare in cui era sospeso e sottoposto a scuotimento manuale per 60 sec e successiva

U

ARPA CAMPANIA
Agenzia Regionale per la Protezione dell'Ambiente della Campania

COPIA CONFORME ALL'ORIGINALE DIGITALE

Protocollo N.0039993/2021 del 30/06/2021

Firmatario: LUCIO DE MAIO

agitazione tramite vortex (60 sec) per permettere alle microalghe adese alla macroalga di essere rilasciate nell'acqua. Successivamente, le macroalghe sono state lasciate essiccare a temperatura ambiente e sotto flusso laminare all'interno di cappe chimiche mentre l'acqua di scuotimento è stata trasferita in un tubo da centrifuga (50 mL) e centrifugata a 3500 RPM per 10 minuti. Il surnatante ottenuto è stato allontanato ed il pellet risultante è stato estratto con 10 mL di una soluzione metanolo-acqua 1:1 v/v, sonicato per 10 minuti in modalità pulsata al 20 % AMP tenendo costantemente il recipiente in bagno di ghiaccio. In seguito, ciascuna miscela (pellet/solvente) è stata centrifugata a 3500 RPM per 10 minuti, il surnatante è stato trasferito in tubi da centrifuga (15.0 mL) ed un'aliquota di 200 µL per ciascun campione è stata analizzata mediante LC-HRMS. Le alghe essiccate dopo 24-48 h sono state pesate mediante l'utilizzo di una bilancia analitica ed i rispettivi pesi utilizzati per esprimere la concentrazione di OVTXs rinvenute per peso (g) di alga essiccata.

3.5 Analisi mediante Cromatografia Liquida-Spettrometria di Massa ad Alta Risoluzione (LC-HRMS)

Le analisi LC-HRMS sono state condotte attraverso l'utilizzo di uno spettrometro di massa ibrido trappola lineare trappola orbitale LTQ ORBITRAP XLTM FTMS (Thermo-Fisher, San Josè, CA, USA) dotato di sorgente Electrospray ESI ION MAX accoppiato con un sistema cromatografico a pompa quaternaria UHPLC Dionex Ultimate 3000. L'analisi cromatografica è stata eseguita su colonna Kinetex 2.6 µm C18 100Å 100 x 2.1 mm (Phenomenex, Torrance, CA, USA) eluita a temperatura ambiente ad un flusso di 0.2 mL/min con acqua (fase mobile A) e acetonitrile/acqua 95:5 v/v (fase mobile B) entrambe addizionate di acido acetico 30 mM. Entrambe le fasi mobili A e B sono state sottoposte a filtrazione su membrane filtranti (0.45 µm e 0.22 µm, rispettivamente) e degasaggio sottovuoto prima del loro utilizzo. La separazione cromatografica degli analiti è stata condotta utilizzando il seguente gradiente: t= 0, 20% B; t= 10, 100% B; t= 15, 100% B; t= 16, 20% B; t= 17, 20% B; la colonna è stata ri-equilibrata per 9 min dopo ogni corsa cromatografica. Il volume di iniezione è stato fissato a 5 µL. In tali condizioni i composti del gruppo della palitossina (PLTX e OVTXs) eluiscono nel range 5.5-6.0 minuti. I parametri di sorgente sono stati ottimizzati utilizzando una soluzione di PLTX standard alla concentrazione di 1 µg/mL e sono i seguenti: capillary

U

ARPA CAMPANIA
Agenzia Regionale per la Protezione dell'Ambiente della Campania

COPIA CONFORME ALL'ORIGINALE DIGITALE

Protocollo N.0039993/2021 del 30/06/2021

Firmatario: LUCIO DE MAIO

temperature= 360 °C, sheath and auxiliary gas = 60 e 21 (unità arbitraria), spray voltage= 4.80 kV, capillary voltage= 36.00 V, tube lens voltage= 100 V. Gli spettri Full Scan HRMS sono stati registrati ad una risoluzione di 60,000 (FWHM at m/z 400) nel range di massa m/z 800-1400. Il calcolo della composizione elementare degli ioni presenti negli spettri Full Scan HRMS (mass tolerance= 5ppm) è stato condotto utilizzando il software Thermo Xcalibur v2.2 SP1.48 (Thermo Fisher, San Josè, CA, USA) e selezionando il picco monoisotopico di ciascun cluster di ioni, in particolare lo ione $[M+H+Ca]^{3+}$ che era lo ione più intenso dello spettro. La quantificazione delle OVTXs rivelate nei campioni analizzati è stata condotta mediante l'utilizzo di una curva di taratura a 8 livelli di concentrazione di PLTX standard (1000, 500, 250, 125, 62.5, 31.3, 15.6 a 7.8 ng/mL; R2 0.9997) preparata mediante diluizioni seriali di una soluzione madre di PLTX standard 1000 ng/mL in metanolo-acqua 1:1 v/v. Il punto più diluito della curva è stato successivamente sottoposto a diluizione per la misurazione dei limiti strumentali di quantificazione (LOQ) ed identificazione (LOD). Il LOD strumentale è stato misurato a 3.9 ng/mL mentre il LOQ a 15.6 ng/mL. Gli ioni diagnostici bi-carica $[M+2H-H_2O]^{2+}$, $[M+H+Na]^{2+}$ e $[M+H+K]^{2+}$ ed i tri-carica $[M+H+Ca]^{3+}$ ed $[M+H+Mg]^{3+}$ sono stati selezionati per ottenere gli Extracted Ion Chromatogram (XIC) di ciascuna OVTX e della PLTX (Tabella n.5) e l'area del picco cromatografico emerso in ciascuno spettro è stata utilizzata per ricavare la concentrazione dell'analita per interpolazione con la curva di taratura dello standard di PLTX. L'utilizzo dello standard di PLTX per quantificare le OVTXs è stato necessario in quanto attualmente non sono disponibili in commercio standard per le OVTXs. Sulla base delle analogie strutturali di questa famiglia di composti è stata assunto che ciascuna tossina mostrasse la medesima risposta molare dello standard di PLTX.

Tabella n.5 - Ione monoisotopico bi-carica $[M+2H-H_2O]^{2+}$, $[M+H+Na]^{2+}$ e $[M+H+K]^{2+}$ e tri-carica $[M+H+Ca]^{3+}$ e $[M+H+Mg]^{3+}$ della palitossina (PLTX) e delle ovatossine (OVTXs)

| Tossina | $[M+2H-H_2O]^{2+}$ | $[M+H+Na]^{2+}$ | $[M+H+K]^{2+}$ | $[M+H+Ca]^{3+}$ | $[M+H+Mg]^{3+}$ |
|----------|--------------------|-----------------|----------------|-----------------|-----------------|
| PLTX | 1331.2417 | 1351.2380 | 1359.2250 | 906.4828 | 901.1569 |
| OVTX-a | 1315.2480 | 1335.2431 | 1343.2301 | 895.8195 | 890.4937 |
| OVTX -b | 1337.2595 | 1357.2562 | 1365.2432 | 910.4949 | 905.1691 |
| OVTX -c | 1345.2566 | 1365.2537 | 1373.2407 | 915.8266 | 910.5007 |
| OVTX-d/e | 1323.2439 | 1343.2406 | 1351,2276 | 901.1511 | 895.8253 |

4. Risultati

4.1 Matrice acqua di mare

Le analisi condotte sui 262 campioni, previsti per il decreto legislativo n. 116 del 2008, hanno mostrato concentrazioni di *Ostreopsis cf. ovata* inferiori al limite di rilevabilità (60 cell/L) del metodo di prova (UNI EN ISO 15204:2006), ad eccezione di 56 campioni in cui è stata rilevata la presenza della microalga *Ostreopsis cf. ovata*. Nel mese di giugno le microalga è stata ritrovata in 12 punti, nel mese di luglio in 26 punti, nel mese di agosto in 11 punti e nel mese di settembre in 7 punti, le concentrazioni sono comunque risultate inferiori al valore soglia di 10000 cell/L. La massima concentrazione rilevata è stata di 2100 n. cell/L nella stazione IT015063014006 di Capri nel mese di luglio (vedi tab. 6,7,8,9). Le microalghe *Coolia monotis* e *Prorocentrum lima* non sono state ritrovate in nessuno dei 262 campioni analizzati.

Tabella n. 6-Concentrazioni delle microalghe rilevate su campioni di acqua nel mese di Giugno (D.lgs. 116/2008-DM 30 marzo 2010 e s.m.i.).

| GIUGNO 2020 | | | | | |
|---------------|-------------------|-----------------|-----------------------------|-----------------------|--------------------------|
| Data Prelievo | Comune | Codice Stazione | n.cell./L | | |
| | | | <i>Ostreopsis cf. ovata</i> | <i>Coolia monotis</i> | <i>Prorocentrum lima</i> |
| 15/06/2020 | Barano d'Ischia | IT015063007002 | 60 | <60 | <60 |
| 17/06/2020 | Napoli | IT015063049003 | 100 | <60 | <60 |
| 17/06/2020 | Napoli | IT015063049004 | 320 | <60 | <60 |
| 18/06/2020 | Piano di Sorrento | IT015063053001 | 420 | <60 | <60 |
| 22/06/2020 | Monte di Procida | IT015063047001 | 120 | <60 | <60 |
| 23/06/2020 | Napoli | IT015063049010 | 160 | <60 | <60 |
| 23/06/2020 | Napoli | IT015063049009 | 140 | <60 | <60 |
| 23/06/2020 | Napoli | IT015063049008 | 220 | <60 | <60 |
| 23/06/2020 | Napoli | IT015063049007 | 80 | <60 | <60 |
| 23/06/2020 | Napoli | IT015063049006 | 120 | <60 | <60 |
| 24/06/2020 | Capri | IT015063014006 | 360 | <60 | <60 |
| 24/06/2020 | Capri | IT015063014002 | 80 | <60 | <60 |

U
 ARPA CAMPANIA
 Agenzia Regionale per la Protezione dell'Ambiente della Campania
 COPIA CONFORME ALL'ORIGINALE DIGITALE
 Protocollo N. 0039993/2021 del 30/06/2021
 Firmatario: TIZIO DE VITO

Tabella n. 7-Concentrazioni delle microalghe rilevate su campioni di acqua nel mese di Luglio (D.lgs. 116/2008-DM 30 marzo 2010 e s.m.i.).

| LUGLIO 2020 | | | | | |
|---------------|------------------|-----------------|-----------------------------|-----------------------|--------------------------|
| Data Prelievo | Comune | Codice Stazione | n.cell./L | | |
| | | | <i>Ostreopsis cf. ovata</i> | <i>Coolia monotis</i> | <i>Prorocentrum lima</i> |
| 06/07/2020 | Lacco Ameno | IT015063038002 | 80 | <60 | <60 |
| 06/07/2020 | Massalubrense | IT015063044001 | 80 | <60 | <60 |
| 06/07/2020 | Massalubrense | IT015063044002 | 60 | <60 | <60 |
| 06/07/2020 | Massalubrense | IT015063044011 | 60 | <60 | <60 |
| 06/07/2020 | Massalubrense | IT015063044012 | 60 | <60 | <60 |
| 06/07/2020 | Conca dei Marini | IT015065044002 | 2040 | <60 | <60 |
| 08/07/2020 | Meta | IT015063046003 | 160 | <60 | <60 |
| 08/07/2020 | Casamicciola | IT015063019003 | 300 | <60 | <60 |
| 08/07/2020 | Ischia | IT015063037002 | 80 | <60 | <60 |
| 08/07/2020 | Ischia | IT015063037003 | 120 | <60 | <60 |
| 09/07/2020 | Bacoli | IT015063006004 | 80 | <60 | <60 |
| 09/07/2020 | Napoli | IT015063049004 | 140 | <60 | <60 |
| 08/07/2020 | Sorrento | IT015063080005 | 320 | <60 | <60 |
| 08/07/2020 | Sorrento | IT015063080003 | 160 | <60 | <60 |
| 08/07/2020 | Sorrento | IT015063080002 | 1360 | <60 | <60 |
| 08/07/2020 | Sorrento | IT015063080001 | 280 | <60 | <60 |
| 14/07/2020 | Napoli | IT015063049006 | 140 | <60 | <60 |
| 17/07/2020 | Capri | IT015063014006 | 2100 | <60 | <60 |
| 17/07/2020 | Capri | IT015063014002 | 140 | <60 | <60 |
| 31/07/2020 | Meta | IT015063046003 | 60 | <60 | <60 |
| 31/07/2020 | Napoli | IT015063049004 | 180 | <60 | <60 |
| 31/07/2020 | Napoli | IT015063049006 | 100 | <60 | <60 |
| 31/07/2020 | Napoli | IT015063049007 | 160 | <60 | <60 |
| 31/07/2020 | Napoli | IT015063049008 | 200 | <60 | <60 |
| 31/07/2020 | Napoli | IT015063049009 | 140 | <60 | <60 |

Tabella n. 8-Concentrazioni delle microalghe rilevate su campioni di acqua nel mese di Agosto (D.lgs. 116/2008-DM 30 marzo 2010 e s.m.i.).

| AGOSTO 2020 | | | | | |
|---------------|----------|-----------------|-----------------------------|-----------------------|--------------------------|
| Data Prelievo | Comune | Codice Stazione | n.cell./L | | |
| | | | <i>Ostreopsis cf. ovata</i> | <i>Coolia monotis</i> | <i>Prorocentrum lima</i> |
| 07/08/2020 | Napoli | IT015063049003 | 120 | <60 | <60 |
| 08/08/2020 | Sorrento | IT015063080001 | 160 | <60 | <60 |
| 08/08/2020 | Sorrento | IT015063080002 | 140 | <60 | <60 |

ARPA CAMPANIA
 Agenzia Regionale per la Protezione dell'Ambiente della Campania
 COPIA CONFORME ALL'ORIGINALE DIGITALE
 Protocollo N.0039993/2021 del 30/06/2021
 Direzione Provinciale di Napoli

| | | | | | |
|------------|------------------|----------------|-----|-----|-----|
| 10/08/2020 | Sorrento | IT015063080003 | 120 | <60 | <60 |
| 10/08/2020 | Torre del Greco | IT015063084006 | 280 | <60 | <60 |
| 10/08/2020 | Monte di Procida | IT015063047001 | 80 | <60 | <60 |
| 12/08/2020 | Napoli | IT015063049006 | 100 | <60 | <60 |
| 12/08/2020 | Napoli | IT015063049008 | 80 | <60 | <60 |
| 12/08/2020 | Napoli | IT015063049010 | 100 | <60 | <60 |
| 12/08/2020 | Capri | IT015063014006 | 320 | <60 | <60 |
| 24/08/2020 | Napoli | IT015063049009 | 80 | <60 | <60 |

Tabella n. 9-Concentrazioni delle microalghe rilevate su campioni di acqua nel mese di Settembre
 (D.lgs. 116/2008-DM 30 marzo 2010 e s.m.i.).

| SETTEMBRE 2020 | | | | | |
|----------------|-----------------|-----------------|-----------------------------|-----------------------|--------------------------|
| Data Prelievo | Comune | Codice Stazione | n.cell/L | | |
| | | | <i>Ostreopsis cf. ovata</i> | <i>Coolia monotis</i> | <i>Prorocentrum lima</i> |
| 03/09/2020 | Sorrento | IT015063080001 | 120 | <60 | <60 |
| 03/09/2020 | Sorrento | IT015063080002 | 80 | <60 | <60 |
| 03/09/2020 | Sorrento | IT015063080003 | 140 | <60 | <60 |
| 03/09/2020 | Sorrento | IT015063080005 | 80 | <60 | <60 |
| 07/09/2020 | Torre del Greco | IT015063084006 | 100 | <60 | <60 |
| 08/09/2020 | Napoli | IT015063049006 | 100 | <60 | <60 |
| 09/09/2020 | Capri | IT015063014006 | 100 | <60 | <60 |

Le analisi condotte sui 9 campioni di acqua campionati in prossimità delle macroalghe hanno rilevato la presenza di *Ostreopsis cf. ovata* nei punti, OS17, OS41, comunque inferiori al valore soglia. Le microalghe *Coolia monotis* e *Prorocentrum lima* non sono state ritrovate in nessun di questi campioni di acqua (vedi tab. n.10).

Tabella n. 10-Concentrazioni delle microalghe determinate sui campioni di acqua prelevati in prossimità delle macroalghe.

| Data | Comune | Codice stazione | n.cell/L | | |
|------------|----------|-----------------|-----------------------------|-----------------------|--------------------------|
| | | | <i>Ostreopsis cf. ovata</i> | <i>Coolia monotis</i> | <i>Prorocentrum lima</i> |
| 31/07/2020 | Sorrento | OS17 | 180 | <60 | <60 |
| 31/07/2020 | Napoli | OS41 | 3140 | <60 | <60 |

APPA CAMPANIA
 Agenzia Regionale per la Protezione dell'Ambiente della Campania
 COPIA CONFORME ALL'ORIGINALE DIGITALE
 Protocollo N.0039993/2021 del 30/06/2021
 Firmatario: LUCIO DE MAIO

4.2 Matrice macroalga

Durante tutto il periodo di campionamento (luglio – ottobre) sui 24 campioni di macroalghe analizzati non è stata mai rilevata la presenza delle specie *Coolia monotis* e *Prorocentrum lima*. Le concentrazioni riscontrate di *Ostreopsis cf. ovata* sono riportate nelle tabelle successive (Tabelle n.11,12,13,14).

Nella stazione Bagni Elena (OS39) l'*Ostreopsis cf. ovata* è stata ritrovata dalla seconda campagna di agosto alla prima di ottobre. Il superamento del valore soglia è stato riscontrato nella prima campagna di settembre (vedi Tabella n. 11).

Tabella n. 11-Stazione OS39 -Concentrazioni delle microalghe bentoniche determinate sui campioni di macroalghe.

| Data | Campagna | OS 39- Bagni Elena (n.cell g ⁻¹ fw) | | |
|------------|-------------|---------------------------------------------------|-----------------------|--------------------------|
| | | <i>Ostreopsis cf. ovata</i> | <i>Coolia monotis</i> | <i>Prorocentrum lima</i> |
| 07/07/2020 | I luglio | <60 | <60 | <60 |
| 31/07/2020 | II luglio | <60 | <60 | <60 |
| 13/08/2020 | I agosto | <60 | <60 | <60 |
| 24/08/2020 | II agosto | 8571 | <60 | <60 |
| 11/09/2020 | I settembre | 87325 | <60 | <60 |
| 01/10/2020 | I ottobre | 4064 | <60 | <60 |

Nella stazione Cala San Basilio (OS41) l'*Ostreopsis cf. ovata* è stata ritrovata durante tutto il periodo di campionamento, tranne nella seconda campagna di luglio e nella prima di agosto. Il superamento del valore soglia è stato riscontrato nel periodo prima campagna di luglio. (vedi Tabella n. 12).

Tabella n. 12-Stazione OS41-Concentrazioni delle microalghe bentoniche determinate sui campioni di macroalghe.

| Data | Campagna | OS 41-Cala San Basilio (n.cell g ⁻¹ fw) | | |
|------------|-------------|-------------------------------------------------------|-----------------------|--------------------------|
| | | <i>Ostreopsis cf. ovata</i> | <i>Coolia monotis</i> | <i>Prorocentrum lima</i> |
| 07/07/2020 | I luglio | 13464 | <60 | <60 |
| 31/07/2020 | II luglio | <60 | <60 | <60 |
| 13/08/2020 | I agosto | <60 | <60 | <60 |
| 24/08/2020 | II agosto | 186 | <60 | <60 |
| 11/09/2020 | I settembre | 7676 | <60 | <60 |
| 01/10/2020 | I ottobre | 6750 | <60 | <60 |

Nella stazione di Seiano (OS 42) l'*Ostreopsis cf. ovata* è stata ritrovata solo nella seconda di luglio e nella prima e seconda campagna di agosto. Il superamento del limite di allerta si è avuto nella seconda di luglio (vedi Tabella n. 13).

Tabella n. 13-Stazione OS 42-Concentrazioni delle microalghe determinate sui campioni di macroalghe.

| Data | Campagna | OS 42-Seiano (n.cell g ⁻¹ fw) | | |
|------------|-------------|---------------------------------------------|-----------------------|--------------------------|
| | | <i>Ostreopsis cf. ovata</i> | <i>Coolia monotis</i> | <i>Prorocentrum lima</i> |
| 07/07/2020 | I luglio | <60 | <60 | <60 |
| 31/07/2020 | II luglio | 21423 | <60 | <60 |
| 13/08/2020 | I agosto | 5521 | <60 | <60 |
| 24/08/2020 | II agosto | 5457 | <60 | <60 |
| 11/09/2020 | I settembre | <60 | <60 | <60 |
| 01/10/2020 | I ottobre | <60 | <60 | <60 |

Nella stazione di Sorrento (OS17) l'*Ostreopsis cf. ovata* è stata ritrovata durante tutto il periodo di campionamento. Nel mese di luglio e nella seconda campagna di agosto le concentrazioni di *O. cf. ovata* sono risultate essere superiori al limite soglia (vedi Tabella. n. 14).

Tabella n. 14-Stazione OS 17-Concentrazioni delle microalghe determinate sui campioni di macroalghe.

| Data | Campagna | OS 17-Sorrento (n.cell g ⁻¹ fw) | | |
|------------|-------------|-----------------------------------------------|-----------------------|--------------------------|
| | | <i>Ostreopsis cf.ovata</i> | <i>Coolia monotis</i> | <i>Prorocentrum lima</i> |
| 07/07/2020 | I luglio | 422961 | <60 | <60 |
| 31/07/2020 | II luglio | 32302 | <60 | <60 |
| 13/08/2020 | I agosto | 2078 | <60 | <60 |
| 24/08/2020 | II agosto | 10691 | <60 | <60 |
| 11/09/2020 | I settembre | 4500 | <60 | <60 |
| 01/10/2020 | I ottobre | 2658 | <60 | <60 |

4.3 Andamenti temporali

Nel grafico n. 1 sono riportati gli andamenti temporali delle concentrazioni di *Ostreopsis cf ovata* nelle quattro stazioni del piano.

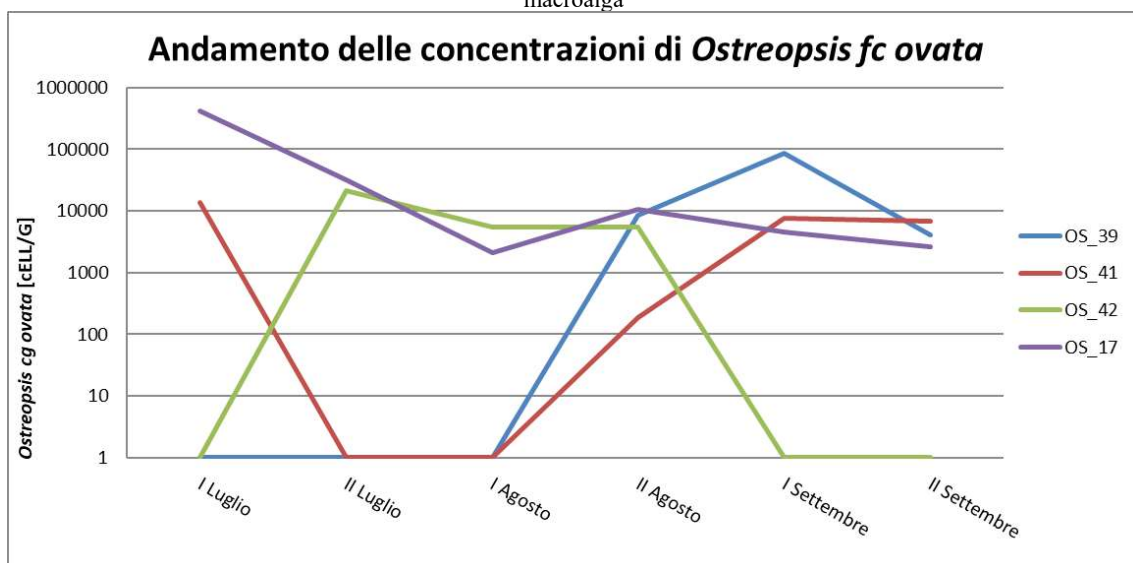
Dall'analisi dei dati è possibile notare che durante tutto il periodo di campionamento la massima concentrazione di *Ostreopsis cf. ovata* è stata rilevata presso la stazione OS 17 (Sorrento) nella

prima campagna di luglio (422961cell g-1fw). Il superamento del limite di allerta si è avuto in tutte e quattro le stazioni.

Dall'analisi del grafico risulta evidente che le quattro stazioni monitorate sono caratterizzate da andamenti temporali diversi tra loro. In particolare, nella prima campagna di luglio le stazioni OS 41 (Cala San Basilio) e OS 17 sono caratterizzate da valori al di sopra del limite di allerta (10.000 cell g-1fw), che diminuiscono fino alla prima campagna di agosto, scendendo al di sotto del limite. Successivamente, mentre la stazione di Sorrento è caratterizzate da un incremento alla fine del mese di agosto e da un nuovo decremento nel mese di settembre, la stazione di Cala San Basilio registra un progressivo incremento senza mai superare però il limite delle 10.000 cell g-1fw.

In contrapposizione con questi andamenti, la stazione OS 42 (Seiano) presenta il proprio valore massimo nella seconda campagna di luglio e un successivo decremento fino alla fine di settembre. Infine, la stazione OS 39 (Bagni Elena) presenta un incremento a partire dalla prima campagna di agosto fino alla prima di settembre dove si registra il proprio valore massimo.

Grafico n. 1 - Andamento temporale in scala logaritmica delle concentrazioni di *Ostreopsis cf. ovata* dei campioni di macroalga



Nei grafici che seguono (da n.2 a n.5) sono mostrati gli andamenti di Temperatura, % ossigeno disciolto e clorofilla "a" superficiali dell'acqua in relazione alle concentrazioni di *O.ovata*.

U
 ARPA CAMPANIA
 Agenzia Regionale per la Protezione dell'Ambiente della Campania
 COPIA CONFORME ALL'ORIGINALE DIGITALE
 Protocollo N.0039993/2021 del 30/06/2021
 Firmatario: LUCIO DE MAIO

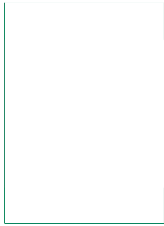
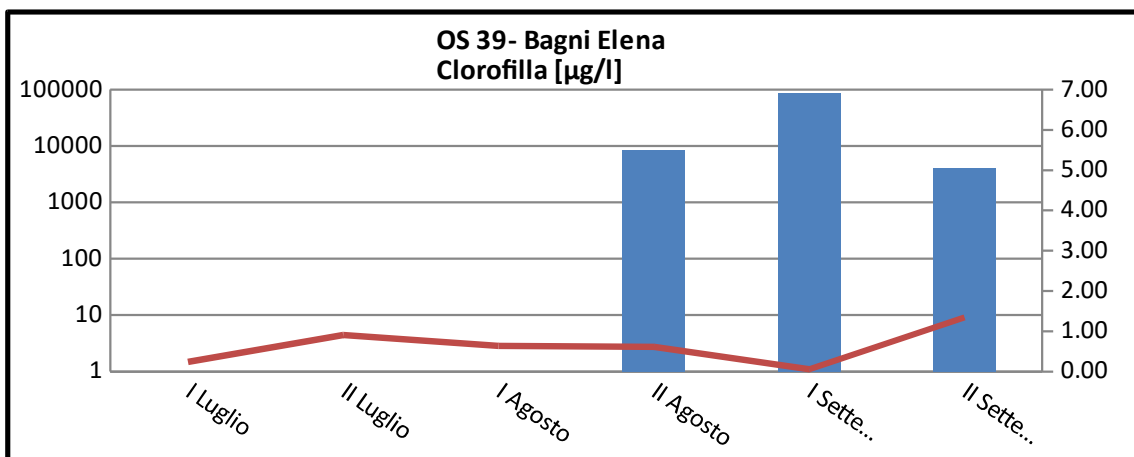
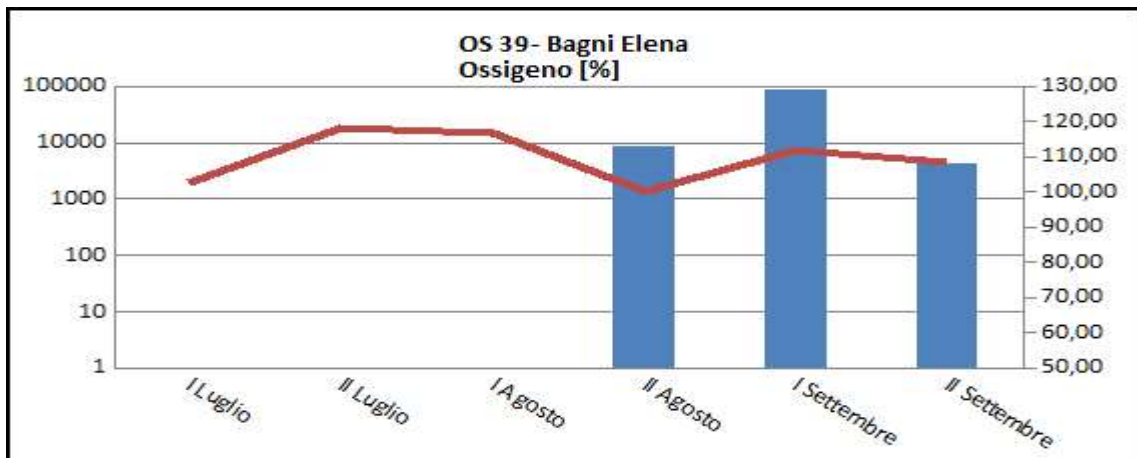
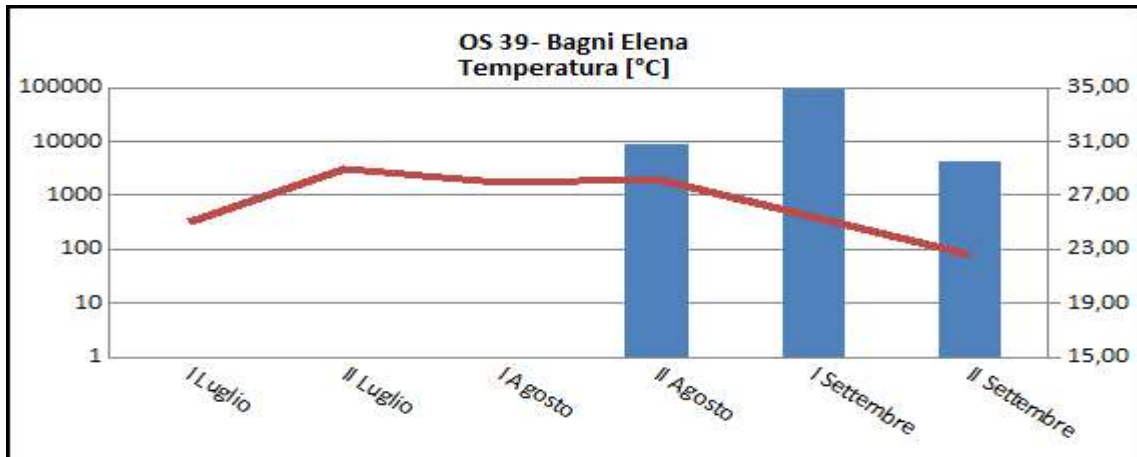
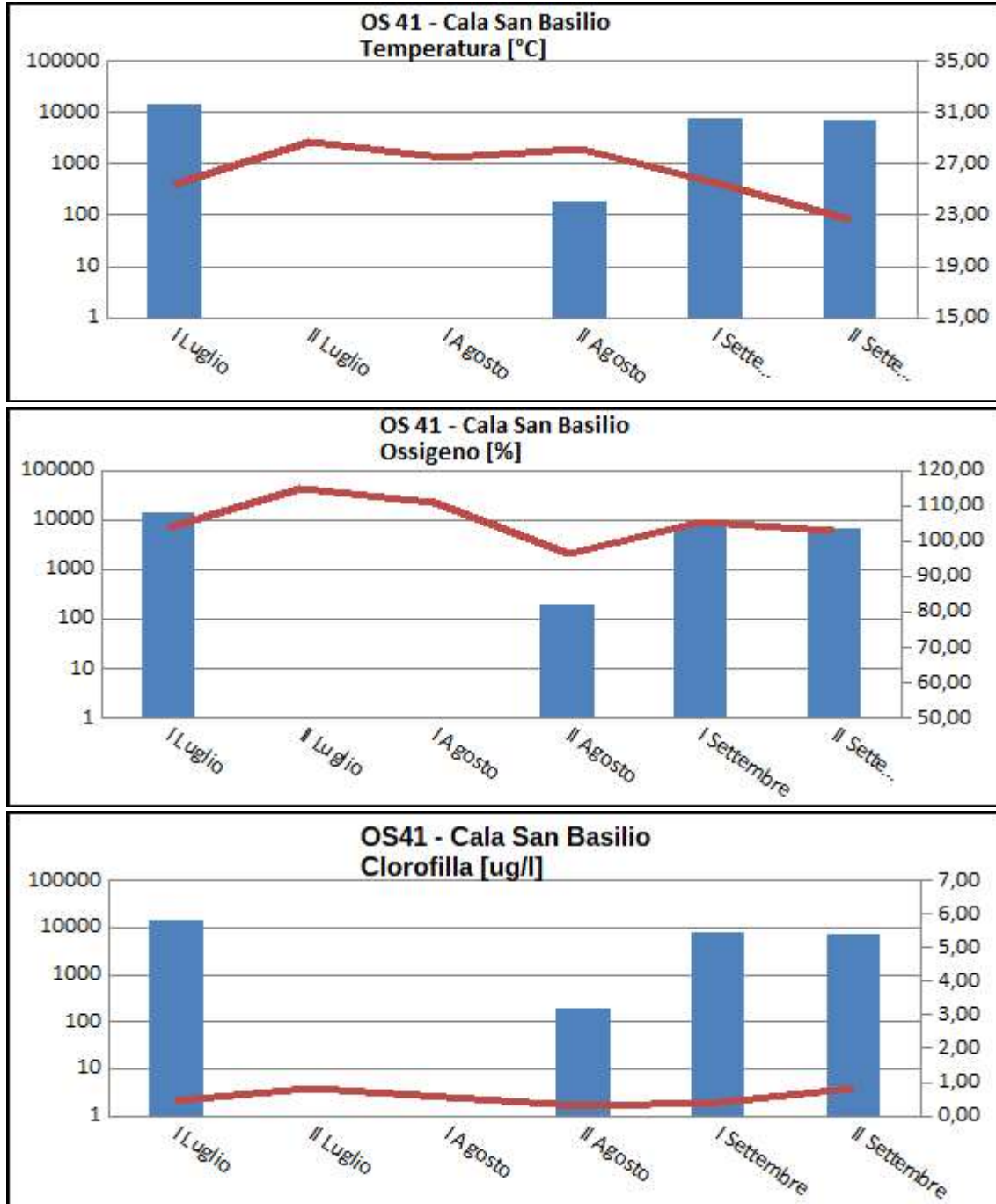


Grafico n.2 – OS39 Andamento dei parametri chimico fisici superficiali dell’acqua con le concentrazioni di O. ovata



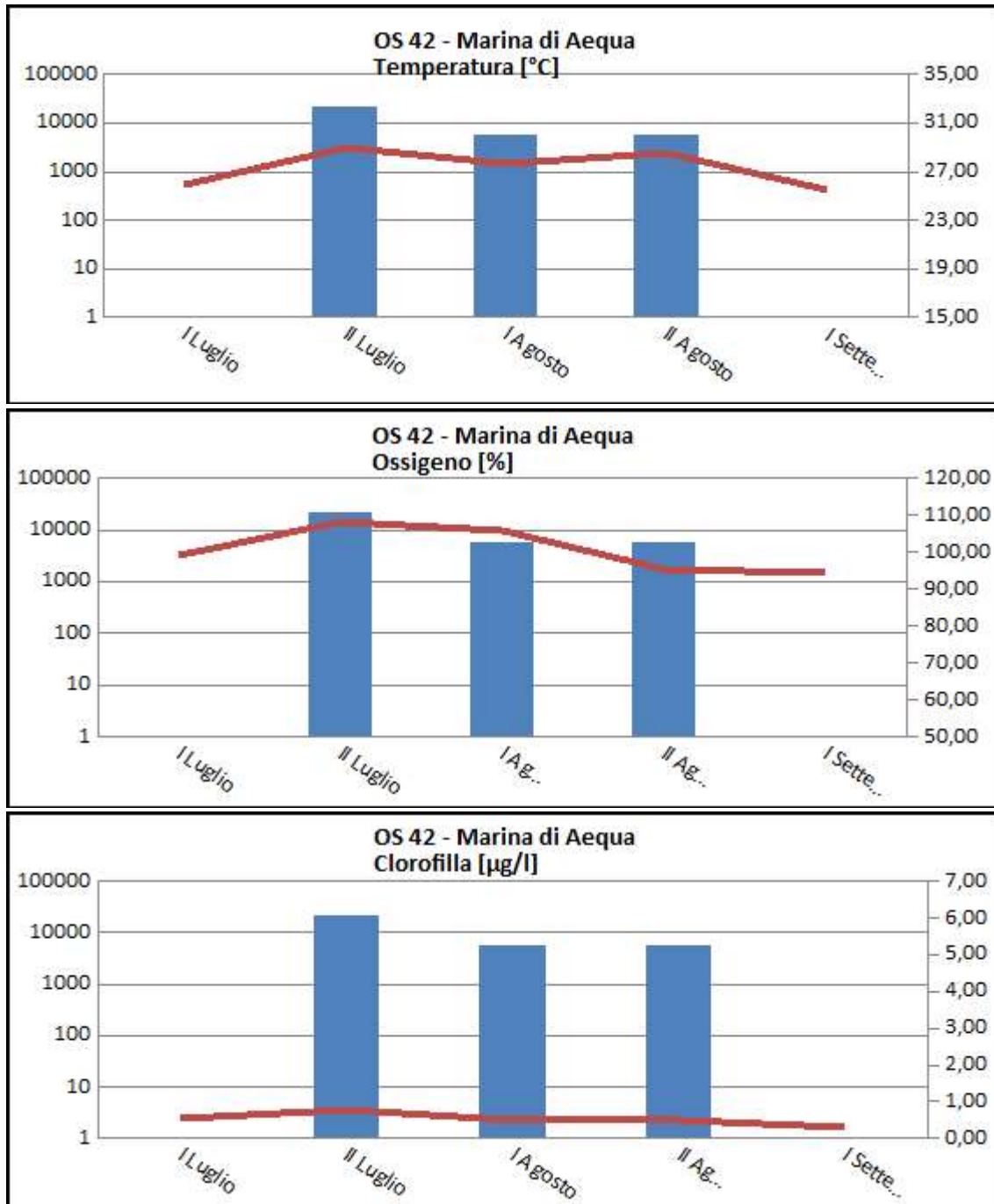
U
ARPA CAMPANIA
Agenzia Regionale per la Protezione dell'Ambiente della Campania
COPIA CONFORME ALL'ORIGINALE DIGITALE
Protocollo N.0039993/2021 del 30/06/2021
Firmatario: LUCIO DE MAIO

Grafico n.3 – OS41 Andamento dei parametri chimico fisici superficiali dell’acqua con le concentrazioni di O. ovata



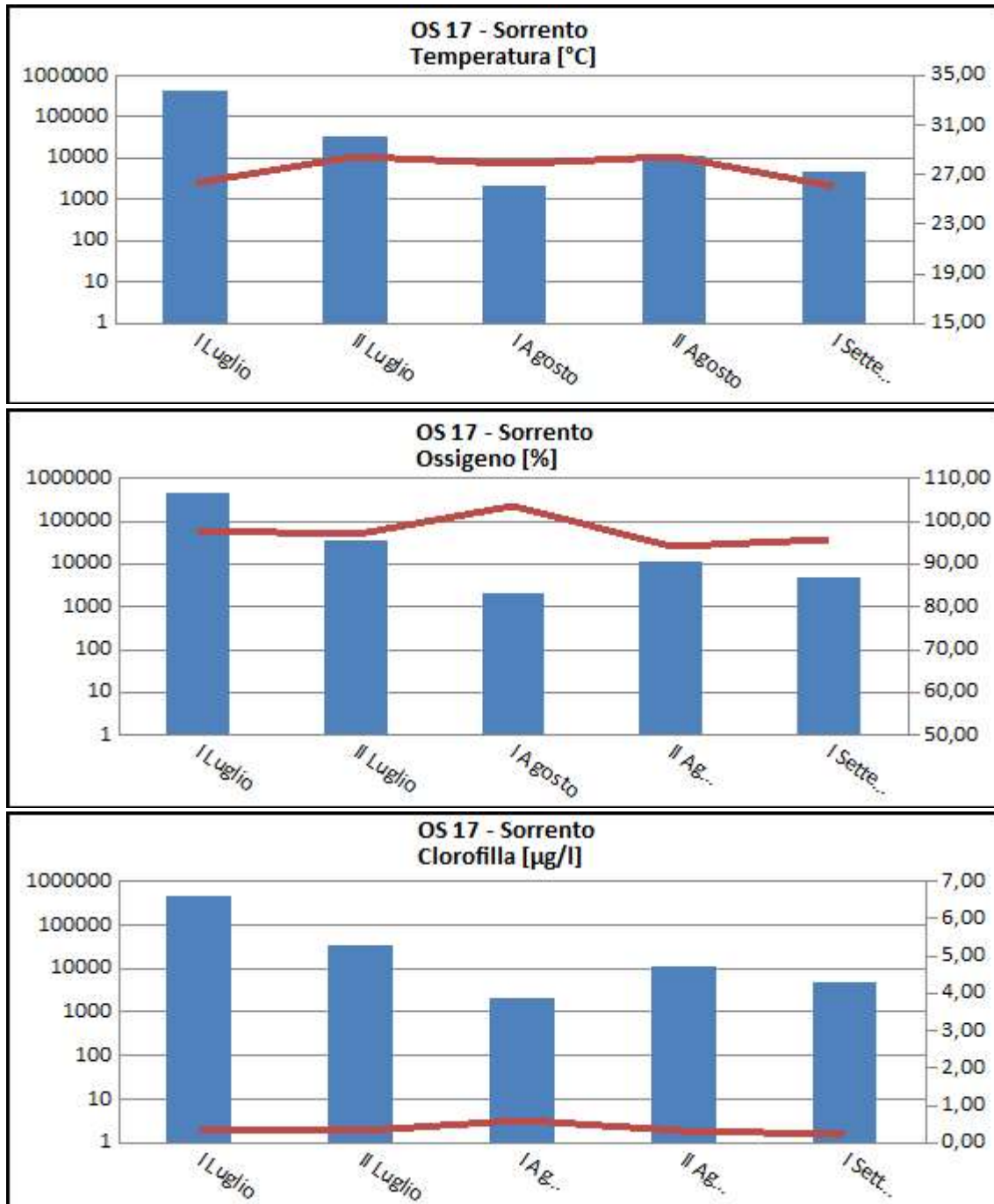
U
 ARPA CAMPANIA
 Agenzia Regionale per la Protezione dell'Ambiente della Campania
COPIA CONFORME ALL'ORIGINALE DIGITALE
 Protocollo N.0039993/2021 del 30/06/2021
 Firmatario: LUCIO DE MAIO

Grafico n.4 – OS42 Andamento dei parametri chimico fisici superficiali dell’acqua con le concentrazioni di O. ovata



U
 ARPA CAMPANIA
 Agenzia Regionale per la Protezione dell'Ambiente della Campania
COPIA CONFORME ALL'ORIGINALE DIGITALE
 Protocollo N.0039993/2021 del 30/06/2021
 Firmatario: LUCIO DE MAIO

Grafico n.5 – OS17 Andamento dei parametri chimico fisici superficiali dell’acqua con le concentrazioni di O. ovata



U
 ARPA CAMPANIA
 Agenzia Regionale per la Protezione dell'Ambiente della Campania
COPIA CONFORME ALL'ORIGINALE DIGITALE
 Protocollo N.0039993/2021 del 30/06/2021
 Firmatario: LUCIO DE MAIO

4.4 Matrici organismi marini eduli

A seguito delle fasi di attenzione/emergenza sono stati campionati gli organismi marini eduli così come previsto dal piano. I laboratori dell'Istituto Zooprofilattico di Portici hanno effettuato le analisi per la ricerca e la quantificazione della tossina. Complessivamente sono stati prelevati 3 campioni di ricci. Nello specifico, nella seconda campagna di luglio sono stati prelevati organismi eduli nelle stazioni di Sorrento (OS17) e Cala San Basilio (OS41), mentre nella prima campagna del mese di agosto, i ricci sono stati prelevati nella stazione di Seiano (OS42). Come tipicamente riscontrato nel periodo di inizio autunno non è stato possibile prelevare mitili di dimensioni tali da risultare edibili, ne tantomeno ricci a causa dell'esiguo numero di individui presenti. Pertanto, tutte le stazioni appartenenti al piano sono state considerate rientrate dalle rispettive fasi di attenzione/emergenza.

4.5 Determinazione del profilo e del contenuto di tossine del gruppo delle Palitossine nei campioni di acqua e macroalga

In Tabella n.15 sono riportate le concentrazioni di tossine misurate in ciascun campione analizzato da UniNa-DF.

Tabella n.15. Data e luogo di campionamento e codici assegnati dall'ARPAC e dal UniNa-DF ai campioni di acqua di mare (2L) e di macroalge ricevuti nel periodo Agosto-Ottobre 2020. Concentrazioni delle ovatossine (OVTXs) nell'acqua e nel pellet isolato dalla macroalga (ng OVTX/g alga-peso secco). L'acronimo "n.d" indica l'assenza di tossina nel campione a livelli apprezzabili, cioè superiori al LOD (Limit of Detection) del metodo LC-HRMS.

| Data | Codice ARPAC | Luogo | Acqua Codice UniNa-DF | OVT X Totale | Macroalga Codice UniNa-DF | OVTX Totale | OVT X-a | OVT X-b | OVT X-c | OVTX-d/e |
|-----------|--------------|-----------------|-----------------------|--------------|---------------------------|-------------|---------|---------|---------|----------|
| 24/8/2020 | OS42 | Seiano | A | n.d. | AA | 51.4 | 51.4 | n.d. | n.d. | n.d. |
| 24/8/2020 | OS17 | Sorrento | B | n.d. | BA | 204.4 | 146.5 | 24.5 | n.d. | 33.4 |
| 24/8/2020 | OS39 | Bagni Elena | C | n.d. | CA | 400.8 | 209.6 | 126.8 | n.d. | 64.4 |
| 24/8/2020 | OS41 | Cala S. Basilio | D | n.d. | DA | n.d. | | | | |
| 11/9/2020 | OS42 | Seiano | E | n.d. | EA | 202.1 | 105.1 | 53.4 | n.d. | 43.5 |
| 11/9/2020 | OS17 | Sorrento | F | n.d. | FA | n.d. | | | | |
| 11/9/2020 | OS39 | Bagni Elena | G | n.d. | GA | 134.3 | 70.5 | 38.8 | 8.3 | 16.7 |
| 11/9/2020 | OS41 | Cala S. Basilio | H | n.d. | HA | 738.4 | 403.6 | 323.6 | n.d. | 11.2 |
| | | | | n.d. | | | | | | |
| 1/10/2020 | OS42 | Seiano | I | n.d. | IA | n.d. | | | | |
| 1/10/2020 | OS17 | Sorrento | L | n.d. | LA | n.d. | | | | |
| 1/10/2020 | OS39 | Bagni Elena | M | n.d. | MA | n.d. | | | | |
| 1/10/2020 | OS41 | Cala S. Basilio | N | n.d. | NA | n.d. | | | | |

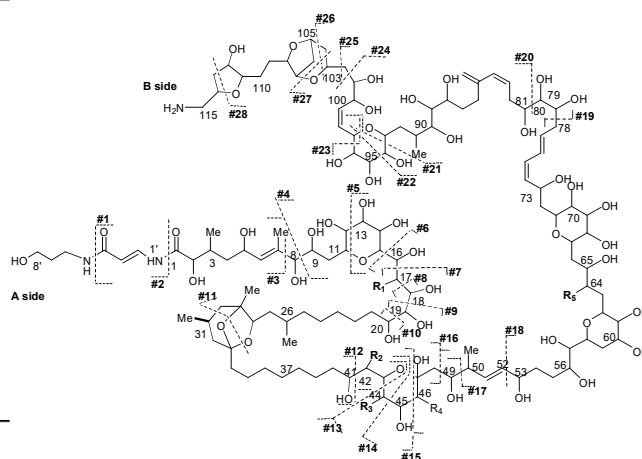
n.d.= not detected

APPA CAMPANIA
 Agenzia Regionale per la Protezione dell'Ambiente della Campania
 COPIA CONFORME ALL'ORIGINALE DIGITALE
 Protocollo N.0039993/2021 del 30/06/2021
 Firmatario: LUCIO DE MAIO

Gli eluati dell'acqua di mare dopo SPE, gli estratti dei filtri utilizzati per filtrare il particolato presente nell'acqua di mare e gli estratti dei pellet risultanti dallo scuotimento delle macroalghe sono stati analizzati immediatamente dopo la preparazione dei campioni mediante LC-HRMS. Il metodo LC-HRMS ottimizzato permette la rivelazione di tutte le tossine del gruppo della PLTX (Figura 1) in un'unica corsa cromatografica di 26 min.

Figura 1. Struttura della palitossina e dei composti palitossino-simili (ovatossine e palitossina isobarica) prodotti da *Ostreopsis* spp. (Tartaglione et al, 2017).

| Toxin | R1 | R2 | R3 | R4 | R5 | Other |
|---------------|----|----|----|----|----|------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| PLTX | OH | H | OH | OH | OH | |
| CVTX-a | H | OH | H | OH | H | |
| CVTX-b | H | OH | H | OH | H | + C ₂ H ₄ O in region N-C8' |
| CVTX-c | H | OH | OH | OH | H | + C ₂ H ₄ O in region N-C8' |
| CVTX-d | H | OH | OH | OH | H | |
| CVTX-e | H | OH | H | OH | H | + O in region C8-C8' |
| CVTX-f | H | OH | H | OH | H | + C ₂ H ₄ in region C95-C102 |
| CVTX-g | H | OH | H | OH | H | |
| CVTX-h | H | OH | H | H | H | Open ring in region C42-C49 |
| CVTX-i | H | OH | H | OH | H | + C ₂ H ₂ O ₂ - 1 unsaturation in region C49-C52 - O in region C53-C78 |
| CVTX-j1 | H | OH | OH | OH | H | + C ₂ H ₂ O ₂ - 1 unsaturation in region C49-C52 - O in region C53-C78 |
| CVTX-j2 | H | OH | H | OH | H | + C ₂ H ₂ O ₂ - 1 unsaturation in region C49-C52 |
| CVTX-k | H | OH | OH | OH | H | + C ₂ H ₂ O ₂ - 1 unsaturation in region C49-C52 |
| isobaric PLTX | H | OH | OH | OH | H | + O in region C8-C8' |



Le analisi LC-HRMS eseguite sugli eluati SPE dei campioni di acqua di mare hanno evidenziato che nessun composto palitossino-simile prodotto da *Ostreopsis* cf. *ovata* (ovatossine e palitossina isobarica) era presente nella matrice acqua. Considerando il recupero della procedura di estrazione (90.0%) ed il limite di rivelazione della palitossina con il metodo utilizzato (3.9 ng/mL), si può escludere la presenza delle tossine nell'acqua di mare a livelli superiori a 10.8 ng/L di acqua.

Analogamente, gli estratti dei pellet ottenuti per filtrazione dell'acqua di mare sono risultati negativi all'analisi. Questo suggerisce che non vi fosse nel periodo del campionamento una proliferazione massiva della microalga e/o delle condizioni meteomarine e di idrodinamismo tali da far sì che le cellule della microalga bentonica (e le tossine da essa prodotte) fossero presenti

ARPA CAMPANIA
 Agenzia Regionale per la Protezione dell'Ambiente della Campania
 COPIA CONFORME ALL'ORIGINALE DIGITALE
 Protocollo N.0039993/2021 del 30/06/2021
 Firmatario: LUCIO DE MAIO

nella colonna d'acqua o che la concentrazione delle tossine nella colonna d'acqua fosse inferiore ai limiti di rivelazione del metodo LC-HRMS utilizzato per la rivelazione.

Tuttavia, il 50% degli estratti dei pellet ottenuti per scuotimento delle macroalghie sono invece risultati positivi alle OVTXs, con concentrazioni di tossina comprese nell'intervallo 8.3-403.6 ng/g

di alga essiccata. Per ogni sito di campionamento risultato positivo, il profilo delle tossine emerso dalle analisi LC-HRMS ha evidenziato come l'OVTX-a era il componente principale, seguito da OVTX-b, OVTX-d/e ed OVTX-c (quando rinvenute). Le concentrazioni maggiori di tossina sono state misurate per il sito Cala S. Basilio (OS41) l' 11/9/2020 e per il sito Bagni Elena (OS39) il 24/8/2020 con un contenuto totale di OVTXs rispettivamente di 738.4 e 400.8 ng/g (Tabella n.15). Nel mese di agosto, il sito Seiano (OS42) è risultato scarsamente positivo ad OVTX-a (51.4 ng/g), mentre nel mese di Settembre i livelli di tossina sono incrementati di circa 2 volte (105.1 ng/g) in concomitanza alla comparsa di altri analoghi strutturali (OVTX-b a -d/e) per un contenuto totale di OVTXs pari a 202.1 ng/g. Per il sito Cala S. Basilio le OVTXs sono state unicamente rinvenute nei campioni raccolti nel mese di Settembre (738.4 ng/g) mentre erano assenti nei campioni raccolti in Agosto. Contrariamente, per il sito Sorrento (OS17) le OVTXs sono state rinvenute nel mese di Agosto (204.4 ng/g) mentre nessuna traccia è emersa dall'analisi dei campioni di macroalga raccolti in Settembre. I campioni raccolti nel sito Bagni Elena invece hanno evidenziato un maggiore contenuto di tossine in Agosto (400.8 ng/g) il quale si è ridotto drasticamente nel mese di Settembre (134.3 ng/g), mostrando quindi un trend diametralmente opposto a quello registrato per il sito Seiano. Nel campionamento del mese di Ottobre tutti i campioni di pellet da macroalghie sono risultati negativi. Complessivamente, le analisi LC-HRMS hanno evidenziato che la presenza di OVTXs, così come i loro livelli nel litorale Campano sono strettamente dipendenti dal sito geografico e dal periodo di campionamento durante la stagione estiva, con livelli elevati nei mesi di Agosto e Settembre (Tabella n.15).

U
ARPA CAMPANIA
Agenzia Regionale per la Protezione dell'Ambiente della Campania
COPIA CONFORME ALL'ORIGINALE DIGITALE
Protocollo N.0039993/2021 del 30/06/2021
Firmatario: LUCIO DE MAIO

5. Conclusioni

Le analisi condotte sui 262 campioni previsti dal d.lgs. 116/2008 hanno mostrato concentrazioni di *Ostreopsis cf. ovata* inferiori al limite di rilevabilità (60 cell/L) ad eccezione di 56 campioni, che sono risultati positivi con concentrazioni di *Ostreopsis cf. ovata* comunque inferiori al valore soglia.

Nei campioni di macroalga, prelevati presso le quattro stazioni di campionamento previste dal piano di monitoraggio, la microalga *Ostreopsis cf. ovata* è stata ritrovata in concentrazioni superiori al limite di allerta nelle stazioni OS 39, OS 41 e OS 42 solo in una campagna, mentre nella stazione OS 17 il limite è stato superato in tre campagne. L'analisi chimica LC-HRMS ha confermato la presenza delle OVTXs nei pellet microalgali ottenuti per scuotimento delle macroalghie raccolte nelle stazioni succitate sebbene non sia emersa una correlazione lineare tra numeri di cellule di *O. cf. ovata* ritrovate su macroalga e contenuti di ovatossine.

L'analisi degli andamenti temporali non mostra specifiche relazioni tra le fioriture della microalga nelle diverse stazioni. Le concentrazioni di *Ostreopsis cf. ovata* riscontrate sulla macroalga sono risultate essere sempre più alte rispetto alle concentrazioni rilevate nei campioni di acqua prelevati in corrispondenza delle stesse macroalghie. Questa osservazione è stata confermata dall'analisi chimica LC-HRMS dell'acqua di mare in cui nessuno dei campioni analizzati è emersa la presenza di OVTXs.

Tutte le attività sono terminate nel mese di ottobre, con il rientro alla fase di routine di tutte le stazioni monitorate.

Considerando la costante presenza della fioritura della microalga nei mesi estivi e il rischio che *Ostreopsis cf. ovata* comporta sulla balneazione e sugli aspetti igienico-sanitari (molluschi bivalvi, ricci) si ritiene estremamente importante mantenere attivo il sistema di controllo e continuare il monitoraggio in maniera sistematica.

U

ARPA CAMPANIA
Agenzia Regionale per la Protezione dell'Ambiente della Campania

COPIA CONFORME ALL'ORIGINALE DIGITALE

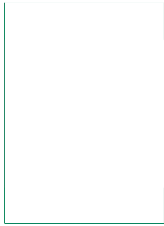
Protocollo N.0039993/2021 del 30/06/2021

Firmatario: LUCIO DE MAIO

Bibliografia

- L. Tartaglione, C. Dell'Aversano*, A. Mazzeo, M. Forino, A. Wieringa, P. Ciminiello. Determination of palytoxins in soft coral and seawater from a home aquarium. Comparison between Palythoa and Ostreopsis-related inhalatory poisonings. *Environmental Science and Technology* (2016) 50, 1023-1030
- L. Tartaglione, E. Dello Iacovo, A. Mazzeo, S. Casabianca, P. Ciminiello, A. Penna, C. Dell'Aversano*. Variability in toxin profiles of the Mediterranean *Ostreopsis cf. ovata* and in structural features of the produced ovatoxins *Environmental Science and Technology* (2017) 51, 13920-13928
- d.lgs. n. 116 del 30/05/2008 e dalle linee guida dell'ISS (rapporti ISTISAN 14/19)
- ISPRA (Istituto Superiore per la Protezione e la Ricerca Ambientale) Rapporto 127/2010.
- Monitoraggio di *Ostreopsis ovata* e altre microalghe potenzialmente tossiche lungo le coste italiane nel triennio 2007-2009.
- ISPRA (Istituto Superiore per la Protezione e la Ricerca Ambientale) Rapporto 148/2011. autore del report Campania
- Monitoraggio di *Ostreopsis ovata* e altre microalghe potenzialmente tossiche lungo le aree marino costiere italiane. Anno 2010. Regione Campania (D.D. 1264/2012) A.G.C. Ecologia, tutela, C.I.A., protezione Civile – Settore Ciclo Integrato delle Acque.
- ISPRA (Istituto Superiore per la Protezione e la Ricerca Ambientale) Atti 2012; Giornata di studio e confronto Presenza di fioriture algali di *Ostreopsis ovata* ed altre microalghe potenzialmente tossiche lungo le coste italiane
Lucio De Maio e Stefano Capone- ARPA Campania
- P.R.I. 2001-2014: Piano di monitoraggio annuale sulla presenza di *ostreopsis ovata* nel litorale costiero campano – 2011.
- ISPRA (Istituto Superiore per la Protezione e la Ricerca Ambientale) Rapporto 188/2013. Monitoraggio e sorveglianza delle fioriture di *Ostreopsis cf. ovata* lungo le coste italiane. Anno 2012.
- ISPRA (Istituto Superiore per la Protezione e la Ricerca Ambientale) Rapporto 211/2014. Monitoraggio della microalga potenzialmente tossica *Ostreopsis cf. ovata* lungo le coste italiane. Anno 2013.

U
 ARPA CAMPANIA
 Agenzia Regionale per la Protezione dell'Ambiente della Campania
 COPIA CONFORME ALL'ORIGINALE DIGITALE
 Protocollo N.0039993/2021 del 30/06/2021
 Firmatario: LUCIO DE MAIO



- ISPRA (Istituto Superiore per la Protezione e la Ricerca Ambientale) Rapporto 232/2015. Monitoraggio della microalga potenzialmente tossica *Ostreopsis cf. ovata* lungo le coste italiane. Anno 2014.
- ISPRA (Istituto Superiore per la Protezione e la Ricerca Ambientale) Rapporto 253/2016. Monitoraggio della microalga potenzialmente tossica *Ostreopsis cf. ovata* lungo le coste italiane. Anno 2015.
- ISPRA (Istituto Superiore per la Protezione e la Ricerca Ambientale) Rapporto 275/2017. Monitoraggio della microalga potenzialmente tossica *Ostreopsis cf. ovata* lungo le coste italiane. Anno 2016.
- ISPRA (Istituto Superiore per la Protezione e la Ricerca Ambientale) Rapporto 298/2018. Monitoraggio della microalga potenzialmente tossica *Ostreopsis cf. ovata* lungo le coste italiane. Anno 2017.

U
ARPA CAMPANIA
Agenzia Regionale per la Protezione dell'Ambiente della Campania
COPIA CONFORME ALL'ORIGINALE DIGITALE
Protocollo N.0039993/2021 del 30/06/2021
Firmatario: LUCIO DE MAIO