

Relazione a cura del dipartimento di medicina veterinaria dell'università degli studi di Sassari

1

La conoscenza e la comprensione dei processi ecologici sono uno strumento indispensabile per favorire l'uso sostenibile dell'ambiente lagunare, oltre che per valutare eventuali cambiamenti in atto, per conservare la biodiversità e per mitigare gli effetti di alterazioni negative indotte dalle attività antropiche. Attualmente, la Laguna del Calich non è una zona classificata per la produzione dei molluschi bivalvi e per quelli presenti in banchi naturali, per motivi di carattere igienico-sanitario, attualmente vige il divieto di raccolta e commercializzazione. La classificazione delle zone di produzione è di competenza del Servizio Pesca e Acquacultura dell'Assessorato all'Agricoltura della Regione Sardegna: l'avvio dell'iter di richiesta di classificazione di una zona di produzione di molluschi necessita di una preliminare verifica della qualità delle acque e di un approccio polifasico al bio-monitoraggio basato sull'analisi del rischio. Il biomonitoraggio, rispetto alle valutazioni dirette sulle varie matrici organiche e inorganiche, risponde meglio all'esigenza di effettuare un controllo basato su un'alta densità di punti di campionamento, avvalendosi di organismi "sensibili" in grado di fungere da "indicatori" della qualità ambientale e di fornire utili informazioni sulle ripercussioni biologiche della contaminazione batterica, virale, da metalli pesanti e biotossine algali sulla salute dell'uomo.

Il biomonitoraggio mediante molluschi bivalvi è oggi considerato uno degli approcci più completi per valutare l'inquinamento dell'ambiente lagunare ed i suoi potenziali effetti biologici. La determinazione dei contaminanti biotici ed abiotici nei molluschi rappresenta un valido strumento di valutazione indiretta delle acque e dell'impatto esercitato dall'ambiente sulle caratteristiche igienico sanitarie dei bivalvi. In questo contesto, ai sensi del protocollo d'intesa sottoscritto tra gli Enti partecipanti all' azione pilota T2.1.2 - "REALIZZAZIONE DI UNA STAZIONE SPERIMENTALE DI ALLEVAMENTO BIVALVI", ed approvato dal Consiglio di Dipartimento di Medicina Veterinaria dell'Università di Sassari (di seguito UNISS_DMV) nella seduta del 21 gennaio 2019, UNISS_DMV ha eseguito la determinazione dei contaminanti abiotici e biotici negli animali allevati, cozze (*Mytilus galloprovincialis*) e ostriche (*Crassostrea gigas*)

Nello specifico, il piano operativo prevedeva:

La cooperazione al cuore del Mediterraneo
La coopération au coeur de la Méditerranée

- a) campionamenti trimestrali di cozze e ostriche per analisi bio-tossicologiche (tossine idrosolubili e liposolubili), virologiche (*Norovirus* ed Epatite A) e microbiologiche (*E. coli*, *Salmonella* spp, *Vibrio parahaemolyticus*)
- b) campionamenti trimestrali di cozze e ostriche per analisi chimiche per metalli: Al, As, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Mn, Mo, Ni, Pb, Rb, Sn, Se, V, Zn;
- c) campionamento mensile di acqua su 2 punti con identificazione e conteggio popolazione fitoplanctonica

1. Materiali e metodi

Nella tabella 1 è riassunta la programmazione dei campionamenti eseguiti:

CAMPIONAMENTO	DATA	MATRICE	PARAMETRI
T0	03.12.2018	acqua	conteggio fitoplancton tossico
T1	07.01.2019	acqua	conteggio fitoplancton tossico
T2	04.02.2019	acqua/molluschi (mitili)	conteggio fitoplancton tossico/virus-batteri-biotossine-metalli pesanti
T3	04.03.2019	acqua/molluschi (ostriche)	conteggio fitoplancton tossico/virus-batteri-biotossine-metalli pesanti
T4	01.04.2019	acqua	conteggio fitoplancton tossico
T5	06.05.2019	acqua/molluschi	conteggio fitoplancton tossico/virus-batteri-biotossine-metalli pesanti
T6	03.06.2019	acqua	conteggio fitoplancton tossico
T7	01.07.2019	acqua	conteggio fitoplancton tossico
T8	29.07.2019 05.08.2019	acqua molluschi*	conteggio fitoplancton tossico/virus-batteri-biotossine-metalli pesanti
T9	02.09.2019	acqua	conteggio fitoplancton tossico
T10	11.10.2019	acqua	conteggio fitoplancton tossico
T11	02.12.2019	acqua/molluschi*	conteggio fitoplancton tossico/virus-batteri-biotossine-metalli pesanti

*solo ostriche a seguito della moria di tutti i mitili allevati

Nel dettaglio:

- a) **Analisi biotossicologiche (tossine idrosolubili e liposolubili), virologiche (*Norovirus* ed Epatite A) e microbiologiche (*E. coli*, *Salmonella* spp, *Vibrio parahaemolyticus*).** La presenza delle biotossine PSP (Paralytic Shellfish Poisoning) e DSP (Diarrheic Shellfish Poisoning) è stata determinata

secondo quanto previsto dalla metodica AOAC International 959.08 e dal Reg. EC. 15/2011. Per la determinazione del Virus dell'Epatite A (HAV) e dei *Norovirus* (NoV GI e NoV GII), è stata applicata la metodica ISO/TS 15216-2:2013. La quantificazione di *E. coli* è stata eseguita mediante il metodo MPN (Most Probable Number) riportato nella metodica di riferimento dell'Unione Europea ISO 16649-3:2015. La presenza di *Salmonella* spp. è stata determinata secondo quanto riportato nella metodica ISO 6579-1:2017. *V. parahaemolyticus* è stato determinato seguendo la metodica ISO/TS 21872-1:2017. Tutti i ceppi identificati come *V. parahaemolyticus* con metodiche tradizionali, sono stati sottoposti a test di conferma biomolecolare mediante PCR per il gene *toxR*. La determinazione dei geni associati con l'enteropatogenicità di *V. parahaemolyticus* (*tdh* e *trh*) è stata eseguita secondo quanto riportato da Bej et al. (1999).

b) **Analisi chimiche per metalli: Al, As, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Mn, Mo, Ni, Pb, Rb, Sn, Se, V, Zn.** La quantificazione degli elementi in traccia essenziali per la vita (cobalto, cromo, rame, ferro, manganese, molibdeno, nichel, rubinio, selenio, vanadio e zinco) e di quelli tossici per gli organismi viventi anche a basse concentrazioni (alluminio, arsenico, cadmio, piombo, e stagno) è stata eseguita mediante Spettrometro di Massa a Plasma ad Accoppiamento Induttivo (ICP-MS) secondo la metodica descritta da Squadrone et al. (2016).

c) **Identificazione e conteggio popolazione fitoplanctonica.** E' stato utilizzato il metodo di Utermöhl (1958) riportato nella metodica di riferimento dell'Unione Europea UNI EN 15204:2006.

2. Risultati

a) Analisi biotossicologiche (tossine idrosolubili e liposolubili), virologiche (Norovirus ed Epatite A) e microbiologiche (*E. coli*, *Salmonella* spp, *Vibrio parahaemolyticus*).

Tabella 2: *E. coli*, *Salmonella* spp., *V. parahaemolyticus*, HAV, NoV, PSP, DSP in mitili allevati nella Laguna del Calich

DATA	MATRICE	E.coli	Salmonella spp.	V. parahaemolyticus	HAV	NoV	PSP	DSP
04.02.2019	Mitili	9750 MPN/100 g	assente in 25 g	assente	assente	assente	assente	assente
04.03.2019	Ostriche	490 MPN/100 g	assente in 25 g	assente	assente	assente	assente	assente
06.05.2019	Mitili	1300 MPN/100 g	assente in 25 g	assente	assente	assente	assente	assente
06.05.2019	Ostriche	790 MPN/100 g	assente in 25 g	assente	assente	assente	assente	assente
05.08.2019	Ostriche	1700 MPN/100 g	assente in 25 g	assente	assente	assente	assente	assente
02.12.2019	Ostriche	1300 MPN/100 g	assente in 25 g	assente	assente	NoV GI e GII	assente	assente

4

b) Analisi chimiche per metalli: Al, Ag, As, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb, Se, Sn, Ta, Zn.

Tabella 3: Concentrazione degli elementi in traccia non essenziali in mitili allevati nella Laguna del Calich (mg/kg)

DATA	Al	As	Cd	Pb	Sn
04.02.2019	341,342	1,397	0,075	0,138	0,134
06.05.2019	96,008	1,094	0,037	0,046	0,059

Tabella 4: Concentrazione degli elementi in traccia non essenziali in ostriche allevate nella Laguna del Calich (mg/kg)

DATA	Al	As	Cd	Pb	Sn
04.03.2019	27,666	1,166	0,143	0,024	0,029
06.05.2019	31,565	1,547	0,187	0,026	0,015
05.08.2019	44,603	1,263	0,042	0,044	0,021
02.12.2019	112,356	1,335	0,024	0,059	0,066

Tabella 5: Concentrazione degli elementi in traccia essenziali in mitili allevati nella Laguna del Calich (mg/kg)

DATA	Co	Cr	Cu	Fe	Mn	Mo	Ni	Rb	Se	V	Zn
04.02.2019	0,084	0,249	0,967	167,163	3,634	0,274	0,346	0,785	0,860	0,553	29,698
06.05.2019	0,037	0,088	0,661	57,280	2,975	0,072	0,120	0,987	0,545	0,078	25,856

Tabella 6: Concentrazione degli elementi in traccia essenziali in ostriche allevate nella Laguna del Calich (mg/kg)

DATA	Co	Cr	Cu	Fe	Mn	Mo	Ni	Rb	Se	V	Zn
04.02.2019	0,017	0,032	5,633	53	1,966	0,238	0,034	0,55	0,393	0,026	112,666
06.05.2019	0,021	0,036	7,226	57,040	2,308	0,078	0,039	0,597	0,425	0,0301	117,846
05.08.2019	0,033	0,048	1,860	36,684	12,459	0,180	0,046	1,409	0,469	0,035	39,578
02.12.2019	0,028	0,074	5,424	66,433	5,199	0,097	0,076	0,928	0,356	0,099	92,707



c) Identificazione e conteggio popolazione fitoplanctonica

Gráfico 1: Densità totale mensile della popolazione fitoplanctonica nella Laguna del Calich (10³ cellule/L)

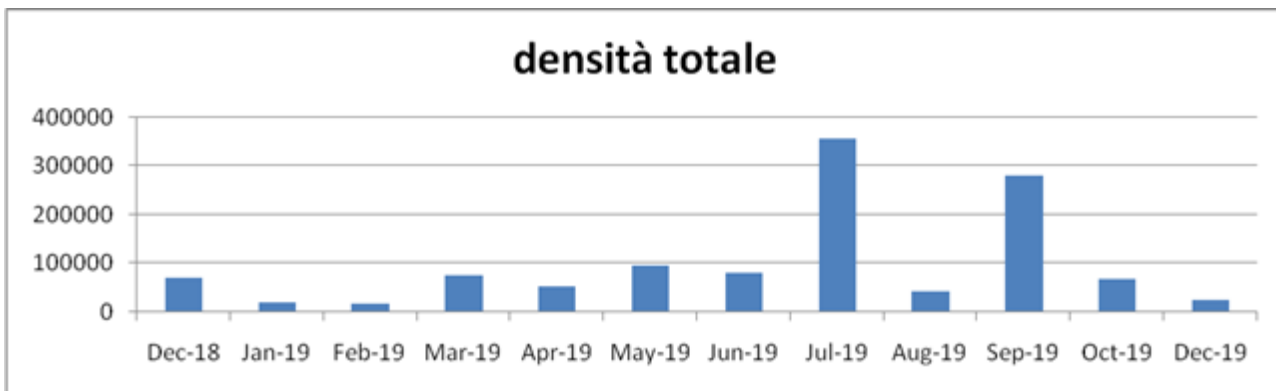
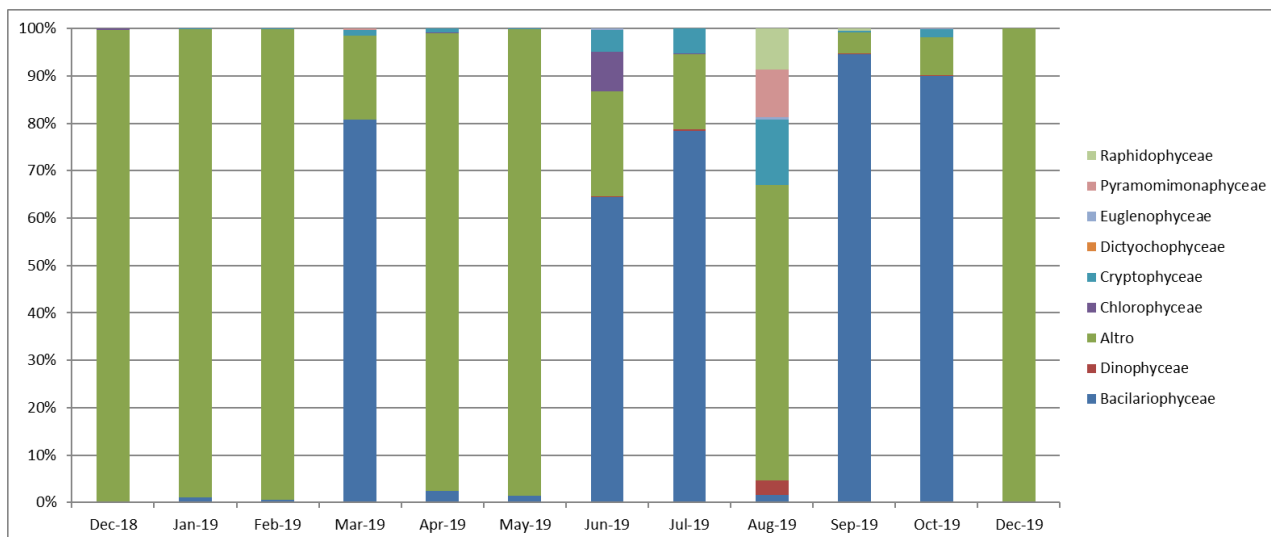


Gráfico 2: Distribuzione mensile delle classi algali nella Laguna del Calich



La cooperazione al cuore del Mediterraneo
La coopération au coeur de la Méditerranée

4. Considerazioni conclusive

Negli ultimi anni, diversi studi condotti nella Laguna di Calich hanno indagato le sue potenzialità come possibile sito di allevamento di molluschi bivalvi (Chessa et al., 2205; Pais et al., 2006; Pais et al., 2007; Cannas et al., 2011), la caratterizzazione della sua fauna ittica (Chessa et al., 2007), l'ecotossicologia della laguna (Ielmini et al., 2014), l'ecologia dei componenti planctonici (Rossi et al., 2006; Pulina et al., 2017) e più recentemente la determinazione dei contaminanti biotici ed abiotici nei molluschi bivalvi presenti nei banchi naturali della laguna (Esposito et al., 2018; Meloni et al., 2018; Bazzoni et al., 2019).

Molti di questi studi hanno evidenziato che la Laguna del Calich è un sistema altamente produttivo ed utilizzato principalmente per attività di pesca "tradizionale". Lo sfruttamento produttivo della laguna potrebbe essere notevolmente migliorato implementando diverse forme di acquacoltura ed in particolare di molluschicoltura.

In questo contesto, l'attività di UNISS_DMV nell'ambito dell'azione pilota T2.1.2, è stata caratterizzata da un approccio integrato che ha considerato l'influenza di fattori biotici (virali, batterici e fitoplanctonici) ed abiotici (metalli pesanti) sulla sicurezza alimentare dei molluschi bivalvi allevati.

Nel complesso, i risultati relativi al livello di contaminazione di *E. coli* nelle ostriche si sono sempre mantenuti al di sotto del limite stabilito per i molluschi bivalvi di classe B (< 4600 MPN/100 g). Tale limite è stato superato una sola volta in campioni di mitili (febbraio 2019). Tuttavia, considerando che per via di alcune problematiche legate alla vitalità di questi molluschi, non è stato possibile eseguire un monitoraggio di queste specie su base annuale, tale dato deve essere considerato come episodico e non significativo.

I valori relativi alle ostriche confermano quanto riportato da Bazzoni et al. (2019) in un recente studio su base annuale eseguito nei mitili raccolti dai banchi naturali della laguna.

Salmonella spp., *V. parahaemolyticus* e HAV non sono mai stati riscontrati. Solamente in un campione di ostriche relativo a dicembre 2019 è stata riscontrata la presenza di NoV GI e GII.

Tutti i campioni di molluschi sono risultati negativi per la presenza di PSP e DSP. Per quanto riguarda la componente fitoplanctonica, le *Bacillariophyceae* (o Diatomee) sono risultate la classe con il numero più alto di specie, insieme alle *Dinophyceae*. Le densità più elevate sono state raggiunte da cellule di piccole dimensioni: *Cyclotella* sp. (quasi 300 x 10⁶ cell/L in luglio 19), Ultraplancton (organismi più piccoli di 5 µm non identificati) e *Cryptophyceae* indeterminate. L'unica specie potenzialmente pericolosa riscontrata è stata *Dinophysis acuminata*, produttrice di tossine DSP, in agosto 2019. A differenza di quanto

recentemente riportato da Bazzoni et al. (2019), non è stata riscontrata la presenza di *Pseudo-nitzschia* spp. Da segnalare che in agosto 2019 sono state riscontrate due specie di *Raphidophyceae*, la cui presenza è associata a mortalità di pesci; i due taxa, insieme, hanno raggiunto una densità algale di quasi 3×10^6 cell/L.

Per quanto riguarda gli elementi in traccia tossici per gli organismi viventi anche a basse concentrazioni, il Reg. 1881/2006 definisce i limiti massimi per Cadmio e Piombo nei molluschi bivalvi, mentre non ci sono ancora limiti stabiliti dall'UE per gli altri metalli negli alimenti. I livelli riscontrati per Cadmio e Piombo erano ben al di sotto dei limiti legali. *I livelli più elevati* sono stati riscontrati per *l'Alluminio*. La quantificazione degli elementi in traccia essenziali non ha evidenziato la presenza di valori potenzialmente dannosi per gli esseri umani. I livelli più elevati sono stati riscontrati per Ferro e Zinco. I risultati relativi alla concentrazione dei metalli pesanti in ostriche e mitili allevati confermano sostanzialmente quanto recentemente riportato da Esposito et al. (2018) e Meloni et al. (2018) in vongole veraci e mitili raccolti dai banchi naturali della laguna del Calich.

5. Bibliografia

1. Bazzoni, Mudadu, Esposito, Urru, Ortu, Uda, Arras, Lorenzoni, Sanna, Bazzardi, Marongiu, Virgilio, Meloni (2019) "Bacteriological and viral investigation combined with determination of phytoplankton and algal biotoxins in mussels and water from a Mediterranean coastal lagoon" *Journal of Food Protection*, 82, 9, 1501-1511
2. Bej, A.K., D. P. Patterson, C. W. Brasher, M. C. Vickery, D. D. Jones, and C. A. Kaysner. 1999. Detection of total and hemolysin-producing *Vibrio parahaemolyticus* in shellfish using multiplex PCR amplification of *tl*, *tdh* and *trh*. *J. Microbiol. Methods* 36:215-225.
3. Cannas, A., S. Manca, M. Trentadue, and N. Fois. 2011. Population structure of carpet shell clam (*Ruditapes decussatus* L.) in two coastal lagoons of Sardinia (Italy). *Biol. Mar. Medit.* 18:298-299.
4. Chessa, L. A., F. Paesanti, A. Pais, M. Scardi, S. Serra, and L. Vitale. 2005. Perspectives for development of low impact aquaculture in a Western Mediterranean lagoon: the case of the carpet clam *Tapes decussatus*. *Aquac. Int.* 13:147-155.
5. Chessa, L. A., E. Casola, P. Lanera, A. Pais, N. Plastina, S. Serra, M. Scardi, L. M. Valiante, and D. Vinci. 2007. Is there a correspondence between dominant trophic group in benthic and fish fauna of the Calich lagoon? *Biol. Mar. Medit.* 14:290-291.
6. Esposito, Meloni, Abete, Colombero, Mantia, Pastorino, Prearo, Pais, Antuofermo, Squadrone (2018) "The bivalve *Ruditapes decussatus*: a biomonitor of trace elements pollution in Sardinian coastal lagoons (Italy)" *Environmental Pollution*, 242, 1720-1728
 Ielmini, S. E., G. Piredda, S. Mura, and G. F. Greppi. 2014. Protein biomarkers as indicator for water pollution in some lagoons of Sardinia (Italy). *Transit. Waters Bull.* 8:32-52.
7. Laore Sardegna-IZS Sardegna (2014) <http://www.sardegnaagricoltura.it/index.php?xsl=443&s=257341&v=2&c=3535>
8. Laore Sardegna-IZS Sardegna (2016) *Acquacoltura in Sardegna tradizioni, innovazione, sapori e ambiente*, <http://www.sardegnaagricoltura.it/index.php?xsl=443&s=311243&v=2&c=3535>
9. Meloni, Esposito, Abete, Colombero, Mantia, Mudadu, Bazzoni, Ortu, Prearo, Squadrone (2018) "Preliminary assessment of trace elements in *Mytilus galloprovincialis* from a coastal lagoon in Sardinia (Italy)". *Book of abstracts of Fish Forum FAO 2018*, 223-224.
10. Pais, A., L. A. Chessa, S. Serra, and A. Ruiu. 2006. An alternative suspended culture method for the Mediterranean carpet clam, *Tapes decussatus* (L.), in the Calich lagoon (north western Sardinia). *Biol. Mar. Medit.* 13:134-135.
11. Pais, A., L. A. Chessa, S. Serra, A. Ruiu, and G. Meloni. 2007. Suspended culture of *Ostrea edulis* in the Calich lagoon (north western Sardinia, Italy): preliminary results. *Ital. J. Anim. Sci.* 6:810-810.
12. Pulina, S., C. T. Satta, B. M. Padedda, A. M. Bazzoni, N. Sechi, and A. Lugliè. 2017. Picophytoplankton seasonal dynamics and interactions with environmental variables in three Mediterranean coastal lagoons. *Estuar. Coast.* 40:469-478.

13. Rossi, F., A. Castelli, and C. Lardicci. 2006. Distribution of macrobenthic assemblages along a marine gradient in Mediterranean eutrophic coastal lagoons. *Mar. Ecol.* 27:66–75.
14. Squadrone, S., Brizio, P., Stella, C., Prearo, M., Pastorino, P., Serracca, L., Ercolini, C., Abete, M.C. (2016). Presence of trace metals in aquaculture marine ecosystems of the northwestern Mediterranean Sea (Italy). *Environmental Pollution* 215, 77-83
15. Utermöhl, H. 1958. Zur vervollkommnung der quantitativen phytoplankton- methodik. *Verh. Int. Verein. Theor. Angew. Limnol.* 9:1–39.

Rapport établi par le département de médecine vétérinaire de l'université de Sassari

La connaissance et la compréhension des processus écologiques sont un outil indispensable pour favoriser l'utilisation durable de l'environnement lagunaire, ainsi que pour évaluer d'éventuels changements en cours, afin de préserver la biodiversité et d'atténuer les effets des nuisances causées par les activités humaines.

Actuellement, la lagune du Calich n'est pas une zone classée pour la production de mollusques bivalves et pour ceux qui sont présents dans des bancs naturels, pour des raisons d'hygiène et de santé, actuellement il y a interdiction de récolte et de commercialisation. La classification des zones de production relève du Service Pêche et Aquaculture de l'Assessorat à l'Agriculture de la Région Sardaigne : le lancement de la procédure de demande de classement d'une zone de production de mollusques nécessite une vérification préalable de la qualité des eaux et une approche polyphasique de la bio-surveillance fondée sur l'analyse des risques.

La biosurveillance, par rapport aux évaluations directes sur les différentes matrices organiques et inorganiques, répond mieux à la nécessité d'effectuer un contrôle basé sur une densité élevée de points d'échantillonnage, en utilisant des organismes "sensibles" capables de faire fonction d'"indicateurs" de la qualité de l'environnement et de fournir des informations utiles sur les répercussions biologiques de la contamination bactérienne, virale, par les métaux lourds et les biotoxines d'algues sur la santé humaine.

La biosurveillance au moyen de mollusques bivalves est aujourd'hui considérée comme l'une des approches les plus complètes pour évaluer la pollution de l'environnement lagunaire et ses effets biologiques potentiels. La détermination des contaminants biotiques et abiotiques dans les mollusques constitue un instrument valable d'évaluation indirecte de l'eau et de l'impact de l'environnement sur les caractéristiques hygiéniques et sanitaires des bivalves.

Dans ce contexte, aux termes du protocole d'accord signé entre les organismes participant à l'action pilote T2.1.2 - "RÉALISATION D'UNE STATION EXPÉRIMENTALE D'ÉLEVAGE BIVALVE", et approuvé par le Conseil de Département de Médecine Vétérinaire de l'Université de Sassari (ci-après : UNISS_DMV) a effectué, lors de sa séance du 21 janvier 2019, la détermination des contaminants abiotiques et biotiques chez les animaux d'élevage, les moules (*Mytilus galloprovincialis*) et les huîtres (*Crassostrea gigas*)

Plus précisément, le plan opérationnel prévoyait:

La cooperazione al cuore del Mediterraneo
La coopération au coeur de la Méditerranée

- a) échantillonnages trimestriels de moules et d’huîtres pour des analyses bio-toxicologiques (toxines hydrosolubles et liposolubles), virologiques (Norovirus et hépatite A) et microbiologiques (E. coli, Salmonella spp, Vibrio parahaemolyticus)
- b) échantillonnages trimestriels de moules et d’huîtres pour l’analyse chimique des métaux : Al, As, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Mn, Mo, Ni, Pb, Rb, Sn, Se, V, Zn;
- c) échantillonnage mensuel d’eau sur 2 points avec identification et comptage de la population phytoplanctonique.

1. Matériaux et méthodes

Le tableau 1 résume la programmation des échantillonnages effectués:

ÉCHANTILLONNAGE	DATE	MATRICE	PARAMÈTRES
T0	03.12.2018	eau	dénombrement du phytoplancton toxique
T1	07.01.2019	eau	dénombrement du phytoplancton toxique
T2	04.02.2019	eau/mollusques (moules)	dénombrement phytoplancton toxique/virus-bactéries-biotoxines-métaux lourds
T3	04.03.2019	eau/mollusques (huîtres)	dénombrement phytoplancton toxique/virus-bactéries-biotoxines-métaux lourds
T4	01.04.2019	eau	dénombrement du phytoplancton toxique
T5	06.05.2019	eau/mollusques	dénombrement phytoplancton toxique/virus-bactéries-biotoxines-métaux lourds
T6	03.06.2019	eau	dénombrement du phytoplancton toxique
T7	01.07.2019	eau	dénombrement du phytoplancton toxique
T8	29.07.2019 05.08.2019	eau/mollusques *	dénombrement phytoplancton toxique/virus-bactéries-biotoxines-métaux lourds
T9	02.09.2019	eau	dénombrement du phytoplancton toxique
T10	11.10.2019	eau	dénombrement du phytoplancton toxique
T11	02.12.2019	eau/mollusques *	dénombrement phytoplancton toxique/virus-bactéries-biotoxines-métaux lourds

* uniquement huîtres après la mort de toutes les moules élevées

Dans le détail:

- a) **Analyse biotoxicologique (toxines hydrosolubles et liposolubles), virologique (Norovirus et hépatite A) et microbiologique (E. coli, Salmonella spp, Vibrio parahaemolyticus).** La présence des biotoxines PSP (Paralytic Shellfish Poisoning) et DSP (Diarrheic Shellfish Poisoning) a été déterminée conformément à la méthode AOAC

International 959.08 et au Reg. EC. 15/2011. Pour la détermination du virus de l'hépatite A (HAV) et du norovirus (Nov GI et Nov GII), la méthode ISO/TS 15216-2:2013 a été appliquée. La quantification d'E. coli a été réalisée à l'aide de la méthode MPN (Most Probable Number) décrite dans la méthode de référence de l'Union européenne ISO 16649-3:2015. La présence de Salmonella spp. a été déterminée conformément à la méthode ISO 6579-1:2017. V. parahaemolyticus a été déterminé selon la méthode ISO/TS 21872-1:2017. Toutes les souches identifiées comme V. parahaemolyticus selon des méthodes traditionnelles ont été soumises à des tests de confirmation biomoléculaires par PCR pour le gène toxR. La détermination des gènes associés à l'entéropathogénicité de V. parahaemolyticus (tdh et trh) a été réalisée selon Bej et al. (1999).

b) Analyses chimiques pour métaux : Al, As, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Mn, Mo, Ni, Pb, Rb, Sn, Se, V, Zn. La quantification des oligoéléments essentiels à la vie (cobalt, chrome, cuivre, fer, manganèse, molybdène, nickel, rubis, sélénium, vanadium et zinc) et de ceux toxiques pour les organismes vivants, même à faible concentration (aluminium, arsenic, cadmium, plomb et étain) a été réalisée par spectromètre de masse à plasma à couplage inductif (ICP-MS) selon la méthode décrite par Squadrone et al. (2016).

c) Identification et comptage de la population phytoplanctonique. La méthode de Utermöhl (1958) décrite dans la méthode de référence de l'Union européenne UNI EN 15204:2006 a été utilisée.

2. Résultats

a) Analyse biotoxologique (toxines hydrosolubles et liposolubles), virologique (Norovirus et hépatite A) et microbiologique (E. coli, Salmonella spp, Vibrio parahaemolyticus).

Tableau 2 :

E. coli, Salmonella spp. , V. parahaemolyticus, HAV, Nov, PSP, DSP in moules élevés dans la lagune du Calich

DATE	MATRICE	E.coli	Salmonella spp.	V. parahaemolyticus	HAV	NoV	PSP	DSP
04.02.2019	mollusques	9750 MPN/100 g	absence dans 25 g	absence	absence	absence	absence	absence
04.03.2019	huîtres	490 MPN/100 g	assente in 25 g	absence	absence	absence	absence	absence
06.05.2019	mollusques	1300 MPN/100 g	assente in 25 g	absence	absence	absence	absence	absence
06.05.2019	huîtres	790 MPN/100 g	assente in 25 g	absence	absence	absence	absence	absence
05.08.2019	huîtres	1700 MPN/100 g	assente in 25 g	absence	absence	absence	absence	absence
02.12.2019	huîtres	1300 MPN/100 g	assente in 25 g	absence	absence	NoV GI e GII	absence	absence

13

b) Analyses chimiques pour métaux : Al, Ag, As, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb, Se, Sn, Ta, Zn.

Tableau 3 : Concentration des oligoéléments non essentiels dans les moules élevés dans la lagune du Calich (mg/kg)

DATE	Al	As	Cd	Pb	Sn
04.03.2019	27,666	1,166	0,143	0,024	0,029
06.05.2019	31,565	1,547	0,187	0,026	0,015
05.08.2019	44,603	1,263	0,042	0,044	0,021
02.12.2019	112,356	1,335	0,024	0,059	0,066

Tableau 4 : Concentration des oligoéléments non essentiels dans les huîtres élevées dans la lagune du Calich (mg/kg)

DATE	Al	As	Cd	Pb	Sn
04.03.2019	27,666	1,166	0,143	0,024	0,029
06.05.2019	31,565	1,547	0,187	0,026	0,015
05.08.2019	44,603	1,263	0,042	0,044	0,021
02.12.2019	112,356	1,335	0,024	0,059	0,066

Tableau 5 : Concentration des oligoéléments essentiels en moules élevés dans la lagune du Calich (mg/kg)

DATE	Co	Cr	Cu	Fe	Mn	Mo	Ni	Rb	Se	V	Zn
04.02.2019	0,084	0,249	0,967	167,163	3,634	0,274	0,346	0,785	0,860	0,553	29,698
06.05.2019	0,037	0,088	0,661	57,280	2,975	0,072	0,120	0,987	0,545	0,078	25,856

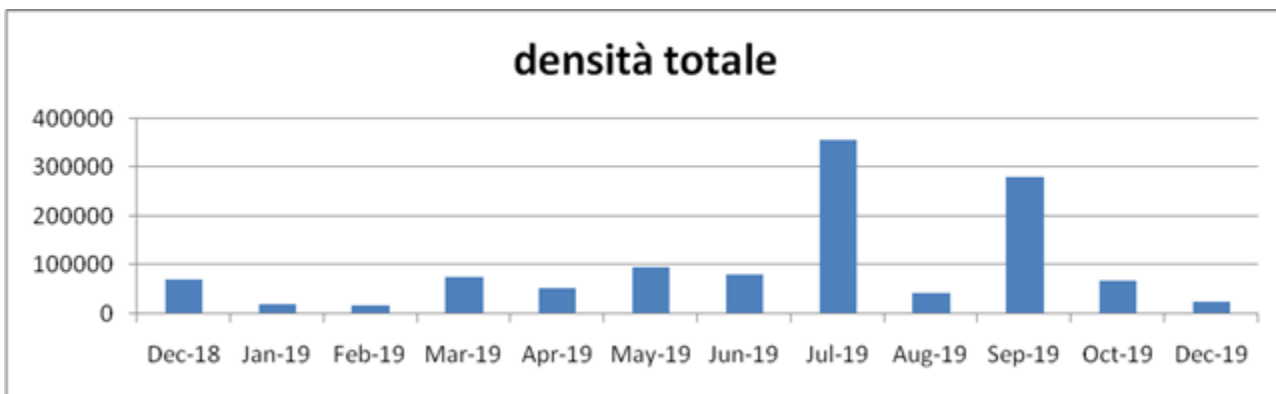
La cooperazione al cuore del Mediterraneo
 La coopération au coeur de la Méditerranée

Tableau 6 : Concentration des oligoéléments essentiels dans les huîtres élevées dans la lagune du Calich (mg/kg)

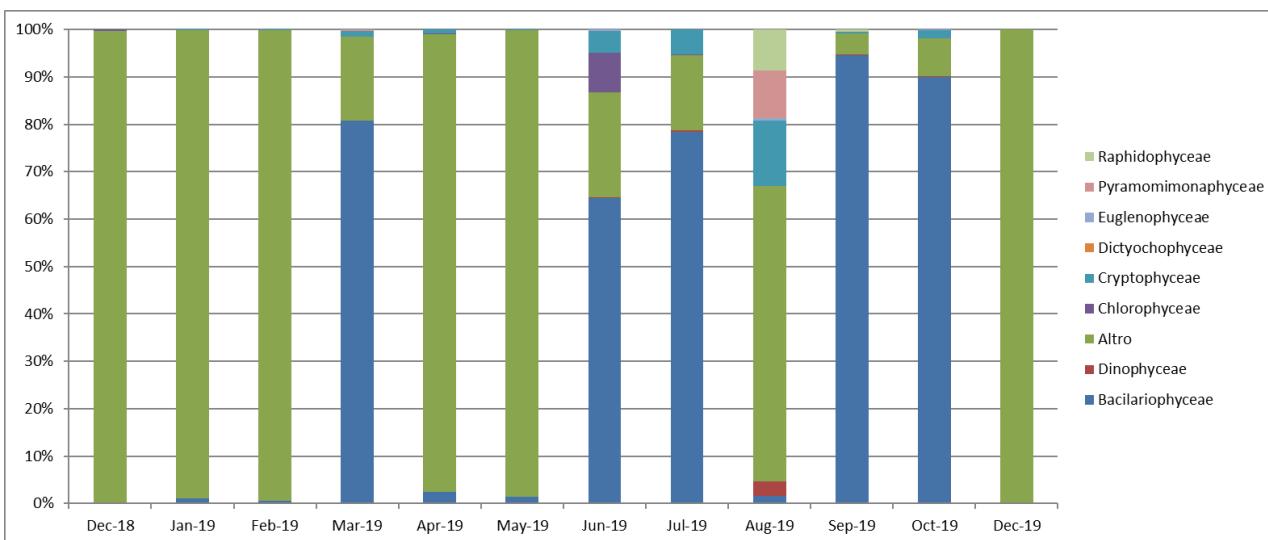
DATA	Co	Cr	Cu	Fe	Mn	Mo	Ni	Rb	Se	V	Zn
04.02.2019	0,017	0,032	5,633	53	1,966	0,238	0,034	0,55	0,393	0,026	112,666
06.05.2019	0,021	0,036	7,226	57,040	2,308	0,078	0,039	0,597	0,425	0,0301	117,846
05.08.2019	0,033	0,048	1,860	36,684	12,459	0,180	0,046	1,409	0,469	0,035	39,578
02.12.2019	0,028	0,074	5,424	66,433	5,199	0,097	0,076	0,928	0,356	0,099	92,707

c) Identification et comptage de la population phytoplanctonique

Graphique 1 : Densité mensuelle totale de la population phytoplanctonique dans la lagune du Calich (103 cellules/l)



GRAPHIQUE 2 : Répartition mensuelle des classes d'algues dans la lagune du Calich



La cooperazione al cuore del Mediterraneo
La coopération au coeur de la Méditerranée

4. Conclusions

Ces dernières années, plusieurs études menées dans la lagune de Calich ont étudié ses potentialités en tant que site possible d'élevage de mollusques bivalves (Chessa et al., 2005; Pais et al., 2006; Pais et al., 2007; Cannas et al., 2011), la caractérisation de sa faune piscicole (Chessa et al., 2007), l'écotoxicologie de la lagune (Ielmini et al., 2014), l'écologie des composants planctoniques (Rossi et al., 2006; Pulina et al., 2017) et plus récemment la détermination des contaminants biotiques et abiotiques dans les mollusques bivalves présents dans les bancs naturels de la lagune (Esposito et al., 2018; Meloni et al., 2018; Bazzoni et al., 2019).

Beaucoup de ces études ont mis en évidence que la lagune du Calich est un système hautement productif et utilisé principalement pour des activités de pêche "traditionnelle". L'exploitation productive de la lagune pourrait être considérablement améliorée par la mise en œuvre de différentes formes d'aquaculture et notamment de conchyliculture.

Dans ce contexte, l'activité d'UNISS_DMV dans le cadre de l'action pilote T2.1.2 a été caractérisée par une approche intégrée qui a considéré l'influence de facteurs biotiques (viraux, bactériens et phytoplanctoniques) et abiotiques (métaux lourds) la sécurité alimentaire des mollusques bivalves d'élevage.

Dans l'ensemble, les résultats concernant le niveau de contamination d'E. coli dans les huîtres ont toujours été inférieurs à la limite fixée pour les mollusques bivalves de classe B (4600 NPP/100 g). Cette limite a été dépassée une seule fois dans des échantillons de moules (février 2019). Toutefois, compte tenu de certains problèmes liés à la vitalité de ces mollusques, il n'a pas été possible de contrôler ces espèces sur une base annuelle, ce chiffre doit être considéré comme épisodique et non significatif.

Les valeurs relatives aux huîtres confirment ce que rapporte Bazzoni et al. (2019) dans une récente étude annuelle effectuée sur les moules récoltées par les bancs naturels de la lagune. Salmonella spp. , V. parahaemolyticus et HAV n'ont jamais été détectés. Seul un échantillon d'huîtres de décembre 2019 a permis de détecter la présence de Nov GI et de GII.

Tous les échantillons de mollusques se sont révélés négatifs en raison de la présence de PSP et de DSP. En ce qui concerne la composante phytoplanctonique, les Bacillariophyceae (ou Diatomee) étaient la classe ayant le plus grand nombre d'espèces, avec les Dinophyceae. Les densités les plus élevées ont été atteintes par les cellules de petite taille : Cyclotella sp. (presque 300 x 10⁶ cell/L en juillet 19) , Ultraplanton (organismes de plus petite taille que 5 µm non identifiés) et Cryptophyceae indéterminée. La seule espèce potentiellement dangereuse a été Dinophysis acuminata, productrice de toxines DSP, en août 2019. Contrairement à ce qui a été rapporté récemment par Bazzoni et al. (2019), la présence de Pseudo-nitzschia spp. Il convient de signaler qu'en août 2019, deux espèces de Raphidophyceae ont été détectées, dont la présence est associée à une mortalité de poissons; les deux taxons, ensemble, ont atteint une densité algale de près de 3 x 10⁶ cellules/L.

En ce qui concerne les traces toxiques pour les organismes vivants, même à faible concentration, le Règ. 1881/2006 fixe des limites maximales pour le cadmium et le plomb dans les mollusques bivalves, alors qu'il n'existe pas encore de limites fixées par l'UE pour les autres métaux dans les aliments. Les niveaux observés pour le cadmium et le plomb étaient bien en dessous des limites légales. Les niveaux les plus élevés ont été observés pour l'aluminium. La quantification des oligoéléments essentiels n'a pas mis en évidence la présence de valeurs potentiellement dangereuses pour l'homme. Les niveaux les plus élevés ont été observés pour le fer et le zinc. Les résultats relatifs à la concentration des métaux lourds dans les huîtres et les moules élevées confirment essentiellement ce qui a été récemment rapporté par Esposito et al. (2018) et Meloni et al. (2018) dans des palourdes et des moules provenant des bancs naturels de la lagune du Calich.

La cooperazione al cuore del Mediterraneo
 La coopération au coeur de la Méditerranée

5. Bibliographie

1. Bazzoni, Mudadu, Esposito, Urru, Ortu, Uda, Arras, Lorenzoni, Sanna, Bazzardi, Marongiu, Virgilio, Meloni (2019) "Bacteriological and viral investigation combined with determination of phytoplankton and algal biotoxins in mussels and water from a Mediterranean coastal lagoon" *Journal of Food Protection*, 82, 9, 1501-1511
2. Bej, A.K., D. P. Patterson, C. W. Brasher, M. C. Vickery, D. D. Jones, and C. A. Kaysner. 1999. Detection of total and hemolysin-producing *Vibrio parahaemolyticus* in shellfish using multiplex PCR amplification of *tdh*, *tdh* and *trh*. *J. Microbiol. Methods* 36:215–225.
3. Cannas, A., S. Manca, M. Trentadue, and N. Fois. 2011. Population structure of carpet shell clam (*Ruditapes decussatus* L.) in two coastal lagoons of Sardinia (Italy). *Biol. Mar. Medit.* 18:298–299.
4. Chessa, L. A., F. Paesanti, A. Pais, M. Scardi, S. Serra, and L. Vitale. 2005. Perspectives for development of low impact aquaculture in a Western Mediterranean lagoon: the case of the carpet clam *Tapes decussatus*. *Aquac. Int.* 13:147–155.
5. Chessa, L. A., E. Casola, P. Lanera, A. Pais, N. Plastina, S. Serra, M. Scardi, L. M. Valiante, and D. Vinci. 2007. Is there a correspondence between dominant trophic group in benthic and fish fauna of the Calich lagoon? *Biol. Mar. Medit.* 14:290–291.
6. Esposito, Meloni, Abete, Colombero, Mantia, Pastorino, Prearo, Pais, Antuofermo, Squadrone (2018) "The bivalve *Ruditapes decussatus*: a biomonitor of trace elements pollution in Sardinian coastal lagoons (Italy)" *Environmental Pollution*, 242, 1720-1728
7. Ielmini, S. E., G. Piredda, S. Mura, and G. F. Greppi. 2014. Protein biomarkers as indicator for water pollution in some lagoons of Sardinia (Italy). *Transit. Waters Bull.* 8:32–52.
7. Laore Sardegna-IZS Sardegna (2014)
<http://www.sardegnaagricoltura.it/index.php?xsl=443&s=257341&v=2&c=3535>
8. Laore Sardegna-IZS Sardegna (2016) *Acquacoltura in Sardegna tradizioni, innovazione, sapori e ambiente*,
<http://www.sardegnaagricoltura.it/index.php?xsl=443&s=311243&v=2&c=3535>

9. Meloni, Esposito, Abete, Colombero, Mantia, Mudadu, Bazzoni, Ortu, Prearo, Squadrone (2018) "Preliminary assessment of trace elements in *Mytilus galloprovincialis* from a coastal lagoon in Sardinia (Italy)". Book of abstracts of Fish Forum FAO 2018, 223-224.
10. Pais, A., L. A. Chessa, S. Serra, and A. Ruiu. 2006. An alternative suspended culture method for the Mediterranean carpet clam, *Tapes decussatus* (L.), in the Calich lagoon (north western Sardinia). *Biol. Mar. Medit.* 13:134–135.
11. Pais, A., L. A. Chessa, S. Serra, A. Ruiu, and G. Meloni. 2007. Suspended culture of *Ostrea edulis* in the Calich lagoon (north western Sardinia, Italy): preliminary results. *Ital. J. Anim. Sci.* 6:810–810.
12. Pulina, S., C. T. Satta, B. M. Padedda, A. M. Bazzoni, N. Sechi, and A. Lugliè. 2017. Picophytoplankton seasonal dynamics and interactions with environmental variables in three Mediterranean coastal lagoons. *Estuar. Coast.* 40:469–478.
13. Rossi, F., A. Castelli, and C. Lardicci. 2006. Distribution of macrobenthic assemblages along a marine gradient in Mediterranean eutrophic coastal lagoons. *Mar. Ecol.* 27:66–75.
14. Squadrone, S., Brizio, P., Stella, C., Prearo, M., Pastorino, P., Serracca, L., Ercolini, C., Abete, M.C. (2016). Presence of trace metals in aquaculture marine ecosystems of the northwestern Mediterranean Sea (Italy). *Environmental Pollution* 215, 77-83
15. Utermöhl, H. 1958. Zur vervollkommnung der quantitativen phytoplankton- methodik. *Verh. Int. Verein. Theor. Angew. Limnol.* 9:1–39.