

**ISTITUTO SUPERIORE DI SANITÀ**

**Cianobatteri potenzialmente tossici:  
aspetti ecologici, metodologici  
e valutazione del rischio**

A cura di  
Enzo Funari, Simona Scardala ed Emanuela Testai  
*Dipartimento di Ambiente e Connessa Prevenzione Primaria*

ISSN 1123-3117  
**Rapporti ISTISAN**  
**08/6**

Istituto Superiore di Sanità

**Cianobatteri potenzialmente tossici: aspetti ecologici, metodologici e valutazione del rischio.**

A cura di Enzo Funari, Simona Scardala ed Emanuela Testai

2008, 92 p. Rapporti ISTISAN 08/6

I cianobatteri sono un gruppo ubiquitario di procarioti in grado di fotosintetizzare, che possono raggiungere densità elevate e formare fioriture e schiume, soprattutto nelle acque superficiali interne eutrofiche. Molte specie di cianobatteri producono, come metaboliti secondari, alcune cianotossine, che rappresentano un potenziale rischio per la salute dell'uomo. Sulla base delle loro proprietà tossicologiche, le cianotossine vengono raggruppate in: epatotossine, neurotossine, citotossine, tossine con potenziale irritante, in grado di agire anche sul sistema gastrointestinale. L'uomo può essere esposto alle cianotossine attraverso la via orale, che è di gran lunga la più importante, a seguito dell'ingestione di acqua potabile, alimenti, alcuni supplementi alimentari o di acqua durante le attività di balneazione. L'esposizione ad elevati livelli di cianotossine nelle acque potabili e di balneazione è stata associata ad effetti acuti e a breve termine nell'uomo. L'esposizione cronica a bassi livelli di cianotossine rappresenta un motivo di preoccupazione per la salute umana, i cui possibili effetti rimangono un argomento critico da approfondire. Questo rapporto riassume le informazioni ecologiche, chimiche, tossicologiche, epidemiologiche disponibili su questa problematica, identifica gli scenari di esposizione a rischio e, ove possibile, fornisce valori di riferimento.

*Parole chiave:* Cianobatteri, Cianotossine, Aspetti ecologici, Metodi di analisi, Valutazione del rischio

Istituto Superiore di Sanità

**Potentially toxic cyanobacteria: ecological and methodological aspects and risk evaluation.**

Edited by Enzo Funari, Simona Scardala and Emanuela Testai

2008, 92 p. Rapporti ISTISAN 08/6 (in Italian)

Cyanobacteria are a ubiquitous group of photosynthetic procariota. Especially in eutrophic inland surface waters, they attain high densities and may form blooms and scums. Several cyanobacterial species produce, as secondary metabolites, cyanotoxins which can threaten human health. On the basis of their toxicological properties they are grouped into: hepatotoxins, neurotoxins, cytotoxins, toxins with irritating potential, also acting on the gastrointestinal system. Humans may be exposed to cyanotoxins via the oral route, which is by far the most important, as a consequence of ingesting contaminated drinking water, food, some dietary supplements or water during recreational activities. High levels of cyanotoxins in drinking and bathing waters have been associated with acute and short-term toxic effects in humans. Some concern is raised also with respect to the chronic exposure to low cyanotoxin levels, whose effects remain a critical issue to be clarified. This report summarizes the ecological, chemical, methodological, toxicological and epidemiological information available on this issue, identifies the actual risky exposure scenarios, and, when possible, provides reference values.

*Key words:* Cyanobacteria, Cyanotoxins, Ecological aspects, Methods of analysis, Risk assessment

Per informazioni su questo documento scrivere a: [enzo.funari@iss.it](mailto:enzo.funari@iss.it)

Il rapporto è accessibile online dal sito di questo Istituto: [www.iss.it](http://www.iss.it).

Citare questo documento come segue:

Funari E, Scardala S, Testai E (Ed.). *Cianobatteri potenzialmente tossici: aspetti ecologici, metodologici e valutazione del rischio*. Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2008. (Rapporti ISTISAN 08/6).

---

Presidente dell'Istituto Superiore di Sanità e Direttore responsabile: *Enrico Garaci*  
Registro della Stampa - Tribunale di Roma n. 131/88 del 1° marzo 1988

Redazione: *Paola De Castro, Sara Modigliani e Sandra Salinetti*  
La responsabilità dei dati scientifici e tecnici è dei singoli autori.

© Istituto Superiore di Sanità 2008

# INDICE

<b>Introduzione</b> .....	1
<b>Distribuzione e fisiologia dei cianobatteri potenzialmente tossici in Italia</b> <i>Daniela Mattei, Mara Stefanelli</i> .....	4
<b>Metodi chimici per la rilevazione delle cianotossine</b> <i>Simona Scardala, Sara Bogialli, Antonio Di Corcia</i> .....	30
<b>Metodi biologici per la rilevazione delle cianotossine</b> <i>Emanuela Testai, Daniela Mattei</i> .....	49
<b>Metodi genetici nell'identificazione di cianobatteri e della loro potenziale tossicità</b> <i>Susanna Vichi, Simonetta Gemma, Emanuela Testai</i> .....	59
<b>Valutazione del rischio associato alla esposizione a cianotossine</b> <i>Enzo Funari, Emanuela Testai</i> .....	68
<b>Indirizzi internazionali per la tutela della salute</b> <i>Enzo Funari, Simona Scardala, Emanuela Testai</i> .....	89



## INTRODUZIONE

I cianobatteri sono un gruppo di batteri fotosintetici distribuiti in tutto il pianeta. Nei corpi idrici superficiali eutrofici possono raggiungere densità molto elevate, formare fioriture e schiume. Molte specie di cianobatteri producono tossine e per questa ragione possono essere annoverati tra i microrganismi patogeni emergenti (Bruno *et al.*, 2003). I cianobatteri non sembrano in grado di colonizzare, invadere organismi animali. Tuttavia, è stato dimostrato che possono comportarsi come microrganismi eterotrofi e stabilire un rapporto di simbiosi con piante tropicali (Cox *et al.*, 2003). Inoltre, non può essere del tutto esclusa la possibilità di un rapporto di simbiosi anche in organismi animali (Stipa *et al.*, 2006).

Sono caratterizzati da una grande variabilità morfologica, con forme unicellulari, coloniali e filamentose. In genere le cellule sono circondate da uno strato gelatinoso o mucillaginoso, che permette loro di sopravvivere anche in condizioni di siccità (Whitton, 1992). Sono presenti soprattutto nell'ambiente acquatico, dove possono sopportare notevoli variazioni di salinità e temperatura e fotosintetizzare anche in condizioni di bassa intensità luminosa (Rai, 1990). La loro maggiore diffusione si verifica nei laghi naturali e negli invasi artificiali.

Molti cianobatteri d'acqua dolce producono come metaboliti secondari una grande varietà di cianotossine. Nel 50-75% dei casi, la tossicità delle fioriture di cianobatteri è dovuta alla presenza contemporanea di diverse tossine (An & Carmichael, 1994), la cui percentuale relativa e distribuzione spaziale può subire variazioni, determinando differenze di tossicità della fioritura.

La stessa specie di cianobatteri può essere associata sia a fioriture tossiche che non tossiche. Nel caso delle microcistine, è stato dimostrato che la tossicità di un ceppo dipende dalla presenza di un gene che codifica per la produzione della tossina e che le popolazioni naturali sono generalmente costituite da cianobatteri con entrambi i genotipi; conseguentemente il contenuto di microcistine non può essere correlato direttamente alla biomassa (Kurmayer *et al.*, 2002).

Le concentrazioni delle microcistine nei corpi idrici sono soggette ad una notevole variabilità (Sivonen & Jones, 1999), che viene attribuita a due tipologie di fattori: le condizioni ambientali, che potrebbero influenzare la velocità di produzione delle tossine, e la dinamica delle popolazioni, che altera la proporzione dei genotipi tossici all'interno della popolazione di cianobatteri (Dittmann & Börner, 2005).

La produzione di microcistine in colture di *Microcystis* mostra una correlazione diretta con la velocità di crescita della popolazione, in condizioni di limitazione di azoto (Orr & Jones, 1998). I fattori ambientali che influiscono sulla produzione di cianotossine sono numerosi; includono luce, età della cultura, temperatura, pH e concentrazione di nutrienti. Tuttavia gli studi condotti per valutare il contenuto cellulare di microcistine in condizioni nelle quali venivano modificati i valori di questi parametri hanno dato luogo ad una variabilità contenuta, non superiore ad un fattore cinque (Sivonen & Jones, 1999).

Le cianotossine possono essere classificate in categorie che rispecchiano gli effetti osservati nei sistemi fisiologici, a carico degli organi e dei tessuti primariamente colpiti (Codd *et al.*, 2005). Includono:

- *epatotossine*  
(oltre 80 varianti di microcistine, 6 varianti note di nodularine);
- *neurotossine*  
(anatoxina-a, omoanatoxina-a, anatoxina a-(S), 20 varianti note di saxitossine);

- *citotossine*  
(cilindrospermopsina);
- *endotossine lipopolisaccaridiche*  
(disturbi gastrointestinali e infiammatori);
- *tossine gastrointestinali prodotte da cianobatteri marini*  
(aplisiatossina, debromoapsiatossina, lingbiatossina).

Sono state inoltre identificate altre cianotossine per le quali il profilo tossicologico o ecotossicologico è ancora molto parziale, come la microviridina J (Rohrlach *et al.*, 2003) e la  $\beta$ -N-metilammino-L-alanina (Cox *et al.*, 2005).

La problematica dei cianobatteri nei suoi diversi aspetti è all'attenzione della comunità scientifica internazionale, come è facilmente dimostrabile dall'elevatissimo crescente numero di pubblicazioni scientifiche disponibili, in particolare in relazione agli aspetti ecologici e metodologici.

Un certo ritardo è invece individuabile nel settore della valutazione del rischio, che inevitabilmente si riflette nella carenza di normative adeguate a tutela della salute delle popolazioni.

Negli anni recenti, tuttavia, sono state avviate importanti iniziative per colmare questo ritardo da parte di organizzazioni internazionali prestigiose, come l'Organizzazione Mondiale della Sanità e l'Agenzia Internazionale per la Ricerca sul Cancro (WHO, 2003, 2004; IARC, 2006).

In questo Rapporto vengono presentate le attuali conoscenze disponibili su questa problematica con un'attenzione particolare a quelle che permettono di valutare il rischio per la salute umana associato alle diverse fonti e vie di esposizione alle cianotossine.

## Bibliografia

- An J, Carmichael WW. Use of a colorimetric protein phosphatase inhibition assay and enzyme linked immunosorbent assay for the study of microcystins and nodularins. *Toxicon* 1994;32:1495-507.
- Codd GA, Morrison LF, Metcalf JS. Cyanobacterial toxins: risk management for health protection. *Toxicol Appl Pharmacol* 2005;203:264-72.
- Cox PA, Banack SA, Murch SJ. Biomagnification of cyanobacterial neurotoxins and neurodegenerative disease among the Chamorro people of Guam. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:13380-3.
- Cox PA, Banack SA, Murch SJ, Rasmussen U, Tien G, Bidigare RR, Metcalf JS, Morrison LF, Codd GA, Bergman B. Diverse taxa of cyanobacteria produce beta-N-methylamino-L-alanine, a neurotoxic amino acid. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2005;102:5074-8.
- Dittmann E, Börner T. Genetic contributions to the risk assessment of microcystin in the environment. *Toxicol Appl Pharmacol* 2005;203:192-200.
- IARC. Cyanobacterial peptide toxins. In: *Ingested nitrates and nitrites, and cyanobacterial peptide toxins*. Vol. 94. International Agency for Research on Cancer; 2006. Disponibile all'indirizzo: <http://monographs.iarc.fr/ENG/Meetings/94-cyanobacterial.pdf> 2006; ultima consultazione 30/12/2007.
- Kurmayer R, Dittman E, Fastner J, Chorus I. Diversity of microcystin genes within a population of the toxic cyanobacterium *Microcystis* spp. in lake Wannsee (Berlin, Germany). *Microb Ecology* 2002;43:107-18.
- Bruno M, Scaradala S, Funari E. Cyanobacteria in drinking waters and related risks to human health. In: *Expert meeting on emerging risks to drinking water supplies: best practice for improved management and preparedness to protect public health*; Cuernavaca (Messico), 28-30 luglio 2003. OECD; 2003. p.

8. Disponibile all'indirizzo: <http://www.oecd.org/dataoecd/21/57/4871029.PDF>; ultima consultazione 30/12/2007.
- Orr PT, Jones GJ. Relationship between microcystin production and cell division rates in nitrogen-limited *Microcystis aeruginosa* cultures. *Limnol Oceanogr* 1998;43:1604-14.
- Rai AN (Ed.). *CRC handbook of symbiotic cyanobacteria*. Boca Raton (FL, USA): CRC Press; 1990.
- Rohrlack T, Christoffersen K, Hansen PE, Zhang W, Czarnecki O, Henning M, Fastner J, Erhard M, Neilan BA, Kaebernick M. Isolation, characterization, and quantitative analysis of Microviridin J, a new *Microcystis* metabolite toxic to *Daphnia*. *J Chem Ecology* 2003;29:1757-70.
- Sivonen K, Jones G. Cyanobacterial toxins. In: Chorus I, Bartram J (Ed.). *Toxic cyanobacteria in water: a guide to their public health consequences, monitoring and management*. London: E & FN Spon; 1999. p.41-111.
- Stipa G, Taiuti R, De Scisciolo G, Arnetoli G, Tredici MR, Biondi N, Barsanti L, Lolli F. Sporadic amyotrophic lateral sclerosis as an infectious disease: a possible role of cyanobacteria? *Med Hypotheses* 2006;67:1363-71.
- Whitton BA. Diversity, ecology and taxonomy of the cyanobacteria. In: Mann NH, Carr NG (Ed.). *Photosynthetic Prokaryotes*. New York: Plenum Press; 1992. p.1-51.
- WHO. *Guidelines for safe recreational water environment*. Volume1. Coastal and fresh waters. Geneva: World Health Organization; 2003.
- WHO *Guidelines for drinking-water quality*. 3<sup>rd</sup> Edition, Volume 1. Recommendations. Geneva: World Health Organization; 2004.

# DISTRIBUZIONE E FISILOGIA DEI CIANOBATTERI POTENZIALMENTE TOSSICI IN ITALIA

Daniela Mattei (a), Mara Stefanelli (b)

(a) Dipartimento di Ambiente e Connessa Prevenzione Primaria, Istituto Superiore di Sanità, Roma

(b) Dipartimento Insempiamenti Produttivi ed Interazione con l'Ambiente, Istituto Superiore per la Prevenzione e la Sicurezza del Lavoro, Monteporzio Catone (RM)

## Introduzione

I cianobatteri, conosciuti anche con il nome di Cyanophyta o alghe verde-azzurre, per la presenza al loro interno di pigmenti colorati, pur essendo procarioti, condividono alcune caratteristiche con le cellule algali eucariote tra cui la grandezza e la capacità di svolgere la fotosintesi sia in condizioni aerobiche che anaerobiche.

Queste particolarità, unite all'estremo polimorfismo a livello fenotipico hanno sempre determinato difficoltà nella classificazione, soprattutto se basata sulla sola osservazione morfologica. Comunque, lo studio di questi microrganismi dal punto di vista molecolare ed una più attenta analisi morfo-funzionale hanno permesso di considerarli distinti dalle alghe per citologia, fisiologia e biochimica. Infatti, a differenza delle cellule eucariote algali, i cianobatteri non posseggono cloroplasti, ma tilacoidi, contenenti pigmenti quali clorofilla-a, ficocianina, ficoeritrina, carotenoidi e xantofille (Ressom *et al.*, 1994; Duy *et al.*, 2000). Inoltre, sulla base delle sequenze nucleotidiche più conservate usate per classificazioni filogenetiche, quali quelle degli rRNA 16S e 5S, i cianobatteri sono stati considerati dei veri e propri batteri inclusi nel gruppo Eubacteria (Skulberg *et al.*, 1993).

La presenza dei cianobatteri nelle acque superficiali ha origine naturale, hanno un ruolo fondamentale negli ecosistemi in cui si trovano, contribuendo alla fissazione dell'azoto atmosferico. Tuttavia, la crescente eutrofizzazione dei corpi idrici, dovuta all'aumento delle immissioni di nutrienti di origine antropica, ha favorito la loro crescita anche a livelli elevati, con la conseguente formazione di fioriture. Il problema sanitario legato alla presenza dei cianobatteri è dovuto alla loro capacità di produrre sostanze tossiche (cianotossine) alle quali l'uomo può essere esposto attraverso varie vie.

## Caratteristiche ecologiche e fisiologiche

La sopravvivenza dei cianobatteri è legata alla presenza di acqua, anidride carbonica, substrati inorganici e luce, ma esistono eccezioni, visto che si conoscono specie capaci di sopravvivere, anche per lunghi periodi, in completa oscurità. La maggior parte dei cianobatteri è autotrofa aerobia, ma alcuni mostrano una distinta abilità per la nutrizione eterotrofa (Fay, 1965).

I cianobatteri sono in grado di colonizzare substrati anche poco fertili, come cenere vulcanica, sabbia desertica e rocce (Dor & Denin, 1996) e possono, inoltre, sopravvivere sia alle alte che alle basse temperature. Nonostante la capacità di adattarsi ad ambienti estremi, proibitivi per altri microrganismi, i cianobatteri sono per lo più distribuiti in ambienti acquatici, sia dulciacquicoli che marini, dove costituiscono uno dei componenti predominanti del

fitoplancton marino (Gallon *et al.*, 1996). Alcune specie di acqua dolce sono anche capaci di tollerare alte concentrazioni di sale (alotolleranti), ma la loro maggiore diffusione si registra nelle acque lentiche, sia nella zona epilimnica che ipolimnica.

La diffusione dei cianobatteri nelle acque dolci rappresenta un problema di crescente interesse legato alla qualità delle acque di superficie. L'eccessivo apporto di nutrienti (in particolare fosforo e azoto) determina il fenomeno dell'eutrofizzazione delle acque, durante il quale vengono saturati i meccanismi di depurazione naturale, e favorisce l'abbondante crescita di differenti specie di cianobatteri, micro e macro-alghe. In particolare lo sviluppo dei cianobatteri risulta legato a determinate condizioni climatiche (temperatura compresa tra i 10 ed i 30 °C, assenza di vento, basse pressioni, assenza di turbolenza delle acque), e a particolari caratteristiche idrogeochimiche del bacino (come il rimescolamento verticale ciclico delle acque, tipico dei laghi temperati (monomittici e dimittici) a cui segue un rimescolamento delle sostanze nutritive lungo la colonna d'acqua). Il successo nella competizione con altri microrganismi appartenenti al fitoplancton viene garantito da alcuni meccanismi di adattamento estremamente efficaci, che consentono ai cianobatteri di ridurre anche la predazione da parte dello zooplancton.

Le principali caratteristiche che contribuiscono all'adattamento dei cianobatteri riguardano:

- la capacità di aggregazione;
- la fissazione dell'azoto;
- lo sfruttamento di sostanze nutritive a concentrazioni molto inferiori rispetto a quelle necessarie ai microrganismi competitori;
- l'assorbimento della radiazione luminosa con un'efficienza particolarmente elevata attraverso differenti pigmenti fotosintetici;
- la capacità di spostarsi attivamente lungo la colonna d'acqua (*buoyancy*);
- la produzione di cianotossine.

## Aggregazione

Durante il periodo vegetativo, diverse specie di cianobatteri sono capaci di aggregarsi sottoforma di colonie o filamenti risultando distribuiti in modo non omogeneo all'interno della colonna d'acqua. I generi che dimostrano di avere questo comportamento sono *Microcystis*, *Anabaena* e *Aphanizomenon*. Sulla superficie dell'acqua il tasso di fotosintesi delle colonie è più alto e le cellule producono un'elevata quantità di carboidrati.

Le proprietà fisiologiche dei cianobatteri variano tra le diverse specie. Le specie unicellulari e coloniali sono fisse, mentre molte forme filamentose sono in grado di compiere movimenti striscianti od oscillatori. In quasi tutte le specie le cellule sono avvolte in involucri gelatinosi dovuti alla mucillagine delle membrane cellulari (es. Chroococcales) o secreti dalla cellula stessa.

## Fissazione dell'azoto

I cianobatteri sono capaci di fissare l'azoto atmosferico grazie alla presenza dell'enzima nitrogenasi che può funzionare solo in assenza di ossigeno. A tale scopo, alcuni cianobatteri, come *Anabaena* e *Nostoc*, hanno compartimentalizzato l'enzima in cellule specializzate che non rilasciano ossigeno (eterocisti) rivestite da una parete impermeabile ai gas. Invece, alcuni ceppi unicellulari e molti ceppi filamentosi come *Oscillatoria* sono in grado di fissare l'azoto in condizioni anaerobiche.

## Sfruttamento delle sostanze nutritive

L'eutrofizzazione, vale a dire l'arricchimento dei sistemi acquiferi con nutrienti disciolti (Rosenberg & Freeman, 1991), è caratteristica di molti corpi idrici in tutto il mondo ed è uno dei maggiori problemi legati alla qualità delle acque. I principali elementi coinvolti in questo processo sono il fosforo (essenzialmente come fosfati disciolti), l'azoto (sotto forma di nitrati e ammoniaca) ed il carbonio. I cianobatteri sono in grado di utilizzare questi nutrienti a concentrazioni molto inferiori rispetto a quelle necessarie ai microrganismi competitori (Lindholm *et al.*, 1992).

Il tasso di crescita dei cianobatteri risulta essere più basso rispetto a quello delle microalghe eucariote, ma i cianobatteri, in compenso, mostrano un'alta capacità di assimilare sia azoto che fosforo, quest'ultimo è anche facilmente immagazzinabile (Reynolds, 1987; Mankiewicz *et al.*, 2003; Mateo *et al.*, 2006).

## Assorbimento della radiazione luminosa

Oltre alla clorofilla, tutti i cianobatteri contengono dei pigmenti accessori detti ficobiline: di colore azzurro (ficocianina e alloficocianina) e di colore rosso (ficoeritrina), che spesso mascherano il colore verde della clorofilla.

Le ficobiline, come gli altri pigmenti accessori, svolgono l'importante funzione di captare radiazioni luminose di lunghezza d'onda diversa da quella assorbibile dalla clorofilla e di trasmetterla a quest'ultima per lo svolgimento del processo fotosintetico. Inoltre, i cianobatteri posseggono carotene e xantofilla.

A differenza degli altri batteri fotosintetici, nei cianobatteri sono presenti entrambi i tipi di fotosistemi tipici dei vegetali eucarioti (PS I e PS II), i quali funzionano usando l'acqua come donatore di elettroni per la produzione di energia chimica (ATP e NADPH) con liberazione di ossigeno.

## Buoyancy

Molti cianobatteri planctonici (es. *Microcystis aeruginosa*) sono capaci di regolare il loro galleggiamento in risposta alla luce, alle condizioni di turbolenza dell'acqua e ai nutrienti disponibili.

Questa caratteristica permette loro di migrare lungo i gradienti termici della colonna d'acqua durante l'anno, in risposta a stimoli luminosi (Reynolds, 1984) ed esigenze nutritive. In questo modo, infatti, possono utilizzare i nutrienti "intrappolati" negli strati più freddi e profondi della colonna d'acqua (Walsby & Klemer, 1974; Klemer, 1976). Il galleggiamento dei cianobatteri è controllato attraverso il bilanciamento tra il contenuto intracellulare di carboidrati (prodotti dalla fotosintesi) e la presenza di minuscole vescicole gassose (<300 nm), che riducono la densità delle cellule o dei filamenti, aumentando le capacità di galleggiamento.

## Produzione di cianotossine

Ad oggi non è noto il significato fisiologico associato alla produzione di cianotossine. Tuttavia alcune evidenze mostrano che le microcistine possono essere trasportate all'esterno della cellula nell'ambiente acquatico circostante attraverso processi di trasporto attivo (Rapala *et al.*, 1997) che comportano un dispendio energetico non trascurabile. Questo farebbe

presupporre che i cianobatteri possano utilizzare il rilascio delle tossine per difendersi, e/o attaccare organismi competitori.

## Fattori chimici e fisici che contribuiscono alla formazione delle fioriture

La crescita dei cianobatteri si verifica durante tutto l'anno nei laghi tropicali, mentre in quelli temperati la crescita e le fioriture dei cianobatteri dipendono dalle temperature (ottimali in genere tra 10 e 30°C) e dalle specifiche caratteristiche del cianobatterio. I generi *Anabaena* e *Aphanizomenon* passano l'inverno nei sedimenti come acineti o spore, *Microcystis* come colonie vegetative (Reynolds & Walsby, 1975), mentre le fioriture si verificano maggiormente nella tarda estate e all'inizio dell'autunno. *Planktothrix* sp. rappresenta un'eccezione: la sua temperatura ottimale di crescita è, infatti, più bassa rispetto agli altri cianobatteri.

I tempi di replicazione mostrano variabilità inter- e intraspecifica e dipendono da fattori ambientali quali temperatura, luce e disponibilità di nutrienti. Il tempo medio di duplicazione per molte specie varia da 21 ore a 14,7 giorni. In condizioni ottimali, le cellule si replicano tanto velocemente da poter dare luogo in circa 2 giorni ad una fioritura, che può persistere per circa 5-7 giorni (Ressom *et al.*, 1994).

### Macronutrienti e micronutrienti

I principali elementi coinvolti nel processo di eutrofizzazione sono il fosforo (come fosfati), l'azoto (sotto forma di nitrati e ammoniaca) ed il carbonio.

Il fosforo è naturalmente presente in tutti gli ecosistemi derivando dall'erosione delle rocce e dal riciclo attraverso la biosfera. La maggior parte del fosforo presente nelle acque, sia in forma organica che inorganica, si trova adsorbito sui sedimenti.

La maggior parte del fitoplancton è capace di assimilare azoto e utilizzarlo come ammoniaca, nitrato, nitrito. I cianobatteri sembrano favoriti in ambienti dove la principale fonte di azoto inorganico è rappresentato da azoto ammoniacale (Prescott, 1968; Bold & Wynne, 1985).

Sembra inoltre che un pH elevato e bassi valori di CO<sub>2</sub> favoriscano la crescita dei cianobatteri, soprattutto quando questi sono il gruppo tassonomico dominante, dal momento che sono in grado di utilizzare in modo efficace la CO<sub>2</sub> anche a basse concentrazioni, inibendo lo sviluppo di altre alghe.

Rispetto ai metalli presenti nelle acque, manganese e rame sono tossici per i cianobatteri a concentrazioni micromolari, mentre ferro e molibdeno sembrano promuoverne la crescita (Reuter & Petersen, 1987). È stato dimostrato che in assenza o a basse concentrazioni di ferro (<2,5 µM) e di zinco, *Microcystis aeruginosa* cresce molto più lentamente che ad alte concentrazioni ma le cellule producono il 20-40% in più di tossine (Lukac & Aegerter, 1993).

### Luce

I cianobatteri sono principalmente fotoautotrofi, dipendendo dalla luce per la fotosintesi e da fonti di nutrimento per la crescita. Inoltre, hanno mostrato di essere in grado di sopravvivere in condizioni di bassa intensità di luce, come sul fondo di laghi eufotici, nei sedimenti e in grotte, o in totale assenza di luce, come nel tratto intestinale degli animali (Langeron, 1923a,b; Farre,

1842). Le popolazioni di cianobatteri sono inoltre in grado di adattarsi alla diminuzione della luce durante la crescita, aumentando il contenuto di clorofilla-*a*, ficocianina, ficoeritrina e l'efficienza fotosintetica.

Molti cianobatteri sono sensibili ai prolungati periodi di alta intensità luminosa. Ad esempio i cianobatteri appartenenti al genere *Oscillatoria* sono adattati a crescere in condizioni di bassa luminosità in quanto ricchi di carotenoidi, mentre le specie appartenenti al genere *Microcystis*, che danno fioriture superficiali, sono meglio adattate a condizioni di alta luminosità. Questo adattamento sembra dipendere dalla diversa morfologia dei due generi (Paerl *et al.*, 1983).

La specie *Cylindrospermopsis raciborskii* rappresenta un'interessante eccezione: studi condotti in laboratorio hanno mostrato che il tasso di crescita di questa specie è indipendente dall'intensità luminosa, così come è risultata indipendente dall'intensità luminosa la produzione della cilindrospermopsina (Garnett *et al.*, 2003).

In condizioni di bassa intensità luminosa, i cianobatteri possono mantenere un tasso di crescita relativamente più alto rispetto ad altri organismi fitoplanctonici, dando loro un evidente vantaggio rispetto ad altri competitori.

## pH

Le fioriture di cianobatteri si verificano soprattutto in acque con pH neutro o lievemente alcalino. L'intervallo di pH tollerato dai cianobatteri va da 6 a 10: valori troppo elevati causano la precipitazione del ferro, non più assimilabile, mentre pH troppo bassi non consentono più l'assimilazione del molibdeno, necessario ai coenzimi delle nitrogenasi e nitrateduasi, coinvolte nella fissazione dell'azoto atmosferico.

## Rimescolamento dell'acqua

Nei laghi temperati, come quelli italiani, il processo di destratificazione, dominato dai moti convettivi, inizia in autunno con i primi consistenti raffreddamenti superficiali e quando il bilancio termico della massa d'acqua diventa negativo. Si origina così il progressivo raffreddamento dell'epilimnio accompagnato dal suo continuo approfondimento. Responsabile del fenomeno è l'energia cinetica turbolenta che si sviluppa negli strati superiori con i moti convettivi che tendono ad interessare uno strato sempre maggiore. Il motore di questo meccanismo è rappresentato, in parte, dall'energia potenziale presente nel lago, che però diminuisce in modo direttamente proporzionale alla perdita di calore in superficie, e in parte dall'azione di stress che il vento esplica fino al livello del salto termico, con più o meno energia in rapporto alla sua intensità. In base alle loro vicende termiche stagionali i laghi sono stati classificati sulla base del numero di circolazioni verticali che possono verificarsi nel corso del ciclo annuale (Hutchinson, 1957). In questo senso si riconoscono laghi amittici, monomittici freddi o caldi, dimittici e polimittici. In realtà, le acque di alcuni bacini profondi possono circolare completamente solo in condizioni meteorologiche particolarmente favorevoli (venti forti e temperature atmosferiche rigide), mentre più spesso, come già si è detto, l'isoterma interessa solo una parte della loro massa d'acqua (laghi olo-oligomittici). Anche se la classificazione di Hutchinson è generalmente accettata e quasi tutti i laghi vi sono inquadrati, le peculiarità meteo-climatiche, morfologiche, idrologiche e chimiche dei singoli laghi possono indurre alcune varianti nello schema standard della circolazione verticale.

Il rimescolamento dei nutrienti nei laghi e nei fiumi è incrementato anche dalle forti piogge. Le piogge determinano, oltre all'aumento dei nutrienti, la disponibilità di materia particolata, organica ed inorganica, favorendo lo sviluppo delle popolazioni cianobatteriche. Le piogge,

incrementando la sospensione dei sedimenti, contribuiscono all'aumento della torbidità; ne deriva una riduzione della penetrazione della luce e la risalita lungo la colonna d'acqua dei cianobatteri per compensare questa carenza (QWQTF, 1992). Nei canali e nei corsi d'acqua caratterizzati da una considerevole velocità di spostamento delle masse d'acqua, le fioriture sono rare. Le minori velocità che si possono verificare in estate possono favorirne la crescita. La siccità determina la concentrazione dei nutrienti e la riduzione dell'ossigenazione dell'acqua, condizioni che sono spesso associate ad ingenti fioriture di cianobatteri (May, 1981).

## Movimenti dell'aria

La diminuzione dei venti favorisce la cessazione del rimescolamento del corpo d'acqua e di conseguenza la formazione di schiume superficiali. Molte di queste schiume si formano durante la notte, quando i cianobatteri non regolano attivamente il loro galleggiamento (Pearson *et al.*, 1990).

## Distribuzione

Casi di avvelenamenti di animali associati ad esposizione a tossine cianobatteriche in acqua dolce sono riportati in letteratura da molti anni: il primo caso di avvelenamento dovuto a fioriture di cianobatteri risale al 1878 in Australia (Francis, 1878). Il primo caso descritto per la specie umana fu un disturbo gastroenterico causato da tossine cianobatteriche presenti nel Fiume Ohio nel 1931: sfortunatamente le specie e le tossine responsabili non furono identificate (Tisdale, 1931; Veldee, 1931). Il caso più grave è stato segnalato in Brasile, dove un numero elevato di pazienti in dialisi è deceduto a causa della presenza di microcistine nelle acque utilizzate (Jochimsen *et al.*, 1998). La presenza di fioriture di cianobatteri è stata documentata in tutto il mondo (Tabella 1).

**Tabella 1. Paesi nei quali sono state segnalate fioriture di cianobatteri**

Continente	Paese
<b>Europa</b>	Belgio, Danimarca, Estonia, Finlandia, Francia, Germania, Gran Bretagna, Grecia, Ungheria, Irlanda, Italia, Latvia, Norvegia, Olanda, Polonia, Portogallo, Repubblica Ceca, Russia, Slovacchia, Slovenia, Spagna, Svezia, Svizzera, Turchia, Ucraina
<b>America</b>	Argentina, Bermuda, Brasile, Canada, Cile, Messico, USA (27 Stati), Venezuela
<b>Asia</b>	Arabia Saudita, Bangladesh, Corea del Sud, Filippine, India, Israele, Giappone, Giordania, Malesia, Nepal, Cina, Sri Lanka, Thailandia, Vietnam
<b>Australia</b>	Australia, Nuova Caledonia, Nuova Zelanda
<b>Africa</b>	Botswana, Egitto, Etiopia, Kenia, Marocco, Sud Africa, Zimbabwe

## Distribuzione in Italia

In Figura 1 viene riportata la distribuzione dei cianobatteri nelle varie regioni italiane, secondo le segnalazioni riportate nella letteratura aperta e grigia.

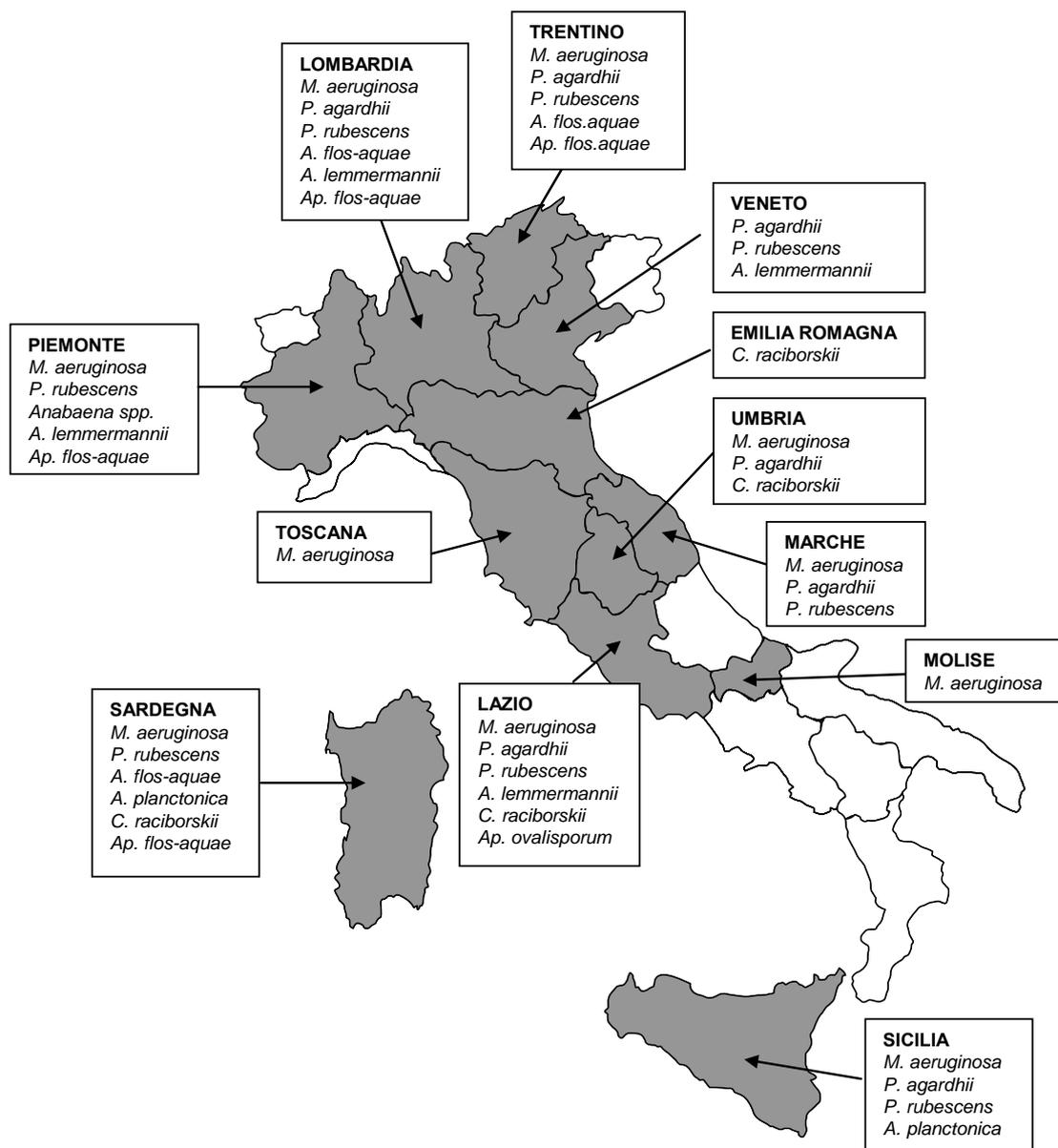


Figura 1. Distribuzione dei cianobatteri nelle varie regioni italiane

La maggior parte dei laghi artificiali della Sardegna (circa 40) le cui acque sono destinate al consumo umano, è interessato da un elevato stato trofico (eutrofia e ipertrofia) e dalla presenza di massicce fioriture di cianobatteri potenzialmente tossici che si ripetono soprattutto nei mesi estivi. I generi responsabili di queste fioriture sono nella maggior parte dei casi *Microcystis* (*M. aeruginosa* e *M. flos-aquae*), *Aphanizomenon* (*Ap. flos-aquae*) e *Anabaena* (*A. flos-aquae* e *A. planctonica*); in qualche caso è stata rilevata la presenza di *Planktothrix rubescens* (Cattini, 2005). Le fioriture algali di *Microcystis aeruginosa* avvenute nel 1991, nel Lago Liscia in Sardegna, furono causa di morie di pesci e morie sono state riscontrate anche nel Lago Liscione in Molise.

La stessa specie causò fioriture nel 1998, sempre in Sardegna nel Lago Cedrino e nelle Marche nel Lago Polverina (Melchiorre *et al.*, 2002).

Studi limnologici condotti dal 1978 (Naselli & Barone, 1995; Barone & Naselli, 2000) sui laghi artificiali siciliani hanno permesso di individuare una serie di corpi idrici nei quali si sono manifestate fioriture di specie potenzialmente tossiche.

Anche l'Italia settentrionale presenta casi di fioriture di cianobatteri tossici. Nel lago di Iseo, a metà agosto del 1997 si verificò un'importante fioritura di *Anabaena flos-aquae* durata fino alla fine di settembre (Garibaldi *et al.*, 1998; Garibaldi *et al.*, 2000). Due anni dopo, nel 1999, una estesa fioritura di *Planktothrix rubescens* si è sviluppata nel mese di giugno fino ad estate inoltrata e a fine agosto è stata in parte sostituita da *Anabaena flos-aquae* che dalla superficie del lago è stata poi spinta dai venti lungo la riva.

La stessa situazione si è verificata nel Lago di Varese, durante l'estate del 1997, in cui la fioritura fu caratterizzata dalla dominanza di un cianobatterio filamentoso del genere *Leptolyngbya*, causando morie di pesci e bivalvi. Nel Lago di Garda, dal 1989, sono state documentate estese fioriture estive di *Anabaena lemmermannii* sulla superficie del lago. Ulteriori analisi hanno riguardato la dinamica stagionale dei principali cianobatteri del Garda, che oltre ad *A. lemmermannii* hanno dimostrato la presenza di *Planktothrix* spp. Da qualche anno sono presenti nel Lago Maggiore cospicue fioriture causate dalla specie *Anabaena lemmermannii* (Salmaso, 2005).

Nel 2000 quattro regioni hanno segnalato la presenza di fioriture e si è riscontrata la presenza di *Microcystis aeruginosa* nel Lago Liscia in Sardegna (Sechi, 2000), nel Trasimeno in Umbria e a Canterno nel Lazio (Melchiorre *et al.*, 2002); la presenza del ceppo tossico di *Anabaena affinis* sempre nel lago di Canterno e quella di *Planktothrix rubescens* nel lago di Iseo in Lombardia e nel lago di Albano e Nemi, nel Lazio.

Fioriture tossiche di *Planktothrix* sp. interessano da anni (1999-2003) i laghi della provincia di Macerata, in particolare il lago Fiastrone e i bacini Borgiano e le Grazie ad esso collegati (Serenelli, 2005). La stessa specie dal 2003 sta interessando un altro lago della Regione Marche, il Lago di Gerosa, situato nella provincia di Ascoli Piceno.

Massicce fioriture di *Cylindrospermopsis raciborskii* sono state notate nell'estate del 1995 nei Laghi di Albano (Lazio) e Trasimeno (Umbria). Nel 2003-2004 tricomi di questa specie sono stati osservati, nei mesi di Settembre e Novembre, nel Lago Cedrino in Sardegna (Messineo *et al.*, 2006; Manti *et al.*, 2005) e in Emilia Romagna (Manfredini & Ghion, 2005).

Dal 2004, nel lago di Albano si rilevano anche fioriture estive della specie *Aphanizomenon ovalisporum* a cui è stata associata la produzione di cilindrospermopsina riscontrabile fino a livelli di 18 µg/L (Bogialli *et al.*, 2006).

Inoltre, dalla metà degli anni novanta il Lago di Massaciuccoli (Toscana) è interessato dalla presenza di *Microcystis aeruginosa*. Nel 2003 sono stati registrati livelli di microcistine fino a 160 µg/L in acqua, mentre valori ben più elevati sono stati riscontrati nell'epatopancreas di esemplari appartenenti alla specie *Mugil cephalus* e nella porzione cefalica del gambero di acqua dolce *Procambrus clarkii* (Simoni *et al.*, 2004).

## Cianobatteri potenzialmente tossici

La stessa specie di cianobatteri può essere associata sia a fioriture tossiche che non tossiche. Nel caso delle microcistine, è stato dimostrato che la tossicità di un ceppo dipende dalla presenza di un gene che codifica per la produzione della tossina e che le popolazioni naturali sono generalmente costituite da cianobatteri con entrambi i genotipi (Kurmayer *et al.*, 2002). Le

diverse condizioni ambientali non sono in grado di modificare significativamente l'espressione del gene, per cui la produzione delle microcistine è una caratteristica relativamente costante nei batteri con il genotipo produttore di tossina. L'ambiente può influire sulla composizione relativa della popolazione, anche se i fattori responsabili della predominanza del ceppo tossico sul non tossico non sono ancora noti.

La produzione di cianotossine tende ad aumentare durante la fase di crescita esponenziale per diminuire gradualmente durante la fase stazionaria (Watanabe & Oishi, 1985). Molti studi indicano che i cianobatteri producono la massima quantità di tossine in condizioni di luce e di temperatura ottimali per la loro crescita (Ressom *et al.*, 1994). La più elevata produzione di cianotossine da parte delle specie estive avviene generalmente a temperature comprese tra 18° e 25°C (Chorus & Bartram, 1999). Una maggior produzione di tossine può essere stimolata da condizioni di stress ambientale e, in alcune specie, da basse intensità di luce e brevi fotoperiodi (Ressom *et al.*, 1994). È stato generalmente riconosciuto che in molti ceppi la maggior tossicità delle fioriture è correlata a squilibri nella disponibilità di nutrienti (soprattutto il fosforo) rispetto al rapporto ottimale N/P.

Di seguito (Tabella 2) sono riportate alcune delle specie più rappresentative di cianobatteri tossici d'acqua dolce appartenenti agli ordini delle Chroococcales, Oscillatoriales, Nostocales e Stigonematales.

**Tabella 2. Alcune delle specie più rappresentative di cianobatteri tossici d'acqua dolce**

Ordine	Tossina	Bibliografia
<b>Chroococcales</b>		
<b>Genere</b> <i>Coelosphaerium</i>		
Specie <i>C. kuetzingianum</i>	neurotossine, epatotossine	Fitch <i>et al.</i> , 1934
<b>Genere</b> <i>Cyanobium</i>		
Specie <i>C. bacillare</i> (sin: <i>Synechococcus bacillare</i> )	microcistine	Cronberg <i>et al.</i> , 2003
<b>Genere</b> <i>Microcystis</i>		
Specie <i>M. aeruginosa</i>	microcistine	Carmichael <i>et al.</i> , 1988
<i>M. botrys</i>	microcistine	Henriksen <i>et al.</i> , 1996
<i>M. viridis</i>	microcistine	Watanabe <i>et al.</i> , 1988
<i>M. wesenbergii</i>	microcistine	Yasuno <i>et al.</i> , 1995
<b>Genere</b> <i>Woronichinia</i>		
Specie <i>W. naegeliana</i>	neurotossine, epatotossine	Berg <i>et al.</i> , 1986
<b>Oscillatoriales</b>		
<b>Genere</b> <i>Limnothrix</i>		
Specie <i>L. redekei</i>	microcistine	Gkelis <i>et al.</i> , 2001
<b>Genere</b> <i>Lyngbya</i>		
Specie <i>L. aerugineo-coerulea</i>	neurotossine, epatotossine	Teneva <i>et al.</i> , 2003
Specie <i>L. wollei</i>	PSP	Carmichael <i>et al.</i> , 1988, 1997

sin: sinonimo

segue

continua

Ordine	Tossina	Bibliografia
<b>Oscillatoriales</b> (continua)		
<b>Genere</b> <i>Planktothrix</i>		
Specie <i>P. agardhii</i> (sin: <i>Oscillatoria agardhii</i> )	microcistine, anatoossine	Sivonen <i>et al.</i> , 1989
<i>P. rubescens</i> (sin: <i>Oscillatoria rubescens</i> )	microcistine	Skulberg <i>et al.</i> , 1985
<i>P. isothrix</i> (sin: <i>P. mougeotii</i> e <i>Oscillatoria agardhii</i> var. <i>isothrix</i> )	microcistine, anatoossine	Carmichael, 1988
<i>P. planctonica</i> (sin: <i>Oscillatoria ornata</i> f. <i>planctonica</i> )	microcistine	Nogueira <i>et al.</i> , 2001
<b>Genere</b> <i>Phormidium</i>		
Specie <i>P. formosum</i> (sin: <i>Oscillatoria formosa</i> )	microcistine, omoanatoossina-a	Skulberg <i>et al.</i> , 1992
<b>Nostocales</b>		
<b>Genere</b> <i>Anabaena</i>		
Specie <i>A. circinalis</i> (sin: <i>A. hassalii</i> )	anatoossine, PSP	Sivonen <i>et al.</i> , 1989 Humpage <i>et al.</i> , 1994
<i>A. flos-aquae</i>	anatoossine, microcistine	Carmichael <i>et al.</i> , 1984
<i>A. lemmermannii</i>	anatoossina-a(s), saxitossina, microcistine	Henriksen, 1996
<i>A. planctonica</i>	anatoossina-a	Park <i>et al.</i> , 1993
<i>A. spiroides</i>	anatoossina-a	Park <i>et al.</i> , 1993
<b>Genere</b> <i>Anabaenopsis</i>		
Specie <i>A. milleri</i>	anatoossina	Lanaras <i>et al.</i> , 1989
<b>Genere</b> <i>Aphanizomenon</i>		
Specie <i>A. gracile</i>	PSP	Pereira <i>et al.</i> , 2004
<i>A. flos-aquae</i>	anatoossina	Rapala <i>et al.</i> , 1993
<i>A. ovalisporum</i>	cilindrospermopsina	Banker <i>et al.</i> , 1997
<b>Genere</b> <i>Cylindrospermopsis</i>		
Specie <i>C. raciborskii</i>	cilindrospermopsina, saxitossina	Hawkins <i>et al.</i> , 1985
<b>Genere</b> <i>Nostoc</i> sp.	microcistine	Beattie <i>et al.</i> , 1988
<b>Stigonematales</b>		
<b>Genere</b> <i>Hapalosiphon</i>		
Specie <i>H. hibernicus</i>	microcistine	Prinsep <i>et al.</i> , 1992
<i>H. fontinalis</i>	neurotossine, epatotossine	Moore <i>et al.</i> , 1984
<b>Genere</b> <i>Schizothrix</i>		
Specie <i>S. calcicola</i>	dermatite da contatto	Prinsep <i>et al.</i> , 1992
<b>Genere</b> <i>Umezakia</i>		
Specie <i>U. natans</i>	cilindrospermopsina	Harada <i>et al.</i> , 1994

sin: sinonimo

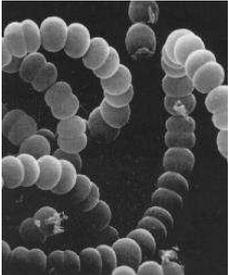
Le specie di cianobatteri tossici più rappresentativi in Italia, la descrizione delle loro caratteristiche morfologiche, delle condizioni favorevoli alle fioriture, e l'indicazione delle tossine prodotte sono presentate nel paragrafo seguente sottoforma di schede monografiche, per facilitarne la consultazione.

## Cianobatteri tossici in Italia: schede monografiche

### *Anabaena circinalis*

<b>Phylum</b>	Cyanobacteria
<b>Classe</b>	Cyanophyceae
<b>Ordine</b>	Nostocales
<b>Genere</b>	<i>Anabaena</i>
<b>Specie</b>	<i>Anabaena circinalis</i>
	 <p>Foto: Roger Burks (University of California at Riverside), Mark Schneegurt (Wichita State University) and Cyanosite (<a href="http://www-cyanosite.bio.purdue.edu">www-cyanosite.bio.purdue.edu</a>)</p>
<b>Autore</b>	Rabenhorst (Bornet & Flahault)
<b>Anno</b>	1888
<b>Descrizione</b>	Tricomi liberi a forma di spirale, lunghezza 70-120 µm. Rivestimento mucillaginoso assente o lieve. Le cellule vegetative con vescicole gassose, di forma sferica o compressa, 7-9 µm di lunghezza, 7-8-11 di larghezza, di colore verde-azzurro. Le eterocisti sferiche delle stesse dimensioni delle cellule vegetative. Gli acineti ellissoidali (a volte con estremità conica) 20-28 x 15-21 µm.
<b>Condizioni favorevoli per le fioriture</b>	Acque temperate eutrofiche. Popolazioni prive di acineti in zone tropicali
<b>Tossine prodotte</b>	Anatossine (Sivonen <i>et al.</i> , 1989) PSP (Humpage <i>et al.</i> , 1994) Microcistine (Vezie <i>et al.</i> , 1998)
<b>Distribuzione</b>	Australia, Bangladesh, Italia (Lombardia), Nuova Zelanda, Romania, Spagna, Svezia e Turchia.
<b>Ceppi di riferimento</b>	CCAP 1403/18 CCAP 1403/25

**Anabaena flos-aquae**

<b>Phylum</b>	Cyanobacteria
<b>Classe</b>	Cyanophyceae
<b>Ordine</b>	Nostocales
<b>Genere</b>	<i>Anabaena</i>
<b>Specie</b>	<i>Anabaena flos-aquae</i>
	 <p>Foto: Roger Burks (University of California at Riverside), Mark Schneegurt (Wichita State University) and Cyanosite (<a href="http://www-cyanosite.bio.purdue.edu">www-cyanosite.bio.purdue.edu</a>)</p>
<b>Autore</b>	Brebisson (Bornet & Flahault)
<b>Anno</b>	1886
<b>Descrizione</b>	I tricoli sono legati irregolarmente, riuniti in piccoli fiocchetti gelatinosi. Le cellule vegetative, con vescicole gassose, sono sferiche o a forma di cilindro, 6-8 µm di lunghezza e 5,5 µm di larghezza. Le eterocisti sferiche o poco ellissoidali, 6-10 µm di lunghezza, 4-9 µm di larghezza. Gli acineti ellissoidali o cilindrici, lievemente curvati, 30-35 µm di lunghezza, e distanti dagli eterocisti.
<b>Condizioni favorevoli per le fioriture</b>	La specie di <i>Anabaena flos-aquae</i> , tipicamente eutrofica, non necessita di acque particolarmente ricche di nitrati o materia organica. Ha caratteristiche di stenotermia calda, con cisti di resistenza invernali bentoniche. Questa specie è in grado di fissare l'azoto atmosferico, quindi dipende molto dalla disponibilità di fosforo. Le condizioni favorevoli per le fioriture sono: temperatura tra 20 e 25°C, luce elevata, stratificazione.
<b>Tossine prodotte</b>	Anatossina-a (Carmichael, 1989; Himberg <i>et al.</i> , 1898) Anatossina-a(s) (Mahmood <i>et al.</i> , 1987) Microcistine (Sivonen <i>et al.</i> , 1992; Harada <i>et al.</i> , 1991)
<b>Distribuzione</b>	Distribuita soprattutto in Canada, Africa, Asia ed Europa (Finlandia, Danimarca, Norvegia, Portogallo). In Italia segnalazioni provengono dalla Sardegna, dalla Lombardia e dal Trentino.
<b>Cepi di riferimento</b>	ATCC 22664 CCAP 1403/13 UTEX 1444= FACHB 245 UTEX LB 2383 UTEX LB 2558 UTEX LB 2557 SAG 30.87

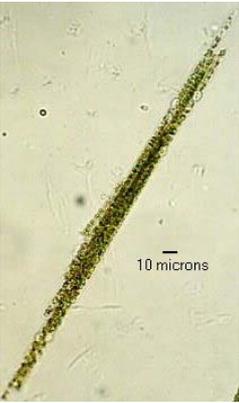
## **Anabaena lemmermannii**

<b>Phylum</b>	Cyanobacteria
<b>Classe</b>	Cyanophyceae
<b>Ordine</b>	Nostocales
<b>Genere</b>	Anabaena
<b>Specie</b>	<i>Anabaena lemmermannii</i>
	 <p>Foto: Gianluca Corno, CNR-ISE</p>
<b>Autore</b>	Richter
<b>Anno</b>	1903
<b>Descrizione</b>	Presenta tricomi avvolti compattamente o lentamente, liberi e solitari oppure legati, con involucro mucillaginoso. Le cellule vegetative, con vescicole gassose, possono essere cilindriche con parte terminale arrotondata, a forma di cannuccia e sferiche, 5,1-7,3 µm di diametro e 7,6-11,9 µm di lunghezza. Le eterocisti sono sferiche o ellissoidali, 6,2-8,7 µm di diametro e 7,5-11 µm di lunghezza. Gli acineti cilindrici con terminale arrotondato, qualche volta leggermente curvati, 6,8-10,3 µm di diametro e 13,4-36,9 µm in lunghezza, e situati ai due lati delle eterocisti. Gli acineti e le eterocisti si raggruppano sempre al centro del tricoma legati quando maturo.
<b>Condizioni favorevoli per le fioriture</b>	Specie tipica di laghi più estesi e meno eutrofizzati e quindi ambienti meno produttivi. Presenta una spiccata stagionalità essendo più presente nel periodo che va da fine giugno alla fine di settembre. È in grado di svilupparsi in acque piuttosto calde (media 20°C), presentando una bassa tollerabilità a temperature < di 17°C; richiede condizioni stabili della colonna d'acqua e calma di vento. Sviluppo ottimale si ha per valori elevati di pH (in media 8,5), alte radiazioni luminose e concentrazioni di azoto anche piuttosto basse.
<b>Tossine prodotte</b>	Anatossina-a(s) (Onodera <i>et al.</i> , 1997; Henriksen <i>et al.</i> , 1997) Saxitossina (Rapala <i>et al.</i> , 2005) Microcistine (Tore <i>et al.</i> , 2003)
<b>Distribuzione</b>	Presente soprattutto in Europa Nord Orientale (Mar Baltico), Romania. In Italia segnalazioni provengono dai laghi del Lazio, della Lombardia, del Veneto e del Piemonte
<b>Cepi di riferimento</b>	NIVA-CYA 83/1 NIVA-CYA 281/1 NIVA-CYA 83/1 NIVA-CYA 266/1

**Anabaena planctonica**

<b>Phylum</b>	Cyanobacteria
<b>Classe</b>	Cyanophyceae
<b>Ordine</b>	Nostocales
<b>Genere</b>	<i>Anabaena</i>
<b>Specie</b>	<i>Anabaena planctonica</i>
	 <p>Foto: Petr Znachor– www.fytoplankton.cz</p>
<b>Autore</b>	Brunnthalier
<b>Anno</b>	1903
<b>Descrizione</b>	Tricomi liberi, solitari e dritti, con largo involucro mucillaginoso ialino. Le cellule vegetative, con vescicole gassose, sono sferiche o compresse a forma cilindrica, 6,7-14,6 µm di diametro. Le eterocisti sferiche, 5,5-14,6 µm di diametro. Gli acineti ellissoidali, maggiormente solitari, o in coppia e distanti dagli eterocisti, 8,8-23,7 µm di diametro e 14,7-39,8 µm in lunghezza.
<b>Condizioni favorevoli per le fioriture</b>	La temperatura ottimale di crescita è di circa 25°C. Le fioriture si hanno in particolare in primavera ed inizio estate. Cresce a valori di pH anche molto elevati (9,5) e preferisce laghi ipertrofici con alti livelli di nutrienti.
<b>Tossine prodotte</b>	Anatossina-a (Park <i>et al.</i> , 1993)
<b>Distribuzione</b>	Ampiamente distribuita in Australia, Stati Uniti, Canada, Brasile. In Italia segnalazioni provengono dai laghi della Sardegna e della Sicilia.
<b>Cepi di riferimento</b>	CCAP 1403/19 CCAP 1403/27 NIVA 66

## ***Aphanizomenon flos-aquae***

<b>Classe</b>	Cyanobacteria
<b>Ordine</b>	Nostocales
<b>Genere</b>	<i>Aphanizomenon</i>
<b>Specie</b>	<i>Aphanizomenon flos-aquae</i>
	<div style="text-align: right;">  <p>10 microns</p> </div> <p>Foto: Roger Burks (University of California at Riverside), Mark Schneegurt (Wichita State University) and Cyanosite (www.cyanosite.bio.purdue.edu)</p>
<b>Autore</b>	Ralfs (Linnaeus)
<b>Anno</b>	1850
<b>Descrizione</b>	<p>Le cellule sono unite a formare una linea retta, un filamento non ramificato che si assottiglia leggermente verso la parte finale. I filamenti sono usualmente uniti a formare un fascio di filamenti paralleli, liberi di muoversi. Questi fasci appaiono prominenti ad occhio nudo, di colore blu-verdi. Le singole cellule hanno un diametro di 5-6 µm e sono lunghe 8-12 µm (6-8 µm la lunghezza più comune). Al centro di ogni filamento sono localizzati acineti ed eterocisti. Gli acineti, con diametro di 8 µm e lunghezza di 60-70 µm (30-35 µm l'intervallo di lunghezza prevalente), sono di forma allungata e sono posizionati vicino al centro del filamento. Le forme delle eterocisti varia da rettangolare a cilindrica, di 7 (4-9) µm di diametro e 12-20 (6-10) µm di lunghezza, e sono localizzate sempre centralmente ma non vicino agli acineti. A volte sia gli acineti che le eterocisti possono essere assenti.</p>
<b>Condizioni favorevoli per le fioriture</b>	<p><i>Aphanizomenon flos-aquae</i> è una specie tipicamente eutrofica, capace di crescere in inverno, preferendo e tollerando le basse temperature. Riesce a sopravvivere al di sotto delle condizioni di crescita favorevoli formando acineti. La temperatura ottimale di crescita varia tra 15-28°C, e la temperatura minima di crescita è di 10°C. Predilige basse radiazioni luminose e l'intensità critica di radiazione è di 2,44 µmol m<sup>-2</sup>. Cresce a pH basici .</p>
<b>Tossine prodotte</b>	<p>Anatossina (Bumke-Vogt, 1998) Saxitossine (Li <i>et al.</i>, 2003) Cilindrospermopsina (Preussel <i>et al.</i>, 2006)</p>
<b>Distribuzione</b>	<p>Segnalazioni si hanno da USA, Europa (Francia, Portogallo, Spagna). In Italia segnalazioni provengono da laghi della Lombardia, del Trentino, del Piemonte e della Sardegna.</p>
<b>Ceppi di riferimento</b>	<p>UTEX LB 2384 PCC 7905/1 CCAP 1401/1 SAG 31.87</p>

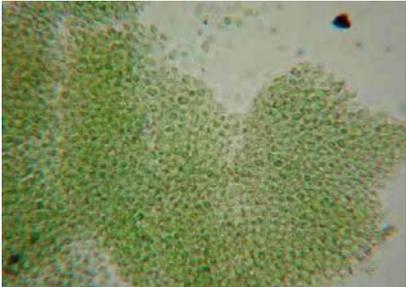
***Aphanizomenon ovalisporum***

<b>Phylum</b>	Cyanobacteria
<b>Classe</b>	Cyanophyceae
<b>Ordine</b>	Nostocales
<b>Genere</b>	<i>Aphanizomenon</i>
<b>Specie</b>	<i>Aphanizomenon ovalisporum</i>
	 <p>Foto: Glen Shaw Senior Lecturer - School of Public Health, Griffith University</p>
<b>Autore</b>	Forti
<b>Anno</b>	1912
<b>Descrizione</b>	Tricomi solitari di lunghezza 60-700 µm, limitatamente curvati alla fine, con poche cellule ialine terminali e le cellule vegetative contengono vescicole gassose, lunghe 2,5-6,9 µm e larghe 2,4-5,1 µm. Le eterocisti, sferiche o ellissoidali, lunghi 4,4-10,5 µm e larghi 2,41-5,1 µm, e gli acineti, lunghi 16,0-27,8 µm e larghi 6,0-15,9 µm, sono localizzati in mezzo a tricomi.
<b>Condizioni favorevoli per le fioriture</b>	La presenza di questa specie è maggiormente ristretta all'epilimnio durante il periodo di stratificazione estivo e autunnale. La temperatura ottimale di crescita è 26-30°C. Il massimo tasso di crescita si ottiene a bassa irradiazione luminosa. La concentrazione di sodio di 5 mM sembra essere essenziale per la crescita di questa specie così come un alto valore di pH.
<b>Tossine prodotte</b>	Cilindrospermopsina (Banker <i>et al.</i> , 1997) 7-Epicilindrospermopsina (White & Hansen, 2005)
<b>Distribuzione</b>	Australia, Asia, Israele, Grecia, Spagna, Turchia. In Italia segnalazioni provengono dal Lazio.
<b>Cepi di riferimento</b>	Al momento non sono disponibili ceppi di riferimento.

### ***Cylindrospermopsis raciborskii***

<b>Phylum</b>	Cyanobacteria
<b>Classe</b>	Cyanophyceae
<b>Ordine</b>	Nostocales
<b>Genere</b>	<i>Cylindrospermopsis</i>
<b>Specie</b>	<i>C. raciborskii</i>
	 <p>Foto: Roger Burks (University of California at Riverside), Mark Schneegurt (Wichita State University) and Cyanosite (www-cyanosite.bio.purdue.edu)</p>
<b>Autore</b>	Seenayya & Subba Raju (Wołoszyńska)
<b>Anno</b>	1972
<b>Descrizione</b>	<p>Si tratta di un cianobatterio filamentoso variabile in lunghezza e largo 1-5 mm. Le estremità dei suoi tricomi sono appuntite e terminanti con eterocisti. Le singole cellule sono difficilmente distinguibili perché sono raramente circondate da una parete cellulare. Caratteristica di questo cianobatterio è la presenza di due morfotipi: dritto o curvato. All'interno di queste forme c'è poi un'alta variabilità dovuta alla grandezza ed al numero di tricomi per cellula. Il morfotipo dritto tende ad essere più largo ed a produrre più tossine. Inoltre crescono senza eterocisti e raramente hanno acineti.</p>
<b>Condizioni favorevoli per le fioriture</b>	<p><i>Cylindrospermopsis raciborskii</i> è considerato una specie tropicale e sub-tropicale, ma recentemente è stato osservato anche in zone temperate. Ha la capacità di crescere in diverse condizioni ambientali rendendo difficile la predizione della sua presenza e proliferazione. Condizioni che favoriscono la crescita sono il riscaldamento dell'acqua superficiale, temperature maggiori di 23°C, condizioni di bassa luminosità, poca dipendenza dai nutrienti, pH di 8,0 o 8,7. Le fioriture sono difficili da rivelare in quanto non appaiono sottoforma di schiume ma c'è solo un leggero cambiamento del colore dell'acqua.</p>
<b>Tossine prodotte</b>	<p>Cilindrospermopsina (St Amand, 2002) Saxitossina (Oshima <i>et al.</i>, 1995)</p>
<b>Distribuzione</b>	<p>Australia e Nuova Zelanda, Stati Uniti, Brasile, Portogallo. In Italia segnalazioni provengono dal Lazio, Sardegna, Umbria ed Emilia Romagna.</p>
<b>Cepi di riferimento</b>	<p>UTEX LB 2897 CS-510=CR3 SAG 1.97</p>

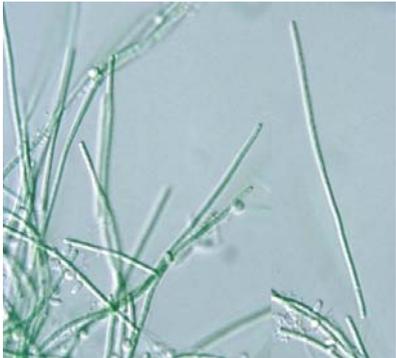
***Microcystis aeruginosa***

<b>Phylum</b>	Cyanobacteria
<b>Ordine</b>	Chroococcales
<b>Genere</b>	<i>Microcystis</i>
<b>Specie</b>	<i>M. aeruginosa</i>
	<p>Foto: Roger Burks (University of California at Riverside), Mark Schneegurt (Wichita State University) and Cyanosite (<a href="http://www-cyanosite.bio.purdue.edu">www-cyanosite.bio.purdue.edu</a>)</p> 
<b>Autore</b>	Kutz.em. Elenkin
<b>Anno</b>	1846
<b>Descrizione</b>	<p>Le cellule di <i>M. aeruginosa</i> sono caratterizzate dalla presenza di vescicole gassose e mostrano la tendenza a formare aggregati o colonie in numero variabile che vanno da pochi a 100 individui, le cui dimensioni variano tra 600 e 900 µm di lunghezza. Le colonie possono apparire di forma sferica, lobata o reticolare. Le colonie sospese, ad occhio nudo, appaiono come piccoli grumi blu-verdi. Le singole cellule sono piccole, 4-6 µm di diametro, con pseudovacuoli visibili e altamente rifrattivi che causano il movimento ed il galleggiamento delle colonie sulla superficie dell'acqua. Le cellule della colonia sono tenute insieme da una matrice trasparente e gelatinosa che può essere difficile da discernere durante l'esame al microscopio. Gli acineti e le eterocisti sono assenti.</p>
<b>Condizioni favorevoli per le fioriture</b>	<p>Le specie di <i>Mycrocistis</i> sono particolarmente presenti nelle regioni temperate., specialmente in acque dolci in condizioni di bassa salinità. Le fioriture persistono nei corpi idrici se sono presenti livelli adeguati di nutrienti e temperature non al di sotto dei 15°C (ottimo di temperatura 25°C). Le fioriture si verificano normalmente nella tarda estate ed all'inizio dell'autunno e sono comuni in corpi d'acqua eutrofici o ipertrofici. <i>Mycrocistis aeruginosa</i> regola il proprio galleggiamento in risposta alla luce, alle condizioni di turbolenza dell'acqua ed ai nutrienti disponibili. Le piogge possono favorire la formazione delle fioriture in quanto aumentano i livelli di nutrienti (anche a seguito del dilavamento del suolo). Le fioriture sono rapide ed imponenti.</p>
<b>Tossine prodotte</b>	Microcistine (Charmichael <i>et al.</i> , 1988) Microviridina-J (Rohrlack <i>et al.</i> , 2003)
<b>Distribuzione</b>	Stati Uniti, Cina, Australia e Nuova Zelanda, Germania, Romania, Spagna, Svezia, Turchia. In Italia segnalazioni provengono da Lombardia, Trentino, Piemonte, Toscana, Umbria, Marche, Lazio, Molise, Sicilia e Sardegna.
<b>Ceppi di riferimento</b>	PCC 7005; PCC 7806=CS-569; PCC 7813=CS-570; PCC 7820 CCAP 1450/4=UTEX LB 2385 UTEX B 2669; UTEX LB 2063; UTEX B 2661; UTEX B 2663; UTEX LB 2664; UTEX B 2664; UTEX LB 2665 NIVA CYA 43=CS573 SAG 14.85; SAG 1450-1; SAG 17.85; SAG 18.85; SAG 46.80

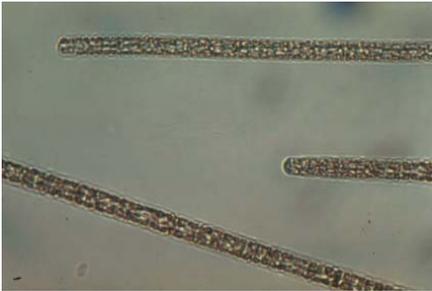
## ***Planktothrix agardhii***

<b>Phylum</b>	Cyanobacteria
<b>Classe</b>	Cyanophyceae
<b>Ordine</b>	Oscillatoriales
<b>Genere</b>	<i>Planktothrix</i>
<b>Specie</b>	<i>Planktothrix agardhii</i>
	<p>Foto: Roger Burks (University of California at Riverside), Mark Schneegurt (Wichita State University) and Cyanosite (www-cyanosite.bio.purdue.edu)</p> 
<b>Autore</b>	Anagnostidis & Komárek (Gomont)
<b>Anno</b>	1988
<b>Sinonimi</b>	<i>Oscillatoria agardhii</i> Gomont 1892
<b>Descrizione</b>	Le cellule di <i>P. agardhii</i> formano tricomi solitari, dritti, di colore verde-azzurro e di solito assottigliati nella parte finale (a volte terminante con una caliptra). I setti trasversali sono leggermente compressi tra una cellula e l'altra. I vacuoli gassosi sono relativamente larghi e sparsi nella parte periferica della cellula. Le dimensioni delle cellule variano tra 3-4 µm per quanto riguarda la lunghezza.
<b>Condizioni favorevoli per le fioriture</b>	La specie <i>P. agardhii</i> ricca di ficocianina ha una ampia distribuzione e abita corpi d'acqua poco profondi, mesotrofici e ipertrofici. Nei laghi temperati la presenza di questa specie è favorita dalla penetrazione della luce e dalla limitazione dei nutrienti che permettono ai filamenti di crescere e aggregarsi in superficie. L'intervallo di temperatura ottimale per la crescita è di 10-30°C e la salinità tollerata è 7,8‰. Le fioriture si osservano soprattutto in tarda estate.
<b>Tossine prodotte</b>	Microcistine (Henriksen, 1996) Anatossine (Hawser <i>et al.</i> , 1990)
<b>Distribuzione</b>	Danimarca, Finlandia, Norvegia, Germania, Francia, Svizzera, Spagna, Asia, Cina. In Italia segnalazioni si hanno nei laghi delle Marche, Umbria, Lazio, Lombardia, Trentino, Veneto e Sicilia.
<b>Cepi di riferimento</b>	CCAP 1459/11 CCAP 1460/1 CCAP 1460/5 NIES 595 CCMP 600 CCMP 601 SAG 382 SAG 32.79 SAG 6.89

***Planktothrix planctonica***

<b>Phylum</b>	Cyanobacteria
<b>Classe</b>	Cyanophyceae
<b>Ordine</b>	Oscillatoriales
<b>Genere</b>	<i>Planktothrix</i>
<b>Specie</b>	<i>P. planctonica</i>
	 <p>Foto: National Science Foundation McMurdo Dry Valley LTER</p>
<b>Autore</b>	Anagnostidis & Komárek (Elenkin)
<b>Anno</b>	1988
<b>Sinonimi</b>	<i>Oscillatoria ornata</i> f. <i>planctonica</i> Elenkin
<b>Descrizione</b>	<p><i>Planktothrix planctonica</i> presenta tricomi dritti o leggermente incurvati. Le pareti trasversali non hanno restringimenti. Le cellule apicali sono di forma sferica prive di caliptra. Cellule vegetative sferiche o cilindriche, con vescicole gassose, 6,7-14,6 µm di diametro. Eterocisti sferiche, 5,5-14,6 µm di diametro. Acineti ellissoidali, solitari o in coppia e distanti dagli eterocisti, 8,8-23,7 µm di diametro e 14,7-39,8 µm di lunghezza. Le cellule mostrano vescicole gassose di dimensioni cospicue, posizionate nel centro della cellula.</p>
<b>Condizioni favorevoli per le fioriture</b>	La temperatura ottimale di crescita è di circa 25°C. Le fioriture si hanno in particolare in primavera ed inizio estate. Cresce a valori di pH anche molto elevati (9,5) e preferisce laghi ipertrofici con alti livelli di nutrienti.
<b>Tossine prodotte</b>	Microcistine (Nogueira <i>et al.</i> , 2001)
<b>Distribuzione</b>	Australia e Nuova Zelanda. Isole Hawaii. In Italia segnalazioni si hanno nei laghi delle Sardegna e della Sicilia.
<b>Ceppi di riferimento</b>	FACHB 708

## ***Planktothrix rubescens***

<b>Phylum</b>	Cyanobacteria
<b>Classe</b>	Cyanophyceae
<b>Ordine</b>	Oscillatoriales
<b>Genere</b>	<i>Planktothrix</i>
<b>Specie</b>	<i>P. rubescens</i>
	<p>Foto: Daniel Stainer - Swiss Federal Institute for Environmental Science and Technology)</p> 
<b>Autore</b>	Anagnostidis & Komárek (De Candolle ex Gomont)
<b>Anno</b>	1988
<b>Sinonimi</b>	<i>Oscillatoria rubescens</i> De Candolle ex Gomont 1892
<b>Descrizione</b>	Le cellule di <i>P. rubescens</i> formano tricomi di color rosso porpora o rosso bruno senza visibile guaina. Il diametro medio dei tricomi è 7 µm, la loro lunghezza è variabile e può raggiungere pochi mm. I tricomi sono composti da cellule adiacenti tutte identiche tra loro, di forma tonda, assottigliata o conica, tranne quelle apicali, che vengono usate per il riconoscimento morfologico. La lunghezza delle cellule è di 1,1-4,9 µm ed il diametro è di 3,9-9,4 µm.
<b>Condizioni favorevoli per le fioriture</b>	Specie <i>P. rubescens</i> contengono soprattutto ficoeritrina. Sono comuni in corpi d'acqua profondi, stratificati, oligotrofici o mesotrofici. Dovrebbero essere adattate a crescere in condizioni di basse radiazioni luminose, in virtù del loro corredo pigmentario ricco di carotenoidi. Temperatura ottimale di crescita è 10-20°C e la salinità tollerata è 4,3‰. Le fioriture, ben visibili di colore rosso porpora, si verificano in autunno-inverno.
<b>Tossine prodotte</b>	Microcistine (Chorus <i>et al.</i> , 1999)
<b>Distribuzione</b>	Cosmopolita. In Italia segnalazioni sempre più frequenti provengono dai laghi del Lazio, della Sicilia, della Sardegna, delle Marche, della Lombardia, del Trentino, del Veneto e del Piemonte.
<b>Ceppi di riferimento</b>	CCAP 1459 CCAP 1460=STAUB 1961/SAG 5.89 UTCC 507 SAG 5.89

## Bibliografia

- Banker PD, Carmeli S, Hadas O, Teltsch B, Porat R, Sukenik A. Identification of cylindrospermopsin in *Aphanizomenon ovalisporum* (Cyanophyceae) isolated from Lake Kinneret, Israel. *J Phycol* 1997;33:613-6.
- Barone R, Naselli Flores L. Bloom di cianobatteri nei laghi siciliani. In: Funari E (Ed.) *Aspetti sanitari della problematica dei cianobatteri nelle acque superficiali italiane. Workshop. Atti*. Roma, 16-17 dicembre 1999. Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2000. (Rapporti ISTISAN 00/30). p.93-101.
- Beattie KA, Kaya K, Sano T, Codd GA. Three dehydrobutyryne-containing microcystins from *Nostoc*. *Phytochemistry* 1998;47:1289-92.
- Berg K, Skulberg O, Underdal B, Willen T. Observations of toxic blue-green algae (Cyanobacteria) in some Scandinavian lakes. *Acta Vet Scand* 1986;27:440-52.
- Bogialli S, Bruno M, Curini R, Di Corcia A, Fanali C, Laganà A. Monitoring algal toxins in lake water by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Environ Sci Technol* 2006;40(9):2917-23.
- Bold HC, Wynne MJ. *Introduction to the algae. Structure and reproduction*. 2<sup>nd</sup> ed. New Jersey: Prentice-Hall Inc. Eaglewood Cliffs NJ; 1985.
- Bumke-Vogt C, Mailahn W, Chorus I. Anatoxin-a and neurotoxic cyanobacteria in German lakes and reservoirs. *Env Toxicol Water Qual* 1998;14(1):117-125.
- Carmichael WW, Mahmood KA. Toxins from Freshwater Cyanobacteria. *ACS Symposium Series* 1984;262:377-89.
- Carmichael WW, Beasley V, Bunner DL, Eloff JN, Falconer I, Gorham P, Harada K, Krishnamurthy T, Yu M-J, Moore RE, Reinhart M, Runnegar M, Skulberg OM, Watanabe M. Naming of cyclic heptapeptide toxins of cyanobacteria (blue-green algae). *Toxicon* 1988;26:971-3.
- Carmichael WW. A new procedure for the analysis and purification of naturally occurring anatoxin-a from the blue-green alga *Anabaena flos-aquae*. *Toxicon* 1989;27(12):1289-96.
- Carmichael WW, Evans WR, Yin QQ, Bell P, Moczydlowski E. Evidence for paralytic shellfish poisons in the freshwater cyanobacterium *Lyngbya wollei* (Farlow ex Gomont) comb. nov. *Appl Environ Microbiol* 1997;63(8):3104-10.
- Cattini MG. Fioriture tossiche negli invasi della Sardegna: In: Mattei D, Melchiorre S, Messineo V, Bruno M (Ed.). *Diffusione delle fioriture tossiche nelle acque italiane: gestione del rischio ed evidenze epidemiologiche*. Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2005. (Rapporti ISTISAN 05/29). p. 11-7.
- Chorus I, Bartram J (Ed.). *Toxic cyanobacteria in water: a guide to their public health consequences, monitoring and management*. London: E & FN Spon; 1999.
- Cronberg G, Carpenter EJ, Carmichael WW. Taxonomy of harmful cyanobacteria. In: Hallegraeff GM, Anderson DM, Cembella AD (Ed.). *Manual on harmful marine microalgae*. UNESCO publishing; 2003.
- Dor I, Danin A. Cyanobacterial desert crusts in the Dead Sea Valley, Israel. *Arch Hydrobiol Suppl* 1996;83:197-206.
- Duy TN, Lam PKS, Shaw GR, Connell DW. Toxicology and risk assessment of freshwater cyanobacterial (blue-green algal) toxins in water. *Rev Environ Contam Toxicol* 2000;163:113-86.
- Farre A. On the minute structure of certain substances expelled from the human intestine, having the ordinary appearance of shreds of Lymph, but consisting entirely of filaments of a Confervoid type, Probably belonging to the genus *Oscillatoria*. *Trans Microscop Soc Lond* 1842;1:92-100.
- Fay P. Heterotrophic and nitrogen fixation in *Chlorogloea fritschii*. *J. Gen. Microbiol.* 1965; 39:11-20.

- Fitch CP, Bishop LM, Boyd WL. "Waterbloom" as a cause of poisoning in domestic animals. *Cornell Vet* 1934;24:30-9.
- Francis G. Poisonous Australian lake. *Nature* 1878;18:11-2.
- Gallon JR, Jones DA, Page TS *Trichodesmium*, the paradoxical diazotroph. *Arch Hydrobiol Suppl* 1996;83:215-43.
- Garibaldi L, Buzzi F, Morabito G, Salmasso N, Simona M. I cianobatteri fitoplanctonici dei laghi profondi dell'Italia settentrionale. In: Funari E (Ed.). *Aspetti sanitari della problematica dei cianobatteri nelle acque superficiali italiane. Workshop. Atti*. Roma, 16-17 dicembre 1999. Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2000. (Rapporti ISTISAN 00/30). p.117-35.
- Garibaldi L, Mezzanotte V, Bizzo MC, Varallo A, Mosello R. Apporti di fosforo al Sebino. Confronto fra misure sperimentali e teoriche. *Acqua Aria* 1998;9:105-10.
- Garnett C, Shaw G, Moore D, Florian P, Moore M. *Impact of climate change on toxic cyanobacterial (blue-green algal) blooms and algal toxin production in Queensland*. Brisbane: National Research Centre of Environmental Toxicology (ENTOX); 2003.
- Gkelis S, Harjunpää V, Vardaka E, Lanaras T, Sivonen K. Occurrence of microcystins in Greek water blooms and isolated strains. In: *5th Int. Conf. Toxic Cyanobacteria*. Noosa, Queensland, Australia, 15-20 July 2001.
- Harada K, Ogawa K, Kimura Y, Murata H, Suzuki M, Thorn PM, Evans WR, Carmichael WW. Microcystins from *Anabaena flos-aquae* NRC 525-17. *Chem Res Toxicol* 1991;4(5):535-40.
- Harada KI, Ohtani I, Iwamoto K, Suzuki M, Watanabe MF, Watanabe M, Terao K. Isolation of cylindrospermopsin from a cyanobacterium *Umezakia natans* and its screening method. *Toxicon* 1994;32:73-84.
- Hawkins PR, Runnegar MT, Jackson AB, Falconer IR. Severe hepatotoxicity caused by the tropical cyanobacterium (blue-green algae) *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska) Seenaya and Subba Raju isolated from a domestic water supply reservoir. *Appl Environ Microbiol* 1985;50:1292-5.
- Hawser SP, Beattie KA, Lambert JJ, Codd GA. Characterization of novel neurotoxicity in *Oscillatoria agardhii* and *Anabaena flos-aquae*. *Br Phyc J* 1990;25:89-90.
- Himberg K. Determination of anatoxin-a, the neurotoxin of *Anabaena flos-aquae* cyanobacterium, in algae and water by gas chromatography-mass spectrometry. *J Chromatog A* 1989;481:358-62.
- Henriksen P. *Toxic cyanobacteria/blue-green algae in Danish freshwater*. [tesi di dottorato]. Copenhagen: Botanical Institute, University of Copenhagen; 1996.
- Henriksen P, Carmichael WW, An J, Moestrup O. Detection of an anatoxin-a(s)-like anticholinesterase in natural blooms and cultures of cyanobacteria/blue-green algae from Danish lakes and in the stomach contents of poisoned birds. *Toxicon* 1997;35:901-13.
- Humpage AR, Rositano J, Bretag AH, Brown R, Baker PD, Nicholson BC, Steffensen DA. Paralytic shellfish poisons from Australian cyanobacterial blooms. *Aust J Mar Freshwater Res* 1994;45:761-71.
- Hutchinson GE. *A treatise on limnology*. Vol. 1. Geography, physics, and chemistry. New York: John Wiley & Sons; 1957.
- Jochimsen EM, Carmichael WW, An J, Cardo DM, Cookson ST, Holmes CEM, Antunes MB de C, Filho de MDA, Lyra TM, Barreto VST, Azevedo SMFO, Jarvis WR. Liver failure and death after exposure to microcystins at a hemodialysis center in Brazil. *N Engl J Med* 1998;338 (Suppl. 13):873-8.
- Klemer AR. The vertical distribution of *Oscillatoria agardhii* var. *isothrix*. *Arch Hydrobiol* 1976;78:343-62.
- Kurmayer R, Dittman E, Fastner J, Chorus I. Diversity of microcystin genes within a population of the toxic cyanobacterium *Myrocystis* spp. in lake Wannsee (Berlin, Germany). *Microb Ecol* 2002;43:107-18.

- Lanaras T, Tsitsamis S, Chlichlia C, Cook CM. The toxic cyanobacteria in Greek freshwater. *J Appl Phycol* 1989;1:67-73.
- Langeron M. Les Oscillariees parasite du tube dogestif de l'homme et des animaux. *Ann Parasitol* 1923a;1(1):75-89.
- Langeron M. Les Oscillariees parasite du tube dogestif de l'homme et des animaux. *Ann Parasitol* 1923b;1(2):113-23.
- Li R, Carmichael WW, Pereira P. Morphological and 16S rRNA gene evidence for reclassification of the paralytic shellfish toxin producing *Aphanizomenon flos-aquae* LMECYA 31 as *Aphanizomenon issatschenkoi* (Cyanophyceae) (Note). *J Phycol* 2003;39:814-8.
- Lindholm T, Eriksson JE, Reinikainen M, Meriluoto JAO. Ecological effects of hepatotoxic cyanobacteria. *Environ Toxicol Water Qual* 1992;7:87-93.
- Lukac M, Aegerter R. Influence of trace metals on growth and toxin production of *Microcystis aeruginosa*. *Toxicon* 1993;31:293-305.
- Manfredini E, Ghion F. Fioriture algali in Emilia Romagna: le valli di Comacchio e l'oasi naturalistica di Valle Santa. In: Mattei D, Melchiorre S, Messineo V, Bruno M (Ed.). *Diffusione delle fioriture tossiche nelle acque italiane: gestione del rischio ed evidenze epidemiologiche*. Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2005 (Rapporti ISTISAN 05/29). p. 49-53.
- Mankiewicz J, Tarczynska M, Walter Z, Zalewski M. Natural toxins from cyanobacteria. *Acta Biol Cracov Bot* 2003;45:9-20.
- Manti G, Mattei D, Messineo V, Melchiorre S, Bogialli S, Sechi N, Casiddu P, Lugliè A, Di Brizio M, Bruno M. First report of *Cylindrospermopsis raciborskii* in Italy. *Harmful Algae News* 2005; 28:8-9.
- Mateo A, Funck D, Muhlenbock P, Kular B, Mullineaux PM, Karpinski S. Controlled levels of salicylic acid are required for optimal photosynthesis and redox homeostasis. *J Exp Bot* 2006;57:1795-807.
- May V. The occurrence of toxic cyanophyte blooms in Australia. In: Carmichael WW (Ed.) *The aquatic environment. Algal toxin and health*. New York: Plenum Press; 1981. p. 127-42.
- Mahmood NA, Carmichael WW. Anatoxin-a(s), an anticholinesterase from the cyanobacterium *Anabaena flos-aquae* NRC-525-17. *Toxicon* 1987;25(11):1221-7.
- Melchiorre S, Viaggiu E, Bruno M. *Workshop. Le fioriture di alghe tossiche nelle acque dolci: emergenza sanitaria e misure di controllo*. Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2000. (Rapporti ISTISAN 02/9).
- Messineo V, Mattei D, Melchiorre S, Salvatore G, Bogialli S, Salzano S, Mazza R, Capelli G, Bruno M. Microcystin diversity in a *Planktothrix rubescens* population from Lake Albano (Central Italy). *Toxicon* 2006;48(2):160-74.
- Moore RE, Cheuk C, Patterson GML. Hapalindoles: new alkaloids from the blue-green alga *Hapalosiphon fontinalis*. *J Am Chem Soc* 1984;106:6456-7.
- Naselli Flores L, Barone R. Phytoplankton and light climate in a hypertrophic reservoir (Lake Arancio, Sicily). *Gior Bot Ital* 1995;129:1288-92.
- Nogueira I, Vasconcelos V. Toxicity of two filamentous cyanobacteria species – *Planktothrix planctonica* and *P. perornata*. In: *5th Int. Conf. Toxic Cyanobacteria*, Noosa, Queensland, Australia, 15-20 July 2001.
- Onodera H, Oshima Y, Henriksen P, Yasumoto T. Confirmation of anatoxin-a(s) in the cyanobacterium *Anabaena lemmermannii* as the cause of bird kills in Danish lakes. *Toxicon* 1997;35:1645-8.
- Oshima Y. Postcolumn derivatization liquid chromatographic methods for paralytic shellfish toxins, *J AOAC Int* 1995;78:528-32.
- Paerl HW, Tucker J, Bland PT. Carotenoid enhancement and its role in maintaining blue-green algal (*Microcystis aeruginosa*) surface blooms. *Limn Oceanogr* 1983;28:847-57.

- Park H-D, Watanabe MF, Harada K, Nagai H, Suzuki M, Watanabe M, Hayashi H. Hepatotoxin (Microcystin) and neurotoxin (Anatoxin-a) contained in natural blooms and strains of cyanobacteria from Japanese freshwaters. *Nat Toxins* 1993;1:353-60.
- Pereira P, Renhui L, Carmichael WW, Dias E, Franca S. Taxonomy and production of paralytic shellfish toxins by the freshwater cyanobacterium *Aphanizomenon gracile* LMECYA40. *Eur J Phycol* 2004;39:361-8.
- Pearson MJ, Ferguson AJD, Codd GA, Reynolds CS, Fawell JK, Hamilton RM, Howard SR, Attwood MR. *Toxic blue-green algae*. London: National Rivers Authority; 1990. (*Water Quality Series*, No. 2).
- Prescott GW. *The algae: a review*. Boston: Houghton Mifflin Co.; 1986.
- Preussel K, Stuken A, Wiedner C, Chorus I, Fastner J. First report on cylindrospermopsin producing *Aphanizomenon flos-aquae* (Cyanobacteria) isolated from two German lakes. *Toxicon* 2006;47(2):156-62.
- Prinsep MR, Caplan FR, Moore RE, Patterson GML, Honkanen RE, Boynton AL. Microcystin-LA from a blue-green alga belonging to the Stigonematales. *Phytochemistry* 1992;31:1247-8.
- QWQTF. *Report on fresh zoater algal blooms in Queensland. Vol. 1. Main report*. Brisbane: Queensland Water Quality Task Force; 1992.
- Rapala J, Sivonen K, Lyra C, Niemela SI. Variation of microcystins, cyanobacterial hepatotoxin in *Anabaena* spp. as a function of growth stimuli. *Appl Environ Microbiol* 1997;64:2206-12.
- Rapala J, Sivonen K, Luukkainen R, Niemelä SI. Anatoxin-a concentration in *Anabaena* and *Aphanizomenon* at different environmental conditions and comparison of growth by toxic and non-toxic *Anabaena* strains - a laboratory study. *J Appl Phycology* 1993;5:581-91.
- Rapala J, Robertson A, Negri AP, Berg KA, Tuomi P, Lyra C, Erkoma K, Lahti K, Hoppu K, Lepisto L. First report of saxitoxin in Finnish lakes and possible associated effects on human health. *Environ Toxicol* 2005; 20(3):331-340.
- Ressom R, Soong FS, Fitzgerald J, Turczyonowicz L, El Saadi O, Roder D, Maynard T, Falconer I. *Health Effects of Toxic Cyanobacteria (Blue-Green Algae)*. Canberra, Australia: National Health and Medical Research Council, Looking Glass Press; 1994.
- Reuter JG, Petersen RR. Micronutrient effects on cyanobacterial growth and physiology. *N Z J Mar Freshwater Res* 1987;21:435-45.
- Reynolds CS, Walsby AE. Water-blooms. *Biol Rev* 1975;50:437-81.
- Reynolds CS. *The ecology of freshwater phytoplankton*. Cambridge: Cambridge University Press; 1984.
- Reynolds P. Cyanobacterial waterblooms. In: Callow ME (Ed.). *Advance in botanical research*. London: Academic Press; 1987. p. 67-143.
- Rohrlack T, Christoffersen K, Hansen PE, Zhang W, Czarnecki O, Henning M, Fastner J, Erhard M, Neilan BA, Kaebnick M. Isolation, characterization, and quantitative analysis of Microviridin J, a new microcystis metabolite toxic to *Daphnia*. *J Chem Ecol* 2003;29:1757-70.
- Rosenberg DB, Freeman SM. Succession theory, eutrophication, and water quality. In: Rose J (Ed.) *Water and the environment*. Philadelphia: Gordon and Breach Science Publishers; 1991. p.239-51.
- Salmaso N. Fioriture di cianobatteri nei laghi profondi dell'Italia settentrionale. In: Mattei D, Melchiorre S, Messineo V, Bruno M (Ed.). *Diffusione delle fioriture tossiche nelle acque italiane: gestione del rischio ed evidenze epidemiologiche*. Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2005 (Rapporti ISTISAN 05/29). p. 30-48.
- Sechi N. La struttura algale e lo stato trofico dei laghi della Sardegna. In: Funari E (Ed.). *Aspetti sanitari della problematica dei cianobatteri nelle acque superficiali italiane. Workshop. Atti*. Roma, 16-17 dicembre 1999. Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2000. (Rapporti ISTISAN 00/30). P.101-10.

- Serenelli F. Fioriture tossiche di *Planktothrix rubescens agardhii* nei laghi della provincia di Macerata. In: Mattei D, Melchiorre S, Messineo V, Bruno M (Ed.). *Diffusione delle fioriture tossiche nelle acque italiane: gestione del rischio ed evidenze epidemiologiche*. Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2005 (Rapporti ISTISAN 05/29). p. 17-28.
- Simoni F, di Paolo C, Mancino A, Simoni F, Falaschi A. Microcystin concentrations in water and ichthyofauna of Massaciuccoli Wetlands (Tuscany). *Harmful Algae News* 2004;25:4-6.
- Sivonen K, Himberg K, Luukkainen R, Niemela SI, Poon GK, Cood GA. Preliminary characterization of neurotoxic blooms and strains from Finland. *Tox Assess Int* 1989a;4:339-52.
- Sivonen K, Kononen K, Carmichael WW, Dahlem AM, Rinehart KL, Kiviranta J, Niemela SI. Occurrence of the hepatotoxic microcystin homologues from the filamentous freshwater cyanobacterium *Nodularia spumigena* in the Baltic Sea and structure of the toxin. *App Env Microbiol* 1989b;55:1990-5.
- Sivonen K, Skulberg OM, Namikoshi M, Evans WR, Carmichael WW, Rinehart KL. Two methyl ester derivatives of microcystins, cyclic heptapeptide hepatotoxins, isolated from *Anabaena flos-aquae* strain CYA 83/1. *Toxicon* 1992;30(11):1465-71.
- Skulberg OM, Carmichael WW, Andersen RA, Matsunaga S, Moore RE, Skulberg R. Investigations of a neurotoxic Oscillatorialean strain (cyanophyceae) and its toxin. Isolation and characterization of homoanatoxin-a. *Environ Toxicol Chem* 1992;11:321-9.
- Skulberg OM, Carmichael WW, Cood GA, Skulberg R. Taxonomy of toxic Cyanophyceae (Cyanobacteria). 1993. In: Falconer IA (Ed.). *Algal toxin in seafood and drinking water*. London: Academic Press. p. 145-63.
- St Amand A. *Cylindrospermopsis*: an invasive toxic algae. *LakeLine* 2002;22:36-8.
- Teneva I, Asparuhova D, Dzhambazov B, Mladenov R, Schirmer K. The freshwater cyanobacterium *Lyngbya aeruginosa-coerulea* produces compounds toxic to mice and to mammalian and fish cells. *Environ Toxicol* 2003;18(1):9-20.
- Tisdale ES. The 1930-1931 drought and its effect upon public water supply. *Am J Public Health* 1931;21:1203-18.
- Tore L, Vesterkvist P, Spoof L, Lundberg-Niinistö C, Meriluoto J. Microcystin occurrence in lakes in Åland, SW Finland. *Hydrobiologia* 2003;505:129-38.
- Veldee MV. An epidemiological study of suspected water-borne gastroenteritis. *Am J Public Health* 1931; 21(9):1227-35.
- Vezie C, Briant L, Sivonen K, Bertru G, Lefeuvre J-C, Salkinoja-Salonen M. Variation of microcystin content of cyanobacterial blooms and isolated strains in Lake Grand-Lieu (France). *J Microbial Ecol* 1998;35(2):126-35.
- Walsby AE, Klemer AR. The role of gas vacuoles in the microstratification of a population of *Oscillatoria agardhii* var. *isothrix* in Deming Lake (Minnesota). *Arch Hydrobiol* 1974;74:375-92.
- Watanabe MF, Oishi S, Harada K-L, Matsura K, Kawai H, Suzuki M. Toxins contained in *Microcystis* species of cyanobacteria (Blue-green algae). *Toxicon* 1988;26:1017-25.
- White JD, Hansen JD. Total Synthesis of (-)-7-Epicylindrospermopsin, a toxic metabolite of the freshwater cyanobacterium *aphanizomenon ovalisporum*, and assignment of its absolute configuration. *Org Chem* 2005;70(6):1963-77.
- Yasuno M, Sugaya Y, Kaya K, Watanabe MM. Variations in the toxicity of the *Microcystis* species to *Moina macroscopica*. In: *1st Int. Congr. Toxic Cyanobacteria*, 20-24 August 1995, Rønne, Denmark. 1995.

## METODI CHIMICI PER LA RILEVAZIONE DELLE CIANOTOSSINE

Simona Scardala (a), Sara Bogialli (b), Antonio Di Corcia (b)

(a) Dipartimento di Ambiente e Connessa Prevenzione Primaria, Istituto Superiore di Sanità, Roma

(b) Dipartimento di Chimica, Università degli Studi "La Sapienza", Roma

### Introduzione

I cianobatteri producono un'ampia varietà di composti tossici, tra cui le epatotossine, come le microcistine (MC) e le nodularine (NOD), le citotossine, come la cilindrospermopsina (CYN) e le neurotossine come l'anatossina-a(s), le anatossine (ATX) e le tossine denominate *Paralytic Shellfish Poisoning* (PSP).

Per queste sostanze è disponibile una vasta scelta di metodi, da quelli di screening, basati su saggi biologici (test immunologici o basati su attività enzimatica), ai metodi chimico-fisici che si basano essenzialmente su tecniche di separazione cromatografica accoppiate a diversi rivelatori (cromatografia liquida (*Liquid Chromatography*, LC) seguita da rivelatore UV, fluorimetro (*FLuorimeter*, FL) e spettrometro di massa (*Mass Spectrometer*, MS).

Altre tecniche utilizzate, anche se molto meno comuni, sono l'elettroforesi capillare e la spettrometria di massa MALDI-TOF (*Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization – Time Of Flight*).

A prescindere dal metodo utilizzato, ci sono alcuni criteri validi universalmente che devono essere soddisfatti per dare risultati affidabili:

- le tossine devono essere identificate in modo inequivocabile;
- deve essere disponibile uno standard analitico per la tossina specifica così che le concentrazioni possano essere determinate accuratamente.

In questo capitolo saranno trattate anche la conservazione e la preparazione del campione, intesi come passaggi critici per assicurare un'accurata determinazione delle tossine. In fase di conservazione del campione, ad esempio, si può causare involontariamente la lisi cellulare o la degradazione fotochimica o microbiologica delle cianotossine, alterando il risultato finale.

Per determinare correttamente la concentrazione delle tossine presenti in un campione acquoso, infatti, bisogna ricordare che per tutti i cianobatteri tossici le tossine prodotte possono trovarsi sia disciolte nell'acqua (contenuto extracellulare) che contenute all'interno delle cellule (contenuto intracellulare). Per consentire il rilascio della frazione intracellulare è necessario quindi causare la lisi cellulare. Tale processo può essere condotto come primo step in modo tale che venga misurato il contenuto totale di tossine, oppure le cellule possono essere separate dall'acqua in modo da analizzare separatamente il contenuto intra- ed extra- cellulare. La tecnica più appropriata per la lisi cellulare consiste nel congelare e scongelare i campioni solubilizzati in un solvente appropriato alla tossina in esame, generalmente acqua, metanolo o soluzioni acide.

Per ciò che concerne la determinazione del contenuto intracellulare di cianotossine, dal punto di vista analitico è impossibile valutare con certezza le percentuali di recupero, non essendo possibile effettuare contaminazioni sulle cellule stesse, quindi sarà consigliata la procedura che fornisce i recuperi maggiori con una precisione accettabile.

## Microcistine e nodularine

Le MC (Figura 1) sono eptapeptidi monociclici con peso molecolare che può variare da 500 a 4000 Da anche se la maggior parte delle MC ha peso molecolare (PM) compreso tra 900 e 1100 Da.

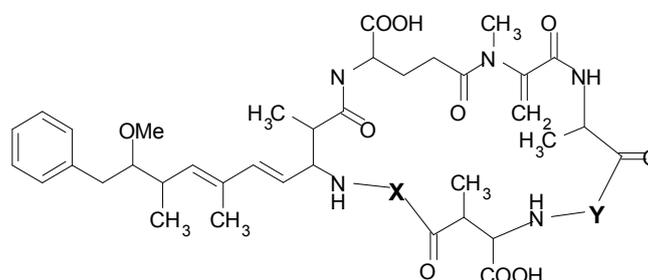


Figura 1. Struttura chimica delle MC

La struttura generale delle MC è costituita da tre D-amminoacidi (aa) (D-alanina, D-eritro- $\beta$ -metilaspartato e D-glutammato; la *N*-metildiidro-alanina; l'Adda, un amminoacido aromatico tipico dei cianobatteri e due L-amminoacidi variabili X e Y, la cui presenza identifica i diversi congeneri conosciuti (attualmente circa 80) (Sivonen & Jones, 1999; McElhiney & Lawton, 2005).

I più comuni sostituenti X sono leucina (L), arginina (R) e tirosina (Z), mentre i sostituenti Y sono arginina (R), alanina (A) e metionina (M) (Carmichael, 1988). Le diverse microcistine si identificano proprio attraverso un suffisso, che indica i due L-amminoacidi X ed Y presenti, ad es. MC-LR, MC-RR, MC-YR. Inoltre, piccole alterazioni nella struttura di altri aa, incluso l'Adda (es. demetilazioni e esterificazioni o presenza di isomeri geometrici) dà luogo ad un numero elevato di altri congeneri. I vari congeneri possono avere tossicità molto diverse tra loro; sono state identificate anche varianti non tossiche, come ad esempio la variante contenente il 6Z-stereoisomero dell'Adda. In generale, quasi tutte le modificazioni a carico dell'Adda generano composti non o molto poco tossici (van Apeldoorn *et al.*, 2007).

Le nodularine (NOD) (Figura 2) sono pentapeptidi monociclici contenenti l'Adda e con struttura analoga a quella delle MC (Rinehart *et al.*, 1988): ad oggi si conoscono pochi congeneri, identificati per la variabilità dell'unico L-amminoacido presente in posizione 2, oltre a piccole modificazioni strutturali come le demetilazioni.

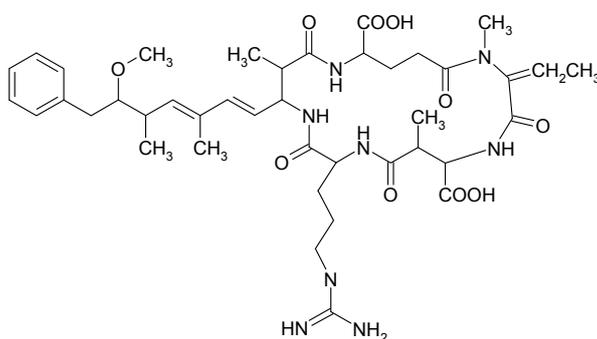


Figura 2. Struttura chimica della NOD

Anche per le NOD è stata identificata la variante non tossica contenente il 6Z-stereoisomero dell'Adda.

## Conservazione del campione

Alla conservazione del campione in genere non viene attribuita grande importanza, in realtà uno stoccaggio errato può portare ad una inesatta quantificazione delle tossine.

Le MC e le NOD sono relativamente stabili in soluzioni acquose sterili ed in MeOH, tuttavia in presenza di pigmenti possono degradare per via fotochimica con una certa rapidità (Nicholson & Burch, 2001). Per questo motivo è bene conservare al buio i campioni che contengono detriti cellulari e tossine disciolte.

Il pH non sembra avere grande rilevanza per la stabilità di MC e NOD, mentre tali tossine sono soggette a degradazione microbica. È consigliabile quindi mantenere i campioni in frigorifero fino all'analisi in quanto il freddo rallenta l'attività microbica. Tale effetto è molto evidente per la NOD; è stato dimostrato che questa degrada molto velocemente in campioni mantenuti a temperatura ambiente ed in modo particolare nei campioni prelevati da *bloom* piuttosto vecchi. L'emivita della NOD in tali campioni è risultata essere di 24 ore rispetto alle 54 ore rilevate in campioni di laghi non soggetti a fioriture (Heresztyn & Nicholson, 1997). Ad ulteriore conferma dell'origine di tale degradazione, la NOD è risultata stabile in acqua pura, sterile e in acqua trattata con rame, in tutti questi casi si suppone che la quantità di microorganismi presenti sia minima (Nicholson & Burch, 2001).

È inoltre da considerare la stabilità delle singole tossine nei solventi di estrazione. La conservazione in frigo o in congelatore viene generalmente accettata come condizione necessaria alla prevenzione della degradazione dei composti in esame, tuttavia studi di laboratorio hanno mostrato che per la MC-RR a 4°C la stabilità varia in funzione del solvente utilizzato (Nicholson & Burch, 2001). Tale studio ha mostrato come sia preferibile, qualora la determinazione finale non venga effettuata subito dopo l'estrazione, l'utilizzo di metanolo puro o al massimo al 75% piuttosto che acqua o acido acetico al 5%.

Infine un lavoro di Ikawa *et al.* (1999) ha mostrato come i normali additivi della plastica possono contaminare i campioni acquosi. Tali additivi possono avere tempi di ritenzione simili a quelli delle MC e poiché esibiscono assorbimento nella stessa regione dello spettro UV (238 nm), possono falsare il risultato delle analisi se si lavora in LC-UV. Per questo motivo si dovrebbero evitare i materiali plastici e preferire bottiglie in vetro scuro.

## Preparazione del campione

### Estrazione da tessuti

Per l'estrazione da tessuti sono state utilizzate diverse miscele di solventi:

- n-butanolo-metanolo-acqua (5:20:75) (Li *et al.*, 2005; Lehtonen *et al.*, 2003);
- metanolo puro (Soares *et al.*, 2004);
- metanolo 75% (Cazenave *et al.*, 2005);
- acqua calda (Bogialli *et al.*, 2005).

È tuttavia possibile che le MC formino legami covalenti attraverso la *N*-metildeidroalanina con le subunità catalitiche della proteina-fosfatasi 1 e 2. La formazione di tale addotto riduce l'efficacia dell'estrazione. Ott e Carmichael (2006) hanno messo a punto un metodo per determinare le MC totali (sia libere che legate), tale metodo prevede l'ossidazione del campione e la successiva determinazione dell'MMPB (acido 2-metil-3-metossi-4-fenilbutirrico) prodotto

dall'ammoniacido Adda. La NOD invece, non formando tale addotto viene estratta dai tessuti con maggiore facilità (Meriluoto, 1997).

### **Estrazione da *bloom***

Diversi studi hanno mostrato come nella fase di crescita del *bloom* le tossine siano contenute all'interno delle cellule, diventa quindi necessario un processo attivo di estrazione. Il primo passo consiste quindi proprio nel causare la lisi cellulare. In parte la lisi viene provocata già dal processo di liofilizzazione spesso utilizzato per isolare il *bloom* oggetto delle analisi. In molti lavori viene invece preferito effettuare la lisi con più cicli di congelamento (-20°C) /scongelo o congelamento/essiccazione del campione. Si può anche procedere essiccando le cellule in stufa a 95°C o a 70°C e completando poi l'estrazione sonicando il campione (Meriluoto, 1997).

L'estrazione delle microcistine una volta causata la lisi cellulare può essere effettuata utilizzando solventi diversi come soluzioni acquose di acido acetico in proporzioni diverse o soluzioni idro-alcoliche (Harada *et al.*, 1997).

Il metanolo puro e l'acqua risultano essere i solventi migliori per l'estrazione delle MC idrofobiche ed idrofiliche rispettivamente (Barco *et al.*, 2005). L'utilizzo dell'acido acetico ha mostrato recuperi molto bassi per le MC più idrofobiche dal momento che la solubilità delle MC cambia in funzione del grado di protonazione dei gruppi carbossilici. L'utilizzo di miscele H<sub>2</sub>O:MeOH risulta quindi essere il compromesso migliore. La miscela che permette la migliore estrazione per tutte le varianti è costituita da MeOH-H<sub>2</sub>O al 75-80% (Barco *et al.*, 2005).

### **Matrice acquosa**

Per i campioni acquosi è difficile indicare una procedura standard a causa della variabilità della matrice di partenza. Infatti, contenuto di carbonio organico disciolto, di minerali, di cloro residuo e pH possono avere valori molto diversi da campione a campione. In generale il campione acquoso prima di essere concentrato e purificato viene filtrato su filtri GF/C per rimuovere cellule, detriti cellulari e materiale particolato che potrebbero interferire con le analisi successive. Qualora si tratti di acque potabili è raccomandabile aggiungere al campione solfito di sodio per rimuovere i residui di cloro libero (Meriluoto, 1997).

### **Procedure di concentrazione e purificazione**

La necessità di rilevare concentrazioni basse, soprattutto nei campioni acquosi, fa sì che sia necessario concentrare il campione.

Ad un semplice processo di evaporazione del campione si preferisce l'utilizzo di cartucce per l'Estrazione in Fase Solida (*Solid Phase Extraction*, SPE) in modo da effettuare, contestualmente alla concentrazione, anche la purificazione del campione. Per MC e NOD generalmente si utilizzano cartucce di tipo C-18 (Meriluoto *et al.*, 1997), ma sono state utilizzate anche cartucce della famiglia dei Carbon Black Grafitizzati, tipo Carbograph (Bogialli *et al.*, 2006) e colonne a immunoaffinità (Aranda-Rodriguez *et al.*, 2003).

In alcuni casi il materiale organico normalmente presente nei campioni, ad es. di acqua di lago, può essere anch'esso concentrato attraverso l'utilizzo di cartucce C-18 con un elevato *endcapping* dei gruppi silanolicci liberi (l'*endcapping* assicura un recupero migliore di tossine come la MC-RR, che possono interagire con i gruppi silanolicci in virtù delle loro proprietà basiche). In casi simili, qualora l'interferenza da parte della matrice diventi consistente, è consigliabile effettuare una seconda estrazione su cartucce a base di gel di silice (Tsuji *et al.*,

1994), l'efficienza di tale seconda estrazione è da attribuire alle interazioni polari tra i gruppi funzionali idrofili presenti nelle tossine ed i silani presenti nelle cartucce.

Nel 1999 Hummert ha riportato un metodo di purificazione utilizzando direttamente cromatografia di permeazione su gel.

## Metodi di rivelazione

La maggior parte dei metodi di analisi riportati in letteratura utilizzano la LC come tecnica separativa. Ci sono però alcuni lavori basati su gas-cromatografia (*Gas Chromatography*, GC). La determinazione si basa sulla identificazione e quantificazione del composto MMPB, derivante dall'aa Adda, spesso eseguita con la spettrometria di massa. Bisogna tuttavia prestare attenzione al fatto che questo composto derivato da un procedimento di ossidazione, fornisce una risposta relativa al contenuto totale di MC, come somma della frazione libera e coniugata (Hilborn *et al.*, 2007; Orr *et al.*, 2003). In alcuni casi è stato proposto uno standard interno deuterato per la quantificazione (Kaya & Sano, 1999), superando la necessità di standard analitici adeguati.

La tecnica separativa più comunemente utilizzata nella determinazione di MC e NOD è l'HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*) a fasi inverse. Le tossine vengono separate tra loro e da eventuali composti endogeni coestratti utilizzando generalmente colonne C-18 o C-8.

La fase mobile maggiormente utilizzata è costituita da acqua e metanolo o acetonitrile. Una maggiore efficienza separativa si ottiene utilizzando gradienti ed aggiungendo opportuni modificanti. Tra questi, si usano frequentemente acetato di ammonio, acido formico, acetico o trifluoroacetico (TFA).

Il TFA aumenta l'efficienza cromatografica sia protonando i gruppi carbossilici dei peptidi, sia come agente di coppia ionica, aumentando la ritenzione dei peptidi scarsamente trattenuti e minimizzando le interazioni tra i gruppi basici degli analiti ed i gruppi silanologici della silice della fase stazionaria (Spoof *et al.*, 2001). La fase mobile acqua e acetonitrile acidificata con TFA ha un'ottima trasparenza all'UV ed è quindi la fase mobile d'elezione per questo tipo di rivelatore. L'acido formico utilizzato generalmente con i rivelatori di massa non dà buoni risultati con i rivelatori UV a causa dell'elevato assorbimento di questo acido alle lunghezze d'onda di interesse, che si traduce in un elevato rumore di fondo (N) con conseguente diminuzione del rapporto segnale/ rumore (S/N) in generale.

L'utilizzo di acetato d'ammonio come tampone ha invece il limite di separare poco le MC che contengono arginina e di non poter essere impiegato ad alte concentrazioni in spettrometria di massa perché poco volatile.

La fase mobile a carattere acido viene ritenuta in genere quella con la maggiore capacità di separare le numerose varianti esistenti.

Per quanto riguarda le colonne vi sono dei limiti all'uso di colonne C-18, ad esempio le MC-LR e MC-YR vengono difficilmente separate, tale separazione si ottiene invece piuttosto facilmente utilizzando una colonna a scambio ionico. La MC-LR e la MC-RR e le rispettive varianti 3-demetilate vengono efficacemente separate anche utilizzando colonne C-16 ammidiche (Spoof *et al.*, 2001).

Il rivelatore più comunemente utilizzato è il rivelatore UV. Le MC e la NOD presentano dei massimi di assorbimento prevalentemente tra i 220 ed i 240 nm. Quasi tutte hanno picchi di assorbanza massima a 238-240 nm, mentre le varianti che contengono amminoacidi aromatici, come il triptofano nella MC-LW presentano un assorbimento massimo a lunghezze d'onda minori e precisamente a 222 nm. Grosso limite dei rivelatori UV è che possono esistere molti composti interferenti con le MC che assorbono alle stesse lunghezze d'onda. In tali casi i

rivelatori *photodiode array* (DAD), che forniscono l'intero spettro di assorbimento delle molecole in esame, consentono di sostenere con maggiore sicurezza la presenza di MC.

Sono stati utilizzati anche rivelatori elettrochimici amperometrici (Meriluoto *et al.*, 1998). Questo rivelatore permette l'analisi di composti elettroattivi che possono essere cioè ossidati, come nel caso delle MC, o ridotti. Il metodo ottimizzato per la rivelazione delle MC-LR, -YR, -RR, è applicabile anche a tutte le altre MC che contengono l'arginina, quindi anche alla NOD, e la tirosina così come è applicabile anche a tutte quelle che contengono altri gruppi ossidabili come ad esempio il triptofano.

Tuttavia l'identificazione inequivocabile delle MC si ottiene solo con rivelatori di massa.

Lo spettro di massa è come un'impronta digitale della molecola in esame e quindi identifica la molecola in modo univoco.

Le MC in particolare, hanno la possibilità di formare ioni monovalenti ma anche bivalenti, a seconda della basicità del componente amminoacidico variabile che ne caratterizza la struttura. Quindi è consigliabile che la scansione di questi composti sia fatta in un doppio range, quello dei monovalenti ( $m/z$  ca 900-1200 Da) e quello dei bivalenti ( $m/z$  ca 450-600 Da).

Ulteriore evoluzione è rappresentata dai più selettivi rivelatori massa tandem e dalle trappole ioniche che forniscono dati sul *pattern* di frammentazione degli ioni con maggiore sensibilità e risoluzione. Tale tecnica si è rivelata molto utile nell'identificazione qualitativa delle MC note ma anche di varianti finora sconosciute o i cui standard non sono disponibili commercialmente (Hummert *et al.*, 2001). Si potrebbe proporre una sorta di screening da effettuare con lo spettrometro di massa a triplo quadrupolo in modalità *Precursor Ion Scan* (Hiller *et al.*, 2007, Bogialli *et al.*, 2006). In questa modalità si possono acquisire tutti i composti che producono lo ione caratteristico delle MC e NOD, che ha un valore di  $m/z$  pari a 135 Da, derivante dalla frammentazione dell'Adda. Anche in questo caso è consigliabile effettuare una scansione nel range di valori di ioni monovalenti e bivalenti. Si può eseguire la stessa operazione anche con un singolo quadrupolo, con minori garanzie in termini di selettività. In casi simili per la quantificazione dei composti di cui non si possedeva lo standard, è stata assunta, in buona approssimazione, la stessa risposta dei composti conosciuti più simili strutturalmente (varianti demetilate e metilate p. es. Bogialli *et al.*, 2006).

Il grosso limite per l'analisi quantitativa rimane comunque in generale per tutte le tecniche di rivelazione la carenza di standard certificati per molte varianti di MC. Infine mancano i dati tossicologici per calcolare la tossicità equivalente rispetto alla MC-LR, tale limite peraltro appartiene a tutte le tecniche che determinano le singole tossine e non la tossicità totale.

In Tabella 1 sono riportati alcuni esempi (presenti in letteratura) di analisi di MC e NOD in diverse matrici. La tabella riporta, inoltre, il metodo di rivelazione utilizzato, il trattamento subito dal campione prima dell'analisi strumentale e i limiti di rilevabilità (*Limit of Detection*, LOD).

**Tabella 1. Metodi di analisi per le MC e NOD**

Tipo di matrice	Molecole analizzate	Pre-trattamento del campione	Metodo di rivelazione	LOD	Bibliografia
Cianobatteri	MC	Estrazione con CHCl <sub>3</sub> :MeOH:H <sub>2</sub> O (7:6:3)	LC-MS/MS	Non specificato	Vieira Frias <i>et al.</i> , 2006
Cianobatteri congelati e scongelati	MC e NOD	Estrazione con MeOH al 75% con un sonicatore a sonda	HPLC/UV LC-MS LC-MS/MS	500pg iniettati (HPLC) 50pg iniettati (LC-MS)	Spoof <i>et al.</i> , 2003

*segue*

continua

Tipo di matrice	Molecole analizzate	Pre-trattamento del campione	Metodo di rivelazione	LOD	Bibliografia
Cianobatteri liofilizzati	MC	Estrazione con CH <sub>3</sub> OOH al 5% in bagno d'ultrasuoni seguita da purificazione su C-18	HPLC/ED	Non specificato	Meriluoto <i>et al.</i> , 1998
	MC e NOD	Estrazione con MeOH-0,1 M CH <sub>3</sub> COOH, sonicando il campione	Q-TRAP	6-100 pg iniettati	Hiller <i>et al.</i> , 2007
Cianobatteri e pesci	MC	Estrazione con MeOH Estrazione con n-butanolo-metanolo- acqua	LC-MS	Non specificato	Li <i>et al.</i> , 2005
Pesci	MC	Estrazione con MeOH 75%	LC/UV LC-ESI-TOF-MS	0,0016-0,4 µg/g	Cazenave <i>et al.</i> , 2005
Tessuti animali	MC	Ossidazione delle MC a MMPB e purificazione con SPE	LC/MS	5ug/g	Ott <i>et al.</i> , 2006
Acqua	MC	SPE utilizzando cartucce Carbograph	LC-MS/MS	2-9 ng/L	Bogialli <i>et al.</i> , 2006

## Cilindrospermopsina

La cilindrospermopsina (CYN) appartiene alla classe degli alcaloidi guanidinici (PM: 415 Da). La molecola è costituita da un gruppo guanidinico triciclico combinato con idrossimetiluracile (Figura 3).

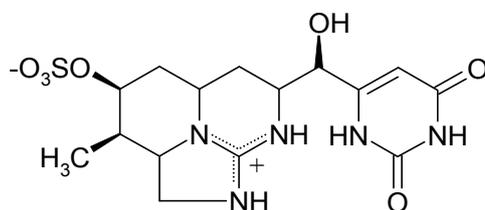


Figura 3. Struttura chimica della CYN

Sono state identificate anche altre varianti strutturali della CYN come, ad esempio, la demetossi-cilindrospermopsina, la deossi-cilindrospermopsina e la 7-epicilindrospermopsina (van Apeldoorn *et al.*, 2007).

## Conservazione del campione

La CYN viene adsorbita fortemente dal polietilene, è bene quindi evitare contenitori in polietilene per il campionamento e/o lo stoccaggio.

La CYN risulta inoltre essere stabile per diverse settimane se conservata al buio a pH compresi tra 4 e 10 e fino a temperature di 50° C, mentre degrada rapidamente alla luce in presenza di detriti cellulari (Nicholson & Burch, 2001).

## **Preparazione del campione**

### **Estrazione da tessuti**

L'estrazione dai pesci della CYN viene effettuata da Saker *et al.* (1999) sonicando il campione in acqua distillata, l'acqua contenente la CYN viene filtrata per eliminare l'eventuale particolato presente ed analizzato.

### **Estrazione da bloom**

Per l'estrazione da *bloom* la maggior parte dei metodi riportati in letteratura utilizzano solventi quali MeOH e H<sub>2</sub>O in diverse proporzioni su campioni preventivamente congelati e scongelati per causare la lisi cellulare o CH<sub>3</sub>COOH al 5% su campioni liofilizzati (Hawkins *et al.*, 1997). L'acqua pura sembra tuttavia essere il miglior solvente di estrazione; è risultata, infatti, efficace anche con un solo step di estrazione (Welker *et al.*, 2002). Solo per evitare fenomeni di ostruzione della colonna da parte di composti insolubili, come composti proteici rilasciati nella lisi cellulare, è stato aggiunto uno step di precipitazione aggiungendo lo 0,1% di TFA prima dell'iniezione in HPLC (Welker *et al.*, 2002).

### **Matrice acquosa**

Contrariamente a quanto accade per le MC la CYN viene rilasciata in acqua in maggiori proporzioni. È bene quindi non trascurare la matrice acquosa e seguire con particolare attenzione la fase di purificazione e concentrazione del campione.

## **Procedure di concentrazione e purificazione**

Dato il carattere estremamente idrofilo della CYN è da escludere l'utilizzo di colonne di tipo C-18 per la purificazione dei campioni acquosi, sono stati invece utilizzati come adsorbenti alcune resine e carbone grafitato (Harada *et al.*, 1994). Metcalf invece nel 2002 ha pubblicato un metodo dove la purificazione e concentrazione della CYN viene effettuata utilizzando in serie cartucce di tipo C-18 e carbone grafitato. In questo caso l'utilizzo della C-18 ha esclusivamente lo scopo di rimuovere i composti lipofili così da non sovraccaricare la seconda cartuccia migliorando sensibilmente la purificazione. In questo sistema l'eluente più efficace, dovendo recuperare concentrazioni a livello di tracce, è risultato essere MeOH al 100% aggiunto di 0,1% di TFA.

## **Metodi di rivelazione**

La CYN viene generalmente analizzata con metodi chimico-fisici basati sulla cromatografia liquida accoppiata a diversi tipi di rivelatore.

### **Cromatografia liquida**

Se si utilizzano rivelatori UV, la CYN ha un picco massimo di assorbimento a 262 nm. Tuttavia questi metodi non sono particolarmente sensibili, Metcalf *et al.* (2002) riporta, infatti,

un LOD di 400 µg/L, è quindi richiesta una forte concentrazione del campione che permette di raggiungere LOD pari a circa 1 µg/L, la concentrazione però può portare all'accumulo di altre sostanze che possono poi interferire con l'analisi.

La scelta della fase mobile può variare l'intensità del segnale registrato in UV. È stato provato, infatti, che l'utilizzo di MeOH e di CH<sub>3</sub>CN a concentrazioni superiori al 50% e 30% rispettivamente si traducono in una riduzione dell'intensità del segnale (Metcalf *et al.*, 2002).

Recentemente sono stati ottimizzati metodi in LC-MS/MS sensibili a tal punto che è possibile iniettare direttamente il campione senza alcun processo di concentrazione o purificazione raggiungendo concentrazioni pari a 1 µg/L (Eaglesham *et al.*, 1999) ma anche inferiori (Bogialli *et al.*, 2006).

In LC-MS vengono monitorati gli ioni molecolari 416 [M+H]<sup>+</sup> per la CYN e 400 [M+H]<sup>+</sup> per la deossi-CYN, mentre in LC-MS/MS vengono monitorate le transizioni 416/194 e 400/194 per la quantificazione delle due tossine rispettivamente e le transizioni 416/176 e 400/176 come conferma degli ioni (Li *et al.*, 2001).

Come metodo di screening è possibile utilizzare l'LC-MS/MS in modalità *Precursor Ion Scan* facendo una scansione del precursore dello ione *m/z* 194 relativo alla perdita del gruppo uracile e alla successiva perdita di SO<sub>3</sub> tipica delle CYN (Hiller *et al.*, 2007).

Un recente lavoro (Rücker *et al.*, 2007) ha mostrato come in Germania la CYN sia stata rilevata anche in molti laghi dove non erano presenti specie notoriamente produttrici. Ciò a dimostrazione del fatto che le informazioni a disposizione su tale tossina sono ancora scarse, soprattutto non sono ancora note tutte le specie che la producono, si consiglia quindi, qualora se ne abbia la possibilità, di effettuare un'analisi di screening (iniezione diretta in LC-MS/MS) per la determinazione della CYN su tutti i campioni contenenti cianobatteri. In Tabella 2 sono riportati alcuni esempi di analisi di CYN.

**Tabella 2. Metodi di analisi per la CYN**

Tipo di matrice	Pre-trattamento del campione	Metodo di rivelazione	LOD	Riferimento bibliografico
Cianobatteri liofilizzati	Estrazione con MeOH-0,1 M CH <sub>3</sub> COOH, sonicazione de campione	Q-TRAP	9 pg iniettati	Hiller <i>et al.</i> , 2007
	Estrazione con MeOH	LC-MS/MS	Non specificato	Stirling <i>et al.</i> , 2001
	Estrazione con MeOH e purificazione su C-18	LC-MS/MS	Non specificato	Li <i>et al.</i> , 2001
	Testate diverse estrazioni con: MeOH, 5%CH <sub>3</sub> COOH, MeOH: 5%CH <sub>3</sub> COOH=1:3, H <sub>2</sub> O	HPLC/PDA	1 ng iniettato	Welker <i>et al.</i> , 2002
	Campione sospeso in H <sub>2</sub> O ed estratto con CH <sub>3</sub> CN:H <sub>2</sub> O:HCOOH=80:19,9:0.1	HILIC-MS	3,2 pmol iniettati	Dell'Aversano <i>et al.</i> , 2004
Cianobatteri e pesci	Sonicazione del campione in H <sub>2</sub> O distillata	LC-MS/MS	0,2 µg/L	Saker <i>et al.</i> , 1999
Cianobatteri e acqua	Filtrazione del campione, purificazione con SPE utilizzando 2 cartucce in serie (C-18 e carbone grafitato)	HPLC/PDA	0,5 µg/L	Metcalf <i>et al.</i> , 2002

## Anatossine

La ATX-a è un alcaloide amminico biciclico a basso peso molecolare (165 Da); la omoanatossina-a è caratterizzata dalla stessa struttura e differisce solo per la presenza di un addizionale gruppo metilico, mentre la ATX-a(s) è invece un estere fosforico della N-idrossi-guanidina (Figura 4).

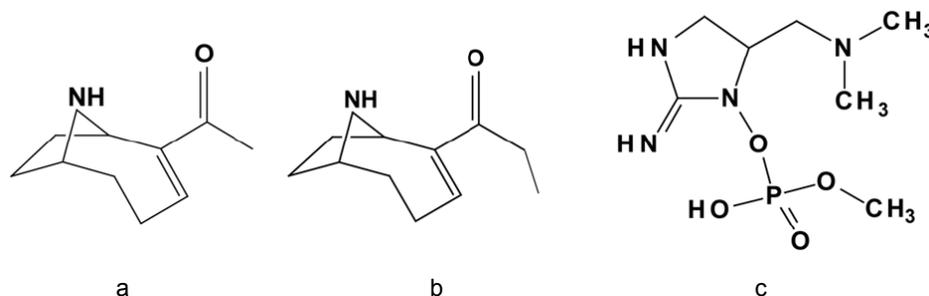


Figura 4. Struttura chimica della ATX-a (a); della omoanatossina (b) e della ATX-a(s) (c)

L'ATX-a(s) è l'unico estere fosforico prodotto dai cianobatteri.

### Conservazione del campione

L'ATX-a è relativamente stabile al buio, mentre se esposta alla luce va incontro a degradazione fotochimica anche in assenza di pigmenti (van Apeldoorn *et al.*, 2007); è da notare come tale degradazione sia indipendente dall'ossigeno a dimostrazione del fatto che non sia da attribuirsi ad una foto-ossidazione ma esclusivamente all'intensità della luce e al pH. Tale degradazione viene accelerata anche da condizioni alcaline (Osswald *et al.*, 2007). È bene quindi conservare i campioni al buio evitando lo stoccaggio con soluzioni alcaline.

### Preparazione del campione

#### Estrazione da tessuti

L'estrazione dai muscoli dei pesci dell'ATX viene effettuata con una miscela MeOH/H<sub>2</sub>O/CH<sub>3</sub>COCH<sub>3</sub>, aggiungendo esano per rimuovere i lipidi dall'estratto. Il residuo acquoso viene quindi addizionato con H<sub>2</sub>O e MeOH e passato su una cartuccia SPE polimerica a base di stirene divinil benzene (Hormazabal *et al.*, 2000).

Un altro metodo presente in letteratura prevede la preparazione di tessuti muscolari di pesce con la tecnica della *Matrix Solid Phase Dispersion* (MSPD). Il campione, omogeneizzato in un mortaio con cristobalite, viene estratto con 4 mL di H<sub>2</sub>O a 80°C acidificata a pH 2 con HCl. Dopo acidificazione e filtrazione, l'estratto viene iniettato all'apparato di rivelazione (Boglialli *et al.*, 2005).

#### Estrazione da bloom

L'estrazione dell'ATX dalle cellule è possibile utilizzando diversi tipi di solventi. I più comuni risultano essere: H<sub>2</sub>O pura, H<sub>2</sub>O acidificata, MeOH acidificato o miscele H<sub>2</sub>O/MeOH. In

una review del 2007 Osswald ha confrontato diversi metodi estrattivi. Da questo lavoro emerge come l'H<sub>2</sub>O acidificata sia il migliore estraente, poiché da i recuperi maggiori, tuttavia l'utilizzo di MeOH al 50% riduce il numero dei picchi interferenti e da comunque buoni recuperi. L'uso del MeOH puro ha invece il vantaggio di essere veloce da evaporare. Come per le MC, l'estrazione delle ATX dalle cellule richiede la lisi cellulare, a questo scopo i campioni di *bloom* vengono congelati-scongelati o liofilizzati. Tali procedure vengono normalmente coadiuvate da processi meccanici quali l'agitazione o la sonicazione. La sonicazione, meglio se effettuata con sonicatore ad immersione piuttosto che con il bagnetto ad ultrasuoni, seguita da centrifugazione per rimuovere i detriti cellulari, risulta essere il metodo maggiormente utilizzato (Osswald *et al.*, 2007).

### **Matrice acquosa**

Per campioni acquosi o anche per gli estratti cellulari è possibile effettuare l'estrazione anche con un'estrazione liquido-liquido (*Liquid-Liquid Extraction*, LLE) (Fromme *et al.*, 2000) con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> a pH 11. La LLE ha comunque il grande svantaggio di richiedere l'uso di elevate quantità di solventi tossici (Osswald *et al.*, 2007), si preferiscono quindi tecniche di SPE.

### **Procedure di concentrazione e purificazione**

La maggior parte dei metodi di concentrazione e purificazione delle ATX prevedono l'utilizzo di tecniche di SPE. I metodi più comuni prevedono che il campione venga caricato su cartucce (Pietsch *et al.*, 2001; Ballot *et al.*, 2005) o dischi (Takino *et al.* 1999) di tipo C-18 ed eluito con MeOH. Possono essere utilizzate anche cartucce a debole scambio cationico per campioni acquosi o estratti dalle cellule e portati a pH 7 (James *et al.*, 1997). L'eluizione in questo caso è stata effettuata con MeOH allo 0,2% di TFA. Con questo metodo si ottengono percentuali di recupero intorno all'85% per tutte le ATX.

Namera *et al.* (2002) hanno messo a punto un metodo per la simultanea estrazione, purificazione e concentrazione delle ATX utilizzando la microestrazione in fase solida (SPME). Questa tecnica permette l'automazione dell'analisi effettuando l'estrazione online con il rilevatore, tuttavia non si ottengono grandi risultati dal punto di vista dei recuperi né del limite di rilevabilità del metodo (20 µg/L).

Un recente lavoro pubblicato da Bogialli *et al.* (2006) descrive la possibilità di effettuare l'analisi dell'ATX-a nelle acque tramite iniezione diretta del campione filtrato in un apparato LC-MS/MS. I limiti di quantificazione sono molto bassi, dell'ordine di (13 ng/L), con il vantaggio indiscutibile di non dover trattare il campione reale.

### **Metodi di rivelazione**

I metodi maggiormente utilizzati nella rivelazione delle ATX sono metodi che prevedono la separazione cromatografica, principalmente HPLC, accoppiata a rivelatori UV, fluorimetro e massa.

La rivelazione dell'ATX-a in matrici ambientali e biologiche ha mostrato un grande limite nella scarsa stabilità della tossina (emivita inferiore ad un giorno). Un altro grosso limite è rappresentato anche in questo caso dalla carenza di standard di riferimento soprattutto per la omoanatosina e per tutti i composti di degradazione.

Il rivelatore più comunemente accoppiato all'HPLC è l'UV, risulta poco efficace nella rivelazione delle ATX poiché poco sensibile e specifico, inoltre non consente di identificare gli eventuali prodotti di degradazione presenti. La sensibilità può essere notevolmente migliorata

derivatizzando con 4-fluoro-7-nitro-2,1,3-benzossadiazolo (NBD-F) ed utilizzando un fluorimetro come rivelatore. In campioni acquosi è possibile raggiungere un LOD di 20 ng/mL per ATX-a (Namera *et al.*, 2002). L'aggiunta di o-ftaldialdeide e mercaptoetanolo all'estratto prima della derivatizzazione consente di eliminare le ammine primarie, diminuendo così il rumore di fondo e migliorando quindi la sensibilità del metodo (Osswald *et al.*, 2007).

La GC è stata applicata all'analisi delle ATX in campioni di acqua dolce sia utilizzando rivelatori di massa sia rivelatori a cattura di elettroni, i due rivelatori hanno infatti mostrato sensibilità paragonabili. L'utilizzo della GC richiede tuttavia la derivatizzazione dell'ATX-a, che viene effettuata principalmente per acetilazione e alchilazione della molecola. Una comune derivatizzazione consiste nell'acetilazione del gruppo amminico con piridina ed anidride acetica (Edwards *et al.*, 1992).

L'uso dei rivelatori di massa sia in HPLC che in GC ha permesso un notevole sviluppo nei metodi per la determinazione sia dell'ATX-a che della omoanattossina ed ha inoltre permesso l'identificazione dei prodotti di degradazione.

L'utilizzo di tecniche LC-MS (Maizel & Budde, 2004) ed LC-MS/MS (Pietsch *et al.*, 2001) consentono di evitare la derivatizzazione.

Come metodo di screening è possibile utilizzare l'LC-MS/MS in modalità "Precursor Ion Scan" cercando il precursore dello ione  $m/z$  91 dato dalla perdita di  $NH_3$  tipica delle ATX (Hiller *et al.*, 2007).

Recentemente, è stata posta l'attenzione su un possibile errore di identificazione della ATX-a in campioni di origine biologica, anche con l'utilizzo della spettrometria di massa (Gugger *et al.*, 2005; Furey *et al.*, 2005; Bogialli *et al.*, 2006). In queste matrici è sempre presente un amminoacido essenziale, la fenilalanina, che produce lo stesso ione molecolare dell'ATX-a a tempi di ritenzione simili. Anche i prodotti di frammentazione sono uguali, ed è quindi facile, se i due composti non vengono separati cromatograficamente, incorrere in errore, anche se, in effetti, le abbondanze relative degli ioni sono differenti (Bogialli *et al.*, 2006). In questo caso, paradossalmente, il rivelatore UV si rivela più utile, perchè gli spettri di assorbimento di fenilalanina e ATX-a sono significativamente differenti.

In Tabella 3 viene presentata una selezione di metodi analitici per l'analisi delle ATX presenti in letteratura.

**Tabella 3. Metodi di analisi per le anattossine**

Tipo di matrice	Pre-trattamento del campione	Metodi di rivelazione	LOD	Bibliografia
Cianobatteri	Campione sonicato con acqua (pH=2,5) e purificata tramite LLE con $CH_2Cl_2$	TLC	10 µg/g	Ojanperä <i>et al.</i> , 1991
	Estrazione con 0,05 M $CH_3COOH$ , purificazione con cartucce a scambio ionico	HPLC/UV	Non specificato	Harada <i>et al.</i> , 1989
	Estrazione con MeOH-0,2 M HCl e purificazione mediante SPE-con C-18	HPLC/FLD	10-50 µg/kg	Rawn <i>et al.</i> , 2005
Cianobatteri liofilizzati	Estrazione con MeOH-0,1 M $CH_3COOH$ , sonicazione del campione	Q-TRAP	700 pg	Hiller <i>et al.</i> , 2007
Acqua e cianobatteri	Estrazione con MeOH (pH 4), purificazione mediante SPE a debole scambio ionico	HPLC/FLD	10 ng/L	James <i>et al.</i> , 1998
	Campione trattato con gli ultrasuoni edue step di purificazione mediante SPE con C-18	GC/ECD	5 ng iniettati	Stevens & Kreiger, 1988
Acqua	SPME con CW/TPR	HPLC/FLD	20 ng/mL	Namera <i>et al.</i> , 2002

## Tossine PSP

Le tossine responsabili della PSP sono conosciute come saxitossine e sono tetraidropurine idrosolubili (Figura 5).

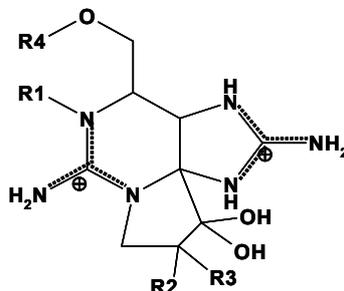


Figura 5. Struttura chimica delle PSP

Le saxitossine vengono suddivise in quattro classi a seconda della loro struttura. Le saxitossine propriamente dette (STX) sono quelle con la struttura più semplice, ci sono poi le saxitossine-solfate, dette anche gonyautossine (GTX) perché prodotte dal genere *Gonyaulax*, le saxitossine-disolfate, più comunemente note come C-tossine, ed infine le decarbamil-saxitossine (dc-STX). In Tabella 4 vengono riportati alcuni dei congeneri di PSP più frequentemente rilevati.

Tabella 4. Congeneri di PSP più frequentemente rilevati

Tossina	R1	R2	R3	R4=CONHSO <sub>3</sub>	Carica netta	Tossicità relativa
STX	H	H	H	CONH <sub>2</sub>	+2	1
NEO	OH	H	H	CONH <sub>2</sub>	+2	0,924
GTX2	H	H	OSO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	CONH <sub>2</sub>	+1	0,994
GTX3	H	OSO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	H	CONH <sub>2</sub>	+1	0,359
GTX5	H	H	H	CONHSO <sub>3</sub>	+1	0,638
C-1	H	H	OSO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	CONHSO <sub>3</sub>	0	0,006
C-2	H	OSO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	H	CONHSO <sub>3</sub>	0	0,096
dcSTX	H	H	H	H	+2	0,513
dcGTX-2	H	H	OSO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	H	+1	0,651

### Conservazione del campione

La conservazione dei campioni acquosi contenenti saxitossine è attualmente oggetto di studi. È, infatti, noto che a 25°C si hanno conversioni significative delle tossine-C, dalla bassa tossicità, nelle più tossiche tossine dcGTX, non si hanno invece informazioni su cosa accada nei campioni refrigerati. È consigliabile quindi evitare lo stoccaggio dei campioni per lunghi periodi prima dell'analisi, in quanto pur restando invariata la concentrazione totale delle saxitossine potrebbe risultare sostanzialmente differente il profilo delle tossine presenti.

Nella conservazione del campione gioca un ruolo molto importante anche il solvente utilizzato nell'estrazione. Nel caso di estrazione delle saxitossine da cianobatteri prove di laboratorio hanno mostrato che utilizzando come solvente CH<sub>3</sub>COOH 0,05 M le tossine risultano essere stabili per almeno due settimane a temperatura ambiente e a 4°C.

## Estrazione

Anche per le saxitossine è valido quanto affermato sopra per MC e NOD, e cioè che le tossine sono presenti principalmente all'interno delle cellule e quindi prima di procedere all'estrazione con solvente è necessario causare la lisi cellulare.

Molti dei metodi estrattivi sono stati ottimizzati per l'estrazione delle saxitossine da dinoflagellati, è stato comunque dimostrato che tali estrazioni sono applicabili anche ai cianobatteri (Nicholson & Burch, 2001).

Una volta lisate le cellule l'estrazione viene effettuata generalmente utilizzando  $\text{CH}_3\text{COOH}$  0,01 M o anche MeOH acidificato. L'estrazione delle saxitossine sono state effettuate anche su cellule intatte con  $\text{CH}_3\text{COOH}$  0,05 M, tuttavia è stato verificato che si hanno recuperi migliori se prima dell'estrazione il campione viene congelato e scongelato (Nicholson & Burch, 2001).

L'estrazione delle saxitossine dai campioni di fitoplacton viene notevolmente complicato dalla rapida interconversione di alcune delle tossine in esame. Ad esempio l'acido acetico ha mostrato lo stesso profilo di tossine estratte in un range di concentrazione che va da 0,05 N a 1,0 N, l'utilizzo di HCl nel range 0,03-1,0 N invece causa la conversione delle tossine C1 e C2 nelle più tossiche GTX2 e GTX3. Utilizzando concentrazioni nel range 0,01-0,02 N si ottiene un profilo confrontabile con quello ottenuto con l'acido acetico (Ravn *et al.*, 1995).

Per l'estrazione delle saxitossine dai mitili il solvente maggiormente utilizzato è costituito da soluzioni acquose di HCl, utilizzato in un range di concentrazione da 0,01 a 1,0 M (Nicholson & Burch, 2001). Da uno studio condotto da Van Egmond *et al.* (2004), per verificare l'efficacia dell'estrazione delle PSP dai mitili, è emerso che anche nell'estrazione dai mitili l'utilizzo dell'HCl come estraente, in questo caso portato ad ebollizione, può portare alla parziale idrolisi di alcune PSP, portando alla conversione di alcune di alcune varianti negli omologhi più tossici (ad es GTX5 viene convertito in STX). L'utilizzo di una procedura estrattiva meno aggressiva, come ad esempio  $\text{CH}_3\text{COOH}$  a temperatura ambiente lascia inalterato il profilo delle tossine eventualmente presenti.

## Concentrazione e purificazione

Il carattere estremamente idrofilico delle saxitossine rende difficoltoso l'uso delle tecniche più comunemente utilizzate quali l'uso di solventi organici o l'estrazione in fase solida con cartucce che lavorano in fase inversa tipo le C-18, anche se tali cartucce risultano molto utilizzate (Oshima, 1995); in alternativa possono essere utilizzate cartucce in carbone grafitato (Nicholson & Burch, 2001). Le tossine vengono estratte in presenza di un agente di coppia ionica, quale l'acido eptansulfonico, ed eluite poi in successione con soluzioni acquose di MeOH e  $\text{CH}_3\text{COOH}$ . Tale procedura ha mostrato buoni recuperi con quasi tutte le saxitossine ad eccezione della tossina C2 che generalmente mostra recuperi inferiori al 50% e risente negativamente dell'aggiunta dell'agente di coppia ionica.

## Metodi di rivelazione

Anche per le saxitossine i metodi più comunemente utilizzati sono metodi cromatografici accoppiati a rivelatori fluorimetrici (FLD) con lunghezze d'onda di eccitazione e di emissione pari a 300nm e 390-400 nm (Costa *et al.*, 2006; García *et al.*, 2004). I metodi più comuni prevedono una ossidazione alcalina post-colonna (Molica *et al.*, 2006) anche se viene utilizzata anche l'ossidazione pre-colonna (Costa *et al.*, 2006) seguita da cromatografia di coppia-ionica accoppiata a rivelatori fluorimetrici. L'ossidazione post-colonna, nonostante possa dare origine

a picchi piuttosto allargati, a causa dei volumi piuttosto ampi dei tubi di reazione (FAO, 2004), viene preferita alla più semplice ossidazione pre-colonna in quanto diverse saxitossine danno poi origine allo stesso derivato permettendo in questo caso di determinare solo la concentrazione totale delle tossine perdendo quindi informazioni preziose sul loro profilo.

Dal punto di vista cromatografico le tossine PSP presentano caratteristiche e polarità piuttosto diverse, diventa quindi difficile riuscire a separarle tutte con una sola corsa cromatografica, è possibile allora effettuare tre corse con fasi mobili diverse per separare correttamente le PSP appartenenti al gruppo delle STX (carica netta 2+), quelle appartenenti al gruppo delle GTX (carica netta 1+) e delle C-tossine (carica netta 0).

Per la risoluzione delle PSP, mediante una colonna C-8, vengono adottate le seguenti fasi mobili (Oshima, 1995):

- 1-eptansolfonato in fosfato d'ammonio con aggiunta di CH<sub>3</sub>CN per le saxitossine e senza aggiunta di CH<sub>3</sub>CN per le GTX, l'utilizzo di tale fase mobile permette la separazione dalle tossine decarbamate dagli analoghi carbamati;
- per la risoluzione delle C-tossine viene invece utilizzato tetrabutylammonio fosfato aggiustato a pH 5,8 con CH<sub>3</sub>COOH.

Nel 2001 Jaime *et al.* hanno messo a punto un metodo per la quantificazione delle PSP utilizzando la cromatografia di scambio ionico accoppiata alla spettrometria di massa. Le misurazioni sono state effettuate in modalità *Single Ion Monitoring* (SIM). Sono stati quindi monitorati gli ioni molecolari [M+H]<sup>+</sup> delle diverse varianti di PSP disponibili. I LOD di questo metodo sono paragonabili a quelli ottenuti con rivelatori fluorimetrici per alcune varianti, mentre per altre sono leggermente superiori. Il metodo viene comunque proposto dagli autori come metodo di conferma, inoltre l'unione dei due rivelatori, fluorimetrico e di massa, possono essere utilizzati per l'identificazione di composti ancora sconosciuti.

Anche per le tossine PSP un grosso limite per la accurata determinazione analitica è rappresentato dalla scarsa reperibilità degli standard per molte delle varianti.

In Tabella 5 viene presentata una selezione dei metodi analitici per l'analisi delle anatossine presenti in letteratura.

**Tabella 5. Metodi di analisi per le PSP**

Tipo di matrice	Pre-trattamento del campione	Metodo di rivelazione	LOD	Bibliografia
Cianobatteri liofilizzati	Estrazione con NaCl 0,9%	HPLC/FLD	0,5-1,2 µg/L	Molica <i>et al.</i> , 2005
	Estrazione con CH <sub>3</sub> COOH 0,1 M	HPLC/FLD	Non specificato	Ferreira <i>et al.</i> , 2001
	Estrazione con CH <sub>3</sub> COOH 0,5 M seguita da ossidazione con NaOH 1M e H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> al 5% e HIO <sub>4</sub> 0,03 M, HCOONH <sub>4</sub> 0,3 M e Na <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0,3 M	HPLC/FLD	Non specificato	Costa <i>et al.</i> , 2006
Mitili	Campione omogeneizzato ed estratto attraverso bollitura con 0,1 M HCl, estratto purificato poi con C-18	HPLC/FLD	0,02-0,11 pmol	Oshima, 1995
	Estrazione con CH <sub>3</sub> COOH 0,03 N seguita da omogeneizzazione, centrifugazione e filtrazione	LC/MS	0,5-2 ng iniettati	Jaime <i>et al.</i> , 2001
Tessuti umani e fluidi biologici	Tessuti e fluidi omogeneizzati in HCL 0,1 N ed estratti a 85°C	HPLC/FLD	1 pmol PSP	García <i>et al.</i> , 2004

## Bibliografia

- Aranda-Rodriguez R, Kubwabo C, Benoit FM. Extraction of 15 microcystins and nodularin using immunoaffinity columns. *Toxicon* 2003;42:587-99.
- Ballot A, Krienitz L, Kotut K, Wiegand C, Pflugmacher S. Cyanobacteria and cyanobacterial toxins in the alkaline crater lakes Sonachi and Simbi, Kenya. *Harmful Algae* 2005;4(1):139-50.
- Barco M, Lawton LA, Rivera J, Caixach J. Optimization of intracellular microcystin extraction for their subsequent analysis by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr A* 2005;1074:23-30.
- Bogialli S, Bruno M, Curini R, Di Corcia A, Laganà A. Simple and rapid determination of anatoxin-a in lake water and fish muscle tissue by liquid-chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A* 2006;1122:180-5.
- Bogialli S, Bruno M, Curini R, Di Corcia A, Laganà A, Mari B. Simple assay for analyzing five microcystins and nodularin in fish muscle tissue: hot water extraction followed by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Agric Food Chem* 2005;53:6586-92.
- Bogialli S, Bruno M, Curini R, Di Corcia A, Fanali C, Laganà A. Monitoring algal toxins in lake water by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Environ Sci Technol* 2006;40(9):2917-23.
- Costa IAS, Azevedo SMFO, Senna PAC, Bernardo RR, Costa SM, Chellappa NT. Occurrence of toxin-producing cyanobacteria blooms in a Brazilian semiarid reservoir. *Braz J Biol* 2006;66(1B):211-9.
- Cazenave J, Wunderlin AD, Bistoni MA, Amé MV, Krause MV, Pflugmacher S, Wiegand C. Uptake, tissue distribution and accumulation of microcystin-RR in *Corydoras paleatus*, *Jenynsia multidentata* and *Odontesthes bonariensis* A field and laboratory study. *Aquat Toxicol* 2005;75(2):178-90.
- Chu FS. Freshwater hepatotoxins: Chemistry and detection. In: Botana L (Ed.). *Seafood and freshwater toxins. Pharmacology, physiology and detection*. New York: Marcel Dekker Inc.; 2000. p. 613-42.
- Dell'Aversano C, Eaglesham GK, Quilliam MA. Analysis of cyanobacterial toxins by interaction liquid chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr A* 2004;1028:155-64.
- Eaglesham G, Norris R, Shaw G, Smith M, Chiswell R, Davis B, Neville C, Seawright A, Moore M. Use of HPLC-MS/MS to monitor cylindrospermopsin, a blue-green algal toxin, for public health purposes. *Environ Toxicol* 1999;14:151-5.
- Edwards C, Beattie KA, Scrimgeour CM, Codd GA. Identification of anatoxin-A in benthic cyanobacteria (blue-green algae) and in associated dog poisonings at Loch Insh, Scotland. *Toxicon* 1992;30(10):1-175.
- FAO. *Marine biotoxins*. Roma: Food and Agriculture Organization of the United Nations; 2004. (FAO Food and Nutrition Paper, vol. 80).
- Ferreira FMB, Franco Soler JM, Fidalgo ML, Fernandez-Vila P. PSP toxins from *Aphanizomenon flos-aquae* (cyanobacteria) collected in the Crestuma-Lever reservoir (Douro river, northern Portugal) *Toxicon* 2001;39:757-61.
- Fromme H, Köhler A, Krause R, Führling D. Occurrence of cyanobacterial toxins - microcystins and anatoxin-a - in Berlin water bodies with implications to human health and regulations. *Environ Toxicol* 2000;15:120-30.
- Furey A, Crowley J, Lehane M, James KJ. Liquid chromatography with electrospray ion-trap mass spectrometry for the determination of anatoxins in cyanobacteria and drinking water. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2003;17 (6):583-8.
- Furey A, Crowley J, Hamilton B, Lehane M, James KJ. Strategies to avoid the mis-identification of anatoxin-a using mass spectrometry in the forensic investigation of acute neurotoxic poisoning. *J Chromatogr A*. 2005;1082 (1):91-7.

- García C, Bravo MdC, Lagos M, Lagos N. Paralytic shellfish poisoning: post-mortem analysis of tissue and body fluid samples from human victims in Patagonia fjords. *Toxicon* 2004;43:149-58.
- Gugger M, Lenoir S, Berger C, Ledreux A, Druart J-C, Humbert J-F, Guette C, Bernard C. First report in a river in France of the benthic cyanobacterium *Phormidium favosum* producing anatoxin-a associated with dog neurotoxicosis. *Toxicon* 2005;45(7):919-28.
- Harada K-I, Ohtani I, Iwamoto K, Suzuki M, Watanabe MF, Watanabe M, Terao K. Isolation of cylindrospermopsin from a cyanobacterium *Umezakia natans* and its screening method. *Toxicon* 1994;32(1):73-84.
- Harada K-I, Oshikata M, Shimada T, Nagata A, Ishikawa N, Suzuki M, Kondo F, Shimizu M, Yamada S. High-Performance liquid chromatographic separation of microcystins derivatized with a highly fluorescent dienophile. *Nat Toxins* 1997;5(5):201-7.
- Heresztyn T, Nicholson BC. Nodularin concentrations in Lakes Alexandrina and Albert, South Australia, during a bloom of the cyanobacterium (blue-green alga) *Nodularia spumigena* and degradation of the toxin. *Environ Toxicol Water Qual* 1997;12:273-82.
- Hiller S, Krock B, Cembella A, Luckas B. Rapid detection of cyanobacterial toxins in precursor ion mode by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *J mass spectrom* 2007;42:1238-50.
- Hilborn ED, Carmichael WW, Soares RM, Yuan M, Servaites JC, Barton HA, Azevedo SMFO. Serologic evaluation of human microcystin exposure. *Environ Toxicol* 2007;22:459-63.
- Hormazábal V, Østensvik Ø, Underdal B, Skulberg OM. Simultaneous determination of the cyanotoxins anatoxin-a, microcystin-desmethyl-3,lr,rr, and yr in fish muscle using liquid chromatography-mass spectrometry, *J Liq Chrom & Rel Technol* 2000;23(2):185-96.
- Hummert C, Reichelt M, Legrand C, Graneli E, Luckas B. Rapid clean-up and effective sample preparation procedure for unambiguous determination of the cyclic peptides microcystin and nodularin, *Chromatographia* 1999;50(3/4):173-80.
- Hummert C, Dahlmann J, Reinhardt K, Dang H Ph. H, Dang DK, Luckas B. Liquid chromatography - Mass spectrometry identification of microcystins in *Microcystis aeruginosa* strain from lake Thanh Cong, Hhanoi, Vietnam. *Chromatographia* 2001;54:569-75.
- Ikawa M, Phillips N, Haney J, Sasner J. Interference by plastics additives in the HPLC determination of microcystin-LR and-YR, *Toxicon* 1999;37(1):923-9.
- Jaime E, Hummert C, Hess P, Luckas B. Determination of paralytic shellfish poisoning toxins by high-performance ion-exchange chromatography. *J Chromatogr A* 2001;929:43-9.
- James KJ, Sherlock IR, Stack MA. The first identification of the rare cyanobacterial toxin, homoanatoxin-a, in Ireland. *Toxicon* 1997;35:963-71.
- Kaya K, Sano T. Total microcystin determination using erythro-2-methyl-3-(methoxy-d3)-4-phenylbutyric acid (MMPB-d3) as the internal standard. *Anal Chim Acta* 1999;386:107-11.
- Lehtonen KK, Kankaanpää H, Leinö S, Sipiä VO, Pflugmacher S, Sandberg-Kilpi E. Accumulation of nodularin-like compounds from the cyanobacterium *Nodularia spumigena* and changes in acetylcholinesterase activity in the clam *Macoma balthica* during short term laboratory exposure. *Aquat Toxicol* 2003;64:461-76.
- Li R, Carmichael WW, Brittain S, Eaglesham GK, Shaw GR, Liu Y, Watanabe MM. First report of the cylindrospermopsin and deoxycylindrospermopsin from *Raphidiopsis curvata* (Cyanobacteria). *J Phycol* 2001;37:1121-6.
- Li L, Xie P, Chen J. In vivo studies on toxin accumulation in liver and ultrastructural changes of hepatocytes of the phytoplanktivorous bighead carp i.p.-injected with extracted microcystins. *Toxicon* 2005;46(5):533-45.
- Meriluoto J. Chromatography of microcystins. *Anal Chim Acta* 1997;352:277-98.

- Meriluoto J, Kincaid B, Smyth MR, Wasberg M. Electrochemical detection of microcystins, cyanobacterial peptide hepatotoxins, following high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr A* 1998;810:226-30.
- Metcalf JS, Beattie KA, Saker ML, Codd GA. Effect of organic solvents on the high performance liquid chromatographic analysis of the cyanobacterial toxin cylindrospermopsin and its recovery from environmental eutrophic waters by solid phase extraction. *FEMS Microbiology Letters* 2002;216:159-64.
- Molica RJR, Oliveira EJA, Carvalho PVVC, Costa ANSF, Cunha MCC, Melo GL, Azevedo SMFO. Occurrence of saxitoxins and anatoxin-a(s)-like anticholinesterase in a Brazilian drinking water supply. *Harmful Algae* 2005;4:743-53.
- Namera A, So A, Pawliszyn J. Analysis of anatoxin-a in aqueous samples by solid-phase microextraction coupled to high-performance liquid chromatography with fluorescence detection and on-fiber derivatization. *J Chromatogr A* 2002;963:295-302.
- Nicholson BC, Burch MD (Ed.). *Evaluation of analytical methods for detection and quantification of cyanotoxins in relation to Australian drinking water guidelines*. Canberra: Commonwealth of Australia; 2001.
- Oshima Y. Postcolumn derivatization Liquid Chromatographic method for Paralytic Shellfish Toxins. *J AOAC Int* 1995;78(2):528-32.
- Orr PT, Jones GJ, Hunter RA, Berger K. Exposure of beef cattle to sub-clinical doses of *Microcystis aeruginosa*: Toxin bioaccumulation, physiological effects and human health risk assessment. *Toxicon* 2003;41:613-20.
- Osswald J, Rellan S, Gago A, Vasconcelos V. Toxicology and detection methods of the alkaloid neurotoxin produced by cyanobacteria, anatoxin-a. *Environ Int* 2007;33(8):1070-89.
- Ott JL, Carmichael WW. LC/ESI/MS method development for the analysis of hepatotoxic cyclic peptide microcystins in animal tissues. *Toxicon* 2006;47:734-41.
- Pietsch J, Fichtner S, Imhof L, Schmidt W, Brauch H-J. Simultaneous determination of cyanobacterial hepato- and neurotoxins in water samples by ion-pair supported enrichment and HPLC-ESI-MS-MS. *Chromatographia* 2001;54(5-6):339-44.
- Ravn H, Anthoni U, Christophersen C, Nielsen PH, Oshima Y. Standardized extraction method for paralytic shellfish toxins in phytoplankton. *J Appl Phycol* 1995;7:589-94.
- Rücker J, Stüken A, Nixdorf B, Fastner J, Chorus I, Wiedner C. Concentrations of particulate and dissolved cylindrospermopsin in 21 *Aphanizomenon*-dominated temperate lakes. *Toxicon* 2007;50(6):800-9.
- Saker ML, Eaglesham GK. The accumulation of cylindrospermopsin from the cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* in tissues of the Redclaw crayfish *Cherax quadricarinatus*. *Toxicon* 1999;37:1065-77.
- Soares RA, Maggalhaes VF, Azevedo SMFO. Accumulation and depuration of microcystins (cyanobacteria hepatotoxin) in *Tilapia rendalli* (Cichlidae) under laboratory condition. *Aquat Toxicol* 2004;70:1-10.
- Spoof L, Karlsson K, Meriluoto J. High-performance liquid chromatographic separation of microcystins and nodularin, cyanobacterial peptide toxins, on C18 and amide C16 sorbents. *J Chromatogr A* 2001;909:225-36.
- Stirling DJ, Quilliam MA. First report of the cyanobacterial toxin cylindrospermopsin in New Zealand. *Toxicon* 2001;39:1219-22.
- Tsuji K, Naito S, Kondo F, Watanabe MF, Suzuki S, Nakazawa H, Suzuki M, Shimada T, Harada K-I. A clean-up method for analysis of trace amount of microcystin in lake water. *Toxicon* 1994;32:1251-9.

- Van Apeldoorn ME, van Egmond HP, Speijers JA, Bakker GJI. Review. Toxins of cyanobacteria. *Mol Nutr Food Res* 2007;51:7-60.
- Van Egmond HP, Jonker KM, Poelman M, Stern AG, Wezenbeek P, Bergwrff AA, Van den Top HJ. Proficiency studies on the determination of paralytic shellfish poisoning toxins in shellfish. *Food Addit Contam* 2004;21(4):331-40.
- Welker M, Bickel H, Fastner J. HPLC-PDA detection of cylindrospermopsin-opportunities and limits. *Water Res* 2002;36:4659-63.

# METODI BIOLOGICI PER LA RILEVAZIONE DELLE CIANOTOSSINE

Emanuela Testai, Daniela Mattei

*Dipartimento di Ambiente e Connessa Prevenzione Primaria, Istituto Superiore di Sanità, Roma*

## Introduzione

La possibilità di identificare e quantificare la presenza di cianotossine in un campione ambientale, generalmente acqua, e/o biologico, rappresentato non solo da tessuti animali, ma anche da fluidi biologici umani come sangue e urine, è un aspetto fondamentale per definire la dose esterna e/o interna di esposizione.

A tale scopo, oltre ad una serie di metodi fisico-chimici descritti nel precedente capitolo, possono essere impiegati una serie di metodi biologici, immunoenzimatici e biochimici che si sono rivelati particolarmente utili soprattutto per lo screening di campioni ambientali.

Si tratta di metodi qualitativi e/o semiquantitativi, a risposta rapida, che non necessitano di standard analitici, non in grado di discriminare tra le varie tossine e con livelli di sensibilità variabili a seconda del metodo utilizzato. Nel presente capitolo vengono descritti i metodi comunemente impiegati per lo screening, con particolare riferimento alle microcistine (MC), le cianotossine più ampiamente studiate, pur non omettendo di segnalare eventuali metodi disponibili per le altre cianotossine.

## Saggi *in vivo*

Si tratta di saggi biologici che si avvalgono di animali da laboratorio, sia vertebrati (es. *Mouse BioAssay*, MBA) che invertebrati (es. *Artemia salina*). Tali saggi consentono di misurare il livello di tossicità totale del campione e, in alcuni casi, avvalendosi della comparsa di sintomi clinici specifici o in seguito a necropsia, del tipo di tossina presente (es. epatotossina, neurotossina).

Il MBA è stato ed è tuttora usato di routine per screening di campioni incogniti, perché identifica la presenza di qualsiasi tossina, indipendentemente dal fatto che sia conosciuta e/o determinabile con altri metodi; è relativamente veloce e poco costoso, di facile applicazione e fornisce indicazioni di tossicità. Il test si basa sulla somministrazione a topi (per iniezione intraperitoneale) di un estratto acido di omogenati di tessuto (es. da prodotti ittici) o di altro campione (es. acqua). Se nel periodo di osservazione (60 min/24 h) non si rilevano mortalità o chiari segni di tossicità, il campione è considerato negativo (= non contiene livelli tossici di cianotossine). Il MBA presenta comunque una serie di svantaggi:

- ha una sensibilità piuttosto bassa (es. il limite di determinazione per i prodotti ittici è circa 300 mg di MC/kg di tessuto);
- richiede l'utilizzo di un discreto numero di animali ponendo problemi etici legati al benessere animale, tanto da non essere più praticato in alcuni paesi;
- è un metodo esclusivamente qualitativo, e non permette di discriminare tra le diverse cianotossine presenti;

- il tempo di osservazione limitato a 60 min/24 h preclude l'identificazione di effetti ritardati, come nel caso della cilindrospermopsina;
- la somministrazione intraperitoneale è spesso poco rappresentativa della reale esposizione umana.

Il test su *Artemia salina* (Lawton *et al.*, 1994) non pone problemi etici ed ha l'indubbio vantaggio di essere di facile esecuzione; i nauplii sono esposti a diluizioni diverse del campione da testare nel mezzo di coltura a 25°C: la tossicità si osserva generalmente dopo 18-24 ore. I risultati sono espressi come *Lethal Concentration* al 50% (LC<sub>50</sub>) (vale a dire la concentrazione che causa il 50% di mortalità). Il test presenta però molti degli svantaggi già descritti per il MBA, come la bassa sensibilità (LC<sub>50</sub> = 5-10 mg/L per le MC) e l'assenza di specificità, con l'ulteriore svantaggio che le indicazioni di tossicità ottenute su *Artemia* sono difficilmente estrapolabili ad una situazione di rischio reale per i mammiferi. Inoltre non è noto se ci sia una suscettibilità diversa di *A. salina* alle varie cianotossine e il risultato può essere fortemente influenzato dall'effetto matrice del campione. Sporadicamente sono stati riportati in letteratura altri test, ad esempio su *Daphnia* o su colture cellulari, ma, al momento, nessuno di essi ha subito processi di validazione e non è stato impiegato su larga scala tale da avere risultati che possano realmente dimostrarne la validità.

Questi metodi sono sempre più spesso sostituiti da metodologie biochimiche ed immunoenzimatiche, che sono molto più sensibili (circa 0,1 µg/L nel caso delle MC) e che, paragonati ai metodi di rilevazione chimica sono molto più veloci, meno costosi e in grado di rilevare la presenza di tossine, indipendentemente dalla disponibilità di standard analitici, caratteristiche che li hanno resi particolarmente utili per lo screening di campioni ambientali.

## Metodi immunoenzimatici

I primi test ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) sono stati sviluppati agli inizi degli anni '90, dopo che furono prodotti anticorpi policlonali anti-MC-LR; in seguito la produzione di anticorpi monoclonali contro la stessa tossina ha permesso non solo lo sviluppo di kit ELISA più specifici, ma anche la possibilità di determinare la presenza nei tessuti di addotti della MC-LR con le fosfatasi attraverso procedure di *immunoblotting* (Liu *et al.*, 2000) o di utilizzare gli anticorpi per tecniche cromatografiche di immunoaffinità (Kondo *et al.*, 2002).

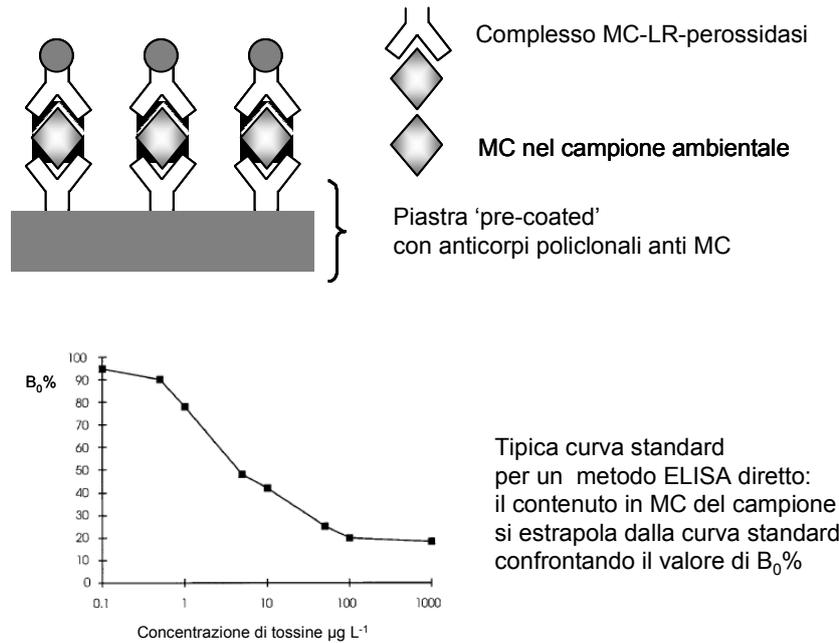
Oggi sono disponibili sul mercato diversi kit ELISA diagnostici per la presenza non solo di MC, ma anche per la cilindrospermopsina (CYN) e le saxitossine (STX) e si dividono in:

- test per competizione diretta, che usano generalmente anticorpi policlonali;
- test per competizione indiretta, con anticorpi monoclonali.

Nei test per competizione diretta, anticorpi policlonali anti-MC sono adesi al supporto solido, spesso costituito da una piastra ad alta capacità legante. Un complesso MC-LR-perossidasi è utilizzato per competere direttamente con le MC del campione da testare per i siti di legame dell'anticorpo legato al supporto (Figura 1).

Dopo circa 1 ora di incubazione, si procede al lavaggio per rimuovere il materiale che non ha reagito e si aggiunge l'opportuno reagente per lo sviluppo della colorazione dovuto alla reazione della perossidasi legata alla MC-LR: il colore sviluppato è inversamente proporzionale alla concentrazione delle MC nel campione.

La quantificazione avviene per confronto/estrapolazione con una curva standard, costruita con la MC-LR, nella quale si riportano in scala semilogaritmica le concentrazioni di MC-LR vs. % della assorbanza dello standard rispetto alla assorbanza del controllo negativo (B<sub>0</sub>%).



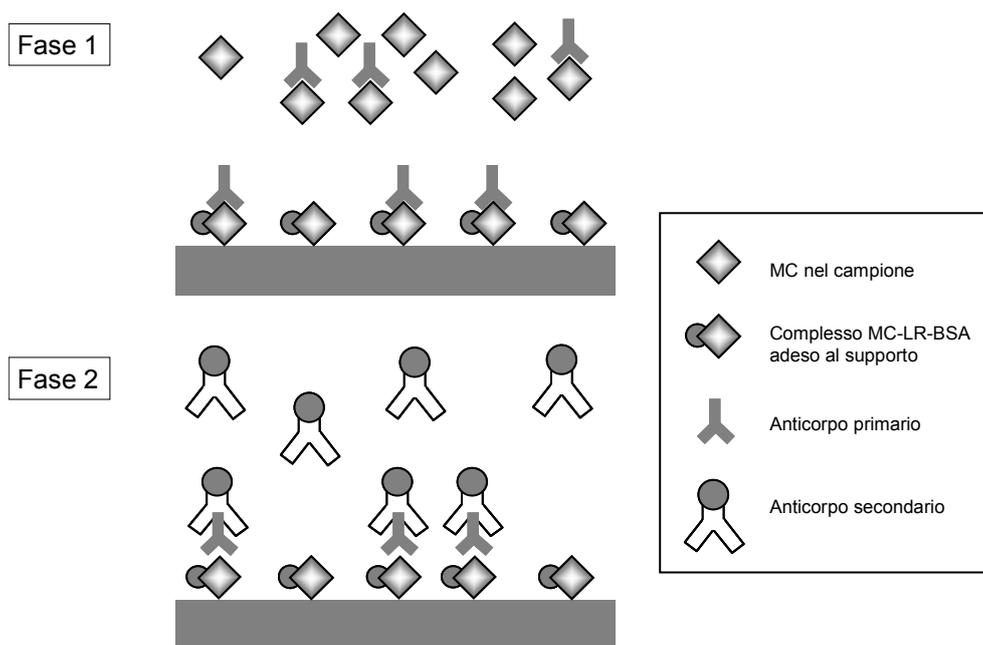
**Figura 1. Schema di un test ELISA per competizione diretta e curva standard per il calcolo della concentrazione di un campione ignoto**

Il controllo negativo è dato da una soluzione non contenente MC-LR, il cui valore di  $B_0\%$  corrisponde al valore massimo (100%) di assorbanza ottenibile, essendo l'anticorpo adeso al supporto completamente saturato dal complesso MC-LR-perossidasi (Carmichael & An, 1999).

Un aspetto particolarmente importante è legato alla costruzione della curva standard, che deve avvenire utilizzando un numero adeguato di punti, in modo tale che il tratto lineare sia ampio e ben definito. Infatti, per una corretta estrapolazione, il dato di assorbanza del campione dovrebbe cadere nel tratto lineare della curva standard e non agli estremi, dove la risposta non è più proporzionale alla concentrazione.

Nel metodo per competizione indiretta, sul supporto solido è immobilizzato un complesso proteico della MC (es. un coniugato con la siero-albumina bovina – *Bovine Serum Albumin*: MC-LR-BSA) che funziona da antigene, in competizione con quello contenuto nel campione.

In Figura 2 viene illustrato lo schema del test per competizione diretta. Nella fase 1 il controllo negativo (soluzione non contenente MC), le soluzioni standard a diverse concentrazioni di MC-LR (per costruire la curva di calibrazione) e il campione incognito competono con il complesso antigenico immobilizzato per gli anticorpi (generalmente monoclonali) anti-MC in soluzione, aggiunti nei pozzetti stessi successivamente. Dopo l'incubazione il materiale in eccesso viene rimosso. Nella fase 2 si aggiunge l'anticorpo secondario che riconosce soltanto il complesso antigene-anticorpo primario. Dopo lavaggio per rimuovere il materiale in eccesso, l'anticorpo secondario reagendo con un substrato specifico dà luogo ad una colorazione, la cui intensità è inversamente proporzionale alla quantità di MC che era presente nel campione da analizzare: infatti, maggiore la concentrazione di MC nel campione, maggiore sarà la competizione con l'antigene complessato, che avrà a disposizione meno anticorpo con cui reagire. Conseguentemente, il bianco (controllo negativo) corrisponderà al 100% di assorbanza. La quantificazione avviene per confronto/estrapolazione con la curva standard, esattamente come descritto per il metodo per competizione diretta.



**Figura 2. Schema di un test ELISA per competizione indiretta**

I due metodi forniscono risultati molto simili, anche se il metodo indiretto ha generalmente sensibilità più elevate; d'altra parte i kit diretti sono meno costosi e di più rapida esecuzione, quindi la scelta dipende essenzialmente dalle finalità con cui un test viene eseguito.

In entrambi i casi è necessario tener presente che il metodo di rilevazione è spettrofotometrico e dipende dallo sviluppo di una colorazione: questo significa che nella preparazione del campione (es. estrazione da liofilati di cianobatteri e/o da tessuti animali), sarebbe opportuno utilizzare solventi che non favoriscono lo sviluppo di colorazioni o introdurre un passaggio di parziale purificazione (es. passandolo su una colonnina C-18) per rimuovere la presenza di pigmenti, che potrebbero interferire con la misura di assorbanza. I kit sviluppati più di recente non hanno mostrato interferenze dovute alla presenza di vari composti organici ed inorganici nei campioni ambientali, ma soprattutto quando si hanno tessuti e/o liquidi biologici non si può escludere a priori che ciò avvenga, per cui il passaggio di pre-purificazione è comunque consigliabile. È comunque buona norma non avere nei campioni concentrazioni di metanolo (il solvente più utilizzato) >10%.

L'affidabilità e la sensibilità di un test ELISA dipendono essenzialmente dalla natura dell'anticorpo e dalla sua cross-reattività con i vari congeneri di MC e con suoi analoghi, inclusi i coniugati. Una scarsa cross-reattività dell'anticorpo utilizzato, come avviene quando si usano anticorpi monoclonali molto specifici, può dare informazioni accurate su uno specifico congenere di MC, ma ovviamente questa caratteristica è poco utile se lo scopo del test è lo screening. Infatti, per sapere se campioni ambientali siano o meno contaminati da MC, indipendentemente dal congenere, è auspicabile la massima cross-reattività possibile. È quindi fondamentale conoscere con esattezza le caratteristiche del kit a disposizione, per capire se risponde o meno alle esigenze dello sperimentatore e soprattutto per dare la giusta interpretazione ai risultati ottenuti.

Dal punto di vista dello screening, potrebbe sembrare un vantaggio avere una elevata cross-reattività attraverso lo sviluppo di un pool di anticorpi contro una miscela di congeneri di MC, in grado di riconoscere come apteni parti diverse della molecola: purtroppo la fluttuazione nella

risposta immunitaria può causare variazioni notevoli nella proporzione relativa dei vari anticorpi, anche quando ottenuti in tempi diversi dallo stesso animale, per cui il livello di cross-reattività e la risposta non sono riproducibili tra batches diversi di antisiero e questa possibilità non è quindi praticabile (Mc Elhiney & Lawton, 2005).

La maggior parte dei kit disponibili commercialmente impiegano anticorpi sviluppati in animali (pecore, capre o topi) contro uno specifico congenere (generalmente MC-LR): ne consegue automaticamente che la reattività massima sarà verso quella variante e che le altre MC saranno identificate con una sensibilità diversa, essendo la affinità di legame antigene-anticorpo più bassa. Quindi la quantificazione sopra descritta, fatta rispetto ad una curva standard contenente solo MC-LR, non può essere accurata ed è per questo motivo che i metodi immunoenzimatici sono considerati semiquantitativi.

Molti dei kit commerciali riconoscono come antigene l'Adda, l'amminoacido specifico di MC e nodularine: questa caratteristica ha assicurato un buon grado di cross-reattività (vengono riconosciute con affinità di legame simile: MC-LR, -YR, -LF, -RR, -LW e Nodularine e altre con affinità diverse). Contemporaneamente, la limitazione nel numero delle regioni della molecola per il riconoscimento e il legame antigene-anticorpo ha fornito una maggiore riproducibilità e una sensibilità  $<0,1 \mu\text{g/L}$ . Ovviamente, essendo l'Adda il sito di riconoscimento per il legame, il kit è diagnostico anche per i vari prodotti di degradazione ambientale che contengano tale amminoacido, indicativi comunque della presenza di contaminazione, e per i coniugati con glutatione e cisteina prodotti dalla detossificazione delle MC ad opera delle glutatione S-trasferasi (Kondo *et al.*, 1996; Metcalf *et al.*, 2002). Questo aspetto è particolarmente interessante: è stato, infatti, visto che i vari coniugati della MC-LR con GSH, cisteina-glicina e cisteina reagiscono con un test ELISA con la stessa affinità della cianotossina parentale (assumendo 100% la reattività della MC-LR, quella dei coniugati oscilla nell'intervallo 96-112%) (Metcalf *et al.*, 2000). In un campione biologico, i test ELISA disponibili non sono quindi in grado di discriminare tra molecole parentali e coniugati che però hanno tossicità minore, sia misurata attraverso l'inibizione della attività fosfatase in vitro sia in vivo. Infatti, i valori di *Inhibition Concentration* al 50% ( $\text{IC}_{50}$ ) (la concentrazione in grado di inibire l'attività enzimatica del 50%) sono per i coniugati circa 10 volte inferiori a quelli della MC-LR e l'iniezione i.p. di 67-75  $\mu\text{g/kg pc}$ , dosi simili alla *Lethal Dose* al 50% ( $\text{LD}_{50}$ ) della MC-LR (50  $\mu\text{g/kg bw}$ ), non ha prodotto effetti rilevanti nel topo, essendo gli animali sopravvissuti senza segni clinici con il fegato che alla necropsia risultava normale e del tutto simile ai controlli (Metcalf *et al.*, 2000). Questo aspetto è particolarmente rilevante per l'interpretazione di dati in termini di valutazione tossicologica, perché l'impossibilità di distinguere la tossina dai prodotti di detossificazione porta automaticamente ad una sovrastima della concentrazione e della potenziale tossicità del campione. Il problema può essere in parte mitigato se il test ELISA venisse utilizzato con altri test complementari in grado di dare indicazioni sul potenziale di tossicità, come l'inibizione dell'attività fosfatase.

La possibilità di ottenere anticorpi monoclonali, anche attraverso tecnologie ricombinanti, che isolano frammenti di anticorpo, ha offerto la possibilità di avere risposte da test ELISA con una più elevata sensibilità, ma anche maggiore specificità (dovuta a scarsa cross-reattività con minore possibilità di avere falsi positivi), che si sposa bene con necessità specifiche, ma molto meno con lo screening. Ovviamente avere una batteria di anticorpi monoclonali da testare rappresenterebbe uno strumento di lavoro ideale, ma i costi elevati non sarebbero compatibili con attività di monitoraggio e/o di routine.

È stato descritto l'uso di un anticorpo monoclonale specifico per le varianti di MC che contengono arginina in posizione 4 (MC-LR, -RR, -WR e -YR) con un limite di determinazione per la MC-LR di 8 ng/L e per gli altri congenere nell'ordine del picomolare (Zeck *et al.*, 2001). Ovviamente quando fosse utilizzato questo anticorpo la presenza di tutte le altre varianti non verrebbe determinata.

Recentemente si è andata sviluppando anche la tecnica di produzione che sfrutta il riconoscimento anticorpale di polimeri detti MIP (*Molecularly Imprinted Polymers*) specificamente impiegati per pre-concentrare campioni di acqua o per purificare campioni con matrici più complesse.

## Metodi biochimici

La conoscenza dei meccanismi di azione delle varie cianotossine ha permesso di utilizzare alcune caratteristiche attività, per sviluppare test biochimici diagnostici della contaminazione di un campione. Le MC e le Nodularine sono tra i più potenti inibitori naturali delle fosfatasi proteiche (serina/treonina) PP1 e PP2A (Yoshizawa *et al.*, 1990): sfruttando questa capacità è possibile misurare la presenza delle cianotossine, attraverso la misura della inibizione della attività enzimatica; il test che ne deriva è sensibile, rapido, di facile realizzazione (gli enzimi PP1 e PP2A sono facilmente reperibili commercialmente) e relativamente poco costoso. Si possono indifferentemente utilizzare sia la PP1 che la PP2, anche se con la PP1 il test è circa 50 volte meno sensibile che con la PP2A (Honkanen *et al.*, 1994).

Se il campione da analizzare è un liofilo e/o un campione biologico, è raccomandabile fare un'estrazione con metanolo al 100%, che denatura le fosfatasi aspecifiche che potrebbero essere presenti e che vengono in questo modo denurate, evitando l'interferenza nella misura successiva. Ovviamente, prima del test sarà necessario eliminare il metanolo portando a secco e ri-sospendere in acqua e/o tampone. Potrebbe essere in alcuni casi utile purificare parzialmente il campione, passando su filtro per eliminare la presenza di materiale pigmentato o su una colonnina C-18 per eliminare anche composti inorganici come il sodio fluoruro che è un potente inibitore delle fosfatasi. La quantificazione della inibizione può essere fatta con tre tecniche diverse (Mc Elhiney & Lawton, 2005):

- 1) metodo colorimetrico (sensibilità 0,25-2,5 µg/L);
- 2) metodo fluorimetrico (sensibilità 0,1 µg/L);
- 3) metodo radiometrico (sensibilità 0,1 µg/L).

Nel primo caso si utilizza come substrato delle fosfatasi il p-nitrofenilfosfato, che viene attivamente defosforilato dalla PP1 e dalla PP2A (Heresztyn & Nicholson, 2001) e la MC-LR a concentrazioni scalari note (tra 8 e 10) per costruire una curva di inibizione standard (in scala semilogaritmica). Tale curva verrà utilizzata per quantificare, per estrapolazione, la concentrazione di tossina nel campione ignoto. Il saggio consiste nell'incubare le fosfatasi a 37°C con il substrato e l'inibitore, monitorando l'aumento di assorbanza a 405 nm, preferibilmente con modalità cinetica, più affidabile rispetto alla misura della cinetica per punti. Il test è relativamente aspecifico, in quanto non discrimina tra loro i congeneri e non distingue tra MC e Nodularine; tuttavia, le varianti hanno un potere inibitorio diverso tra loro, e la sensibilità nella determinazione è perciò diversa. Come nel caso dei metodi immunoenzimatici, essendo la curva di calibrazione costruita con un congenere specifico (generalmente la MC-LR), la quantificazione non è esatta e il metodo di inibizione delle fosfatasi, indipendentemente dal metodo utilizzato può essere considerato soltanto semiquantitativo.

Il metodo fluorimetrico sfrutta lo stesso principio del metodo colorimetrico, del quale può essere considerato una alternativa valida e almeno due volte più sensibile. Essenzialmente, al substrato colorigenico, si sostituisce un substrato fluorigenico, il 4-metil-umbelliferilfosfato: la sua defosforilazione, catalizzata dalle fosfatasi, dà luogo alla formazione del metabolita fluorescente 4-metilumbelliferone (Bouaicha *et al.*, 2002).

La terza possibilità è quella di utilizzare come substrati defosforilabili sostanze marcate con <sup>32</sup>P: l'inibizione viene calcolata sulla base della misura della quantità di radioattività liberata

(MacKintosh *et al.*, 1990; Xu *et al.*, 2000). Questo approccio, pur essendo più sensibile del metodo colorimetrico, viene utilizzato in misura minore rispetto agli altri due, perché non sempre è agevole lavorare con materiale radioattivo e data la semivita limitata del <sup>32</sup>P, l'approvvigionamento dei substrati marcati non può essere fatto in anticipo, con mantenimento di scorte da poter utilizzare all'occorrenza.

In ogni caso è importante che la curva standard sia costruita correttamente, con un numero adeguato di punti e un tratto lineare il più ampio possibile. La risposta che si ottiene agli estremi (inibizioni  $\leq 15\%$  e  $\geq 85\%$ ) è generalmente poco affidabile, ed è perciò necessario che per una corretta estrapolazione il dato di inibizione del campione cada nel tratto lineare della curva standard. In caso contrario, se l'inibizione è troppo alta, è necessario diluire il campione o, se l'inibizione del campione è troppo bassa, costruire un'ulteriore curva standard con una quantità minore di proteine e concentrazioni di standard più basse, per essere sicuri che il dato non sia un falso negativo. In alcuni casi, per capire se il risultato ottenuto è attendibile, può essere importante testare il campione a diluizioni diverse, che dovrebbero rispondere proporzionalmente, essendo l'inibizione direttamente correlata alla concentrazione. Quando il coefficiente di variazione è  $>15\%$  tra controlli, standard e campioni incogniti, l'attendibilità delle misure ottenute è generalmente piuttosto limitata.

Il livello di inibizione delle fosfatasi è direttamente proporzionale alla tossicità di ciascuna variante delle cianotossine, quindi il risultato che si ottiene ha il vantaggio, rispetto ai metodi immunoenzimatici, di dare indicazioni sul potenziale di tossicità della miscela di MC presenti nel campione.

È stato recentemente proposto di utilizzare una combinazione dei risultati ottenuti con il metodo biochimico e con quello immunoenzimatico (Mountfort *et al.*, 2005), per avere una informazione aggiuntiva sulla potenziale tossicità della miscela dei congeneri e delle eventuale presenza di coniugati e prodotti di degradazione non tossici, che non vengono discriminati dal test ELISA, ma che hanno invece un limitato potenziale di inibizione delle fosfatasi. Infatti, se il contenuto totale della miscela di MC è stato determinato con un metodo ELISA sufficientemente aspecifico, la predominanza di una o più varianti con tossicità simili può essere identificata dal rapporto tra la risposta di inibizione della PP2A e quella del test ELISA, ottenuta utilizzando la MC-LR come standard. È stato infatti evidenziato che varianti con bassa tossicità vale a dire con basso potenziale di inibizione delle fosfatasi (corrispondente ad un alto valore di IC<sub>50</sub>) danno luogo ad un rapporto PP2A:ELISA basso, e vice-versa (Mountfort *et al.*, 2005). Risultati simili si ottengono anche quando si consideri il rapporto PP2A: LC-MS (*Liquid Chromatography-Mass Spectrometry*) (Tabella 1).

**Tabella 1. Tossicità acuta di alcune cianotossine espressa sia come LD<sub>50</sub> e come IC<sub>50</sub> per l'inibizione della fosfatasi PP2A e rapporto tra diversi metodi di indagine per avere indicazioni sommarie sul potenziale di tossicità di una miscela**

Cianotossina	LD <sub>50</sub> (µg/kg)	IC <sub>50</sub> (nM)	Rapporto PP2A:ELISA	Rapporto PP2A:LC-MS
MC-LR	50	2,2	1,03	1,21
MC-YR	70	90	0,63	0,65
MC-RR	600	175	0,06	0,12
Nodularina	50	1,8	2,2	1,47

Sulla base dei risultati ottenuti è stato proposto che un campione ambientale che dia un rapporto PP2A:ELISA  $\geq 0,8$  avrà un *ranking* di tossicità paragonabile alla tossicità di un campione contenete MC-LR o varianti con la stessa tossicità acuta. Un campione con un

rapporto PP2A:ELISA  $\leq 0,2$  avrà una tossicità comparabile a quella della MC-RR (10 volte meno tossica della MC-LR). Nella fascia intermedia (rapporto compreso tra 0,2 e 0,8), la tossicità sarà più simile a quella della MC-YR. Ovviamente l'approccio combinato fornisce solo indicazioni preliminari e per avere informazioni sulle varianti realmente presenti e quantificarle è comunque necessario ricorrere alla determinazione cromatografica.

Per quanto il loro sviluppo e la loro utilizzazione in ambito di screening non sia ancora avanzato, è possibile pensare che saggi di inibizione della sintesi proteica su cellule in vitro possano venire adottati per la determinazione della CYN e che un saggio di inibizione della acetilcolinesterasi (semplice dosaggio spettrofotometrico) possa essere utilizzato per identificare la presenza di anatoossina-a(S). Questa ultima opportunità è limitata dalla interferenza esercitata da pesticidi organofosforici, strutturalmente analoghi alla anatoossina-a(S) e potenti inibitori dell'enzima, la cui presenza è frequente nei campioni ambientali. Alcune di queste reazioni enzimatiche sono state sfruttate per l'allestimento di alcuni biosensori, che hanno sensibilità, rapidità di risposta e specificità sufficienti da poter essere utilizzati agevolmente come metodi di screening sul campo, senza bisogno di processare il campione. Tuttavia nessuno ha subito alcun processo di validazione, e i risultati possono essere considerati una indicazione preliminare, da confermare con studi più accurati in laboratorio.

## Considerazioni finali

Sebbene siano disponibili diversi metodi per determinare le cianotossine, nessuno singolarmente è sufficientemente esaustivo e in grado di dare indicazioni sia sul contenuto di tutte le tossine presenti in un campione e la sua potenziale tossicità. Una comparazione dei vari metodi biologici e della loro diversa sensibilità è presentata in Tabella 2.

**Tabella 2. Comparazione dei metodi biologici per la determinazione di cianotossine e loro limiti di sensibilità**

Metodo	Sensibilità	Specificità	Commenti
MBA	LD <sub>50</sub> =50 µg/kg pc (rispetto alla MC-LR)	Non specifico (tutte le tossine)	Poco sensibile; utilizza molti animali (problemi etici)
<i>Artemia salina</i>	LC <sub>50</sub> =5-10 mg/L (rispetto alla MC-LR)	Non specifico (tutte le tossine)	Poco sensibile, elevata variabilità di risposta; effetto matrice marcato
ELISA	1. Anticorpi policlonali a) anti-MC-LR: 2,5 µg/L b) anti-Adda: 0,6 µg/L	Relativamente specifico ( <i>cross-reattività con coniugati e prodotti di degradazione</i> )	Necessità di trovare un compromesso tra la cross- reattività e la specificità; difficoltà di interpreta-zione dei dati in termini di potenziale tossico
	2. Anticorpi monoclonali a) anti-MC con Arg: 0,06 µg/L b) anti-CYN: 0,5-2 µg/L c) anti-STX: 0,02-0,4 µg/L	Molto specifici a) e b) ( <i>scarsa cross-reattività</i> ) Relativamente specifico c) ( <i>cross-reattività con altre tossine PSP</i> )	
	3. Frammenti di anticorpi ricombinanti: 4 µg/L	Specifico	
Inibizione delle fosfatasi	1. Colorimetrico: 0,25 µg/L 2. Fluorimetrico: 0,1 µg/L 3. Radiometrico: 0,1 µg/L	Non specifico (tutte le MC e NOD)	Non distingue tra congeneri ma dà una misura della tossicità; l'uso del radioattivo può limitarne l'applicazione

Uno dei problemi principali è la mancanza di standard certificati di riferimento; infatti, in uno studio interlaboratorio per confrontare risultati di HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*), inibizione della fosfatasi ed ELISA, il dato emerso è una grande variabilità in molti casi non dovuta alle differenze tra i metodi, ma tra i laboratori per la diversità degli standard utilizzati (Fastner *et al.*, 2002). D'altra parte uno studio condotto in Canada in uno stesso laboratorio per identificare la contaminazione da cianotossine di più di 100 campioni di integratori alimentari attraverso LC-MS/MS, ELISA e saggio colorimetrico per l'inibizione delle fosfatasi, ha mostrato che le tre metodiche hanno dato risultati molto simili. I campioni contenevano un numero limitato di varianti di MC, identificate con la LC-MS/MS: i risultati confrontabili ottenuti con gli altri due metodi suggeriscono l'assenza in quei campioni di altre tossine (Lawrence *et al.*, 2001).

Infatti, i risultati diversi che spesso si ottengono non sono dovuti ad una scarsa *performance* di uno o più dei tre metodi, ma semplicemente al fatto che misurano cose diverse:

- I metodi chimici sono molto specifici, ma non sono al momento in grado di identificare tutte le tossine e quindi in molti casi potrebbero essere fonte di sottostime del grado di contaminazione.
- I test ELISA con la loro aspecificità hanno il vantaggio di poter identificare la presenza delle varie tossine presenti, ma reagendo anche con prodotti con tossicità scarsa e/o assente possono portare ad una sovrastima dei rischi associati alla esposizione a quel campione, riportando i dati in termini di MC-LR equivalenti.
- Il saggio di inibizione della fosfatasi (che comunque è limitato alla determinazione di MC e nodularine) può dare indicazioni del potenziale di tossicità di un campione, ma a meno che non venga associato per confronto ad uno degli altri due metodi descritti, difficilmente può dare informazioni precise dal punto di vista quantitativo del profilo di congeneri presente.

Sarebbe buona norma, quando possibile, prevedere che in un piano di monitoraggio potessero essere utilizzate combinazioni di più metodi, da utilizzare con approcci a step successivi almeno su quei campioni risultati positivi con il metodo scelto come primo screening.

## Bibliografia

- Bouaïcha N, Maatouk I, Vincent G, Levi Y. A colorimetric and fluorometric microplate assay for the detection of microcystin-LR in drinking water without preconcentration. *Food Chem Toxicol* 2002;40:1677-83.
- Carmichael WW, An J. Using an Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) and a Protein Phosphatase Inhibition Assay (PPIA) for the detection of microcystins and nodularins. *Nat Toxins* 1999;7:377-85.
- Fastner J, Codd GA, Metcalf JS, Woiatke P, Wiedner C, Utkilen H. An international intercomparison exercise for the determination of purified microcystin-LR and microcystins in cyanobacterial field material. *Anal Bioanal Chem* 2002;374:437-44.
- Heresztyn T, Nicholson BC. Determination of cyanobacterial hepatotoxins directly in water using a protein phosphatase inhibition assay. *Water Res* 2001;35:3049-56.
- Honkanen RE, Codispoti BA, Tse K, Boynton AL. Characterisation of natural toxins with inhibitory activity against serine/threonine protein phosphatases. *Toxicon* 1994;32:339-50.
- Kondo F, Matsumoto H, Yamada S, Ishikawa N, Ito E, Nagata S, Ueno Y, Suzuki M. Detection and identification of metabolites of microcystins formed in vivo in mouse and rat livers. *Chem Res Toxicol* 1996;9:1355-9.

- Kondo F, Ito Y, Oka H, Yamada S, Tsuji K, Imokawa M, Niimi Y, Harada K, Ueno Y, Miyazaki Y. Determination of microcystins in lake water using reusable immunoaffinity column. *Toxicon* 2002;40:893-9.
- Lawrence JF, Niedzwiadek B, Menard C, Lau BPY, Lewis D, Kuper-Goodman T, Carbone S, Holmes C. Comparison of liquid Chromatography/Mass Spectrometry, ELISA and phosphatase Assay for the determination of microcystins in blue green algae products. *J AOAC Int* 2001;84:1035-44.
- Lawton LA, Beattie KA, Hawser SP, Campbell DL, Codd GA. Evaluation of assay methods for the determination of cyanobacterial hepatotoxicity. In: Codd GA, Jeffries TM, Keevil CW, Potter E (Ed.). *Detection methods cyanobacterial toxins*. vol. 149. Cambridge: The Royal Society of Chemistry; 1994. p. 111-6.
- Liu B-H, Yu F-Y, Huang X, Chu FS. Monitoring of microcystin protein phosphatase adduct formation with immunochemical methods. *Toxicon* 2000;38:619-32.
- Mackintosh C, Beattie KA, Klump S, Cohen P, Codd GA. Cyanobacterial microcystin-LR is a potent and specific inhibitor of protein phosphatases 1 and 2A from both mammals and higher plants. *FEBS Lett* 1990;264:187-91.
- McElhiney J, Lawton L. Detection of the cyanobacterial hepatotoxin microcystin. *Toxicol Appl Pharmacol* 2005;203:215-30.
- Metcalf JS, Beattie KA, Ressler J, Gerbersdorf S, Pflugmacher S, Codd GA. Cross-reactivity and performance assessment of four microcystin immunoassays with detoxication products of the cyanobacterial toxin microcystin-LR. *J Water Supply: Res Technol AQUA* 2002;51:145-51.
- Metcalf JS, Beattie KA, Pflugmacher S, Codd GA. Immuno-crossreactivity and toxicity assessment of conjugation products of the cyanobacterial toxin microcystin-LR. *FEMS Microbiol Lett* 2000;189:155-8.
- Mountfort DO, Holland P, Sprosen J. Method for detecting classes of microcystins by combination of protein phosphatase inhibition assay and ELISA: comparison with LC-MS. *Toxicon* 2005;45:199-206.
- Xu LH, Lam PKS, Chen JP, Xu JM, Wong BSF, Zhang YY, Wu RSS, Harada KI. Use of protein phosphatase inhibition assay to detect microcystins in Donghu Lake and a fish pond in China. *Chemosphere* 2000;41:53-8.
- Yoshizawa S, Matsushima R, Watanabe MF, Harada K-I, Ichihara A, Carmichael WW, Fujiki H. Inhibition of protein phosphatases by microcystin and nodularin associated with hepatotoxicity. *J Cancer Res Clin Oncol* 1990;116:609-15.
- Zeck A, Eikenberg A, Weller MG, Niessner R. Highly sensitive immunoassay based on a monoclonal antibody specific for [4-arginine] microcystins. *Anal Chim Acta* 2001;441:1-13.

# METODI GENETICI NELL'IDENTIFICAZIONE DI CIANOBATTERI E DELLA LORO POTENZIALE TOSSICITÀ

Susanna Vichi, Simonetta Gemma, Emanuela Testai  
*Dipartimento di Ambiente e Connessa Prevenzione Primaria, Istituto Superiore di Sanità, Roma*

## Introduzione

I cianobatteri sono organismi ubiquitari che riescono a colonizzare anche gli ambienti di vita più estremi e si trovano in laghi, stagni e fiumi di tutto il mondo. La loro grande diffusione negli habitat acquatici è stata attribuita alle peculiari caratteristiche fisiologiche e alla grande capacità di adattamento in ogni condizione ambientale, che li rende capaci di raggiungere livelli di biomassa enormi (fioriture), spesso in grado di dominare l'intero biota acquatico, e, in presenza di particolari condizioni ambientali, di accumularsi sulla superficie, producendo schiume. Il phylum dei cianobatteri contiene più di 1000 specie, ma solo un numero limitato di esse (circa una trentina quelle identificate fino ad oggi) produce come metaboliti secondari alcuni composti noti come cianotossine, che hanno effetti tossici sui mammiferi incluso l'uomo, agendo a livello dei neurotrasmettitori del sistema nervoso centrale e periferico, delle cellule epatiche, del sistema gastro-enterico e delle mucose o producendo effetti topici di tipo irritativo/allergico. La potenziale tossicità di questi microorganismi e la loro capacità di compromettere qualitativamente le acque che li ospitano hanno richiamato l'attenzione crescente da parte della comunità scientifica per tentare di controllare il fenomeno ed approntare opportune misure di prevenzione e protezione della salute dell'uomo e dell'ambiente. A tale scopo sono essenziali piani di monitoraggio specifici per ciascun bacino, che rendano possibile l'identificazione della specie responsabile della fioritura, la presenza al suo interno di batteri in grado di produrre tossine e la quantificazione delle cianotossine prodotte.

Tradizionalmente l'identificazione dei cianobatteri veniva eseguita mediante osservazione delle cellule al microscopio: i membri del phylum dei cianobatteri venivano classificati utilizzando regole tassonomiche mutuata dalla botanica e dalla batteriologia (Neilan *et al.*, 2002). La sola analisi morfologica, però, comporta dei limiti dovuti alla difficoltà per l'operatore nell'interpretare piccole, a volte impercettibili, differenze morfologiche e al numero limitato di parametri alla base del sistema di nomenclatura per cui spesso si hanno attribuzioni non corrette e una sottostima della biodiversità del campione naturale. Inoltre le condizioni ambientali variabili possono alterare temporaneamente la morfologia modulando l'espressione di alcune proteine, ad esempio di pigmenti fotosintetici che possono indurre a classificazioni non corrette. Non ultimo, l'analisi morfologica non permette di discriminare fra individui che geneticamente sono in grado di produrre cianotossine da quelli non tossici, che possono coesistere all'interno di una popolazione senza presentare alcuna differenza visibile. Le informazioni derivanti dall'analisi morfologica richiedono dunque di essere integrate con quelle ottenute dall'analisi diretta delle cianotossine attraverso saggi chimici, biochimici o immunoenzimatici e più recentemente dallo studio delle caratteristiche genotipiche dei cianobatteri.

Capire il ruolo di queste tossine nei microorganismi produttori e contemporaneamente le risposte dei loro geni all'ambiente può suggerire mezzi per il controllo delle fioriture e della loro

tossicità per la gestione della qualità delle acque destinate al consumo umano. I notevoli passi avanti degli ultimi anni nella conoscenza dei meccanismi e delle basi genetiche della biosintesi delle tossine da parte di vari gruppi di cianobatteri hanno permesso lo sviluppo di approcci di screening genetico sia per la caratterizzazione del genere predominante che per il monitoraggio della presenza di specie tossiche sin dalle fasi più precoci delle fioriture.

## Approcci molecolari comuni nella caratterizzazione delle specie cianobatteriche

Le metodologie molecolari, rapide e relativamente economiche una volta che si dispone della strumentazione e dell'*expertise* necessario, offrono elevata specificità e consentono il diretto utilizzo del campione ambientale, senza dover necessariamente allestire una coltura del microorganismo. Sono inoltre metodiche estremamente sensibili, per cui si rivelano particolarmente utili negli studi di monitoraggio ambientale, soprattutto nei casi in cui la concentrazione del microorganismo target all'interno di un campione eterogeneo non sia sufficiente da poter essere rilevata con metodi classici. In Figura 1 sono schematizzati gli approcci molecolari più comuni utilizzati a questo scopo.

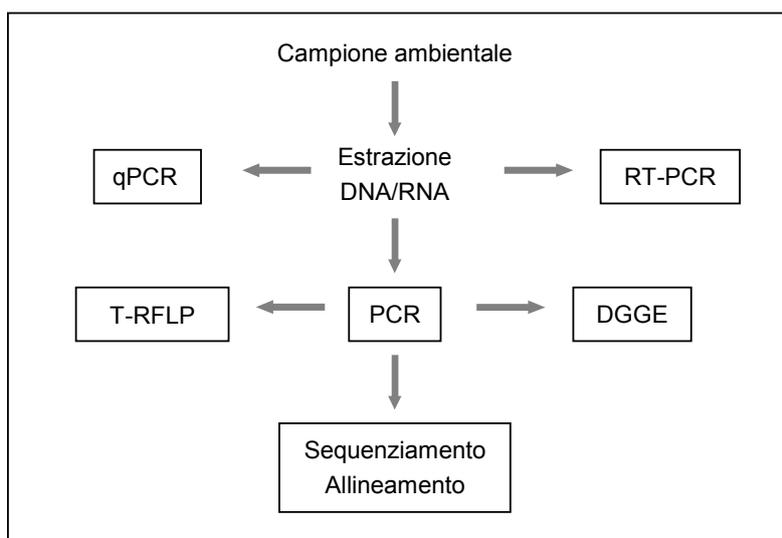


Figura 1. Metodi molecolari comuni per la determinazione di microorganismi

Nell'approccio qualitativo si utilizza la metodica classica della PCR (*Polymerase Chain Reaction*) che, attraverso l'utilizzo di corte sequenze oligonucleotidiche complementari a una porzione della sequenza del gene di interesse, permette l'amplificazione esponenziale del frammento genico oggetto di studio.

Due delle tecniche di *fingerprinting* genetico più comunemente usate nella caratterizzazione dei profili molecolari delle comunità microbiche sono l'elettroforesi su gel a gradiente denaturante (*Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*, DGGE) e l'analisi del polimorfismo dei

frammenti di restrizione mediante T-RFLP (*Terminal-Restriction Fragment Length Polymorphism*).

La DGGE permette la separazione di piccoli frammenti di DNA (taglia massima 1000 bp) della stessa lunghezza ma di sequenza differente in relazione alle loro proprietà di denaturazione (*melting*); possono essere separati anche frammenti che differiscono per una singola sostituzione di base. Tipicamente per prevenire la completa denaturazione dei frammenti a doppia elica si aggiunge all'estremità 5' del *primer forward* una sequenza di 30-40 bp ricca in GC o "GC clamp". Il numero, le posizioni e le intensità delle bande DGGE che si ottengono sono indicativi della diversità all'interno della comunità microbica (Boutte *et al.*, 2006).

La tecnica T-RFLP (*Terminal-Restriction Fragment Length Polymorphism*) è basata sulla digestione con endonucleasi dei prodotti di PCR. Uno o entrambi i primers utilizzati sono legati ad una molecola fluorescente che permette di rilevare, mediante elettroforesi capillare, solo la presenza del frammento di restrizione terminale. Il risultato è un elettroferogramma per ogni campione, i cui i picchi corrispondono ai frammenti terminali legati ai primers fluorescenti usati nella PCR; l'analisi dei diversi profili risultanti, effettuata in modo automatico da un analizzatore genetico, permette di caratterizzare la variabilità del campione naturale.

Un'altra possibilità è offerta dal sequenziamento del prodotto della PCR associato a tecniche di bioinformatica; una volta sequenziato il tratto di DNA di interesse può essere confrontato con librerie genomiche disponibili anche in rete per ipotizzare relazioni filogenetiche tra gli individui; risulta di particolare utilità l'utilizzo di programmi di allineamento automatico di sequenze come BLAST, anch'esso disponibile in rete.

Recentemente la messa a punto di saggi quantitativi come la *real-time* PCR consentono la determinazione della concentrazione di cianobatteri (o la % all'interno della popolazione totale) mediante il rilevamento del segnale di fluorescenza, proporzionale alla quantità di amplificato, emesso da sonde disegnate all'interno di specifici geni *marker* (Ouellette *et al.*, 2003). La quantificazione del cDNA è poi fondamentale per lo studio della espressione dei geni (RT-PCR: *Reverse Transcriptase-PCR*); infatti dato che molte funzioni dei cianobatteri sono influenzate dalle condizioni ambientali (luce, temperatura, presenza di nutrienti) non è sufficiente che i geni relativi alla produzione della cianotossina siano presenti, perché la modulazione della loro espressione potrebbe corrispondere a variazioni nell'efficienza di sintesi della cianotossina e in ultima analisi in una differenza del potenziale di tossicità di una fioritura.

## Metodi molecolari nella identificazione tassonomica

La caratterizzazione molecolare dei cianobatteri è di particolare importanza nell'identificazione tassonomica (a livello di genere, specie, ceppo) di questi microrganismi, che hanno un elevato grado di variabilità fenotipica in relazione alle diverse condizioni ambientali, e sono dunque di difficile classificazione. L'identificazione tassonomica si realizza mediante la ricerca di specifiche sequenze *marker* diagnostiche nell'ambito di ogni phylum.

Una delle prime metodiche messe a punto che ha permesso approfondite analisi filogenetiche sulle comunità batteriche in genere ed utilizzata per l'identificazione di batteri potenzialmente tossici anche in ambiente ospedaliero, prevede l'amplificazione tramite PCR del gene per l'rRNA ribosomale 16S (rDNA 16S) (Neilan *et al.*, 2002). Alla base di questa scelta sta la constatazione che l'rDNA 16S presenta tassi di mutazione piuttosto bassi e costanti che lo rendono un buon marcatore adatto ad approfondire le relazioni evolutive fra i microrganismi.

Dopo isolamento del materiale genetico da matrici, spesso eterogenee, si amplifica la miscela di rDNA 16S mediante l'uso di primers universali, disegnati su regioni ben conservate del gene. In generale con la PCR si ottiene un unico prodotto di amplificazione che, da solo, non è sufficiente a

discriminare tra specie diverse; il trattamento con endonucleasi di restrizione, tuttavia, è in grado di generare un profilo di restrizione caratteristico e spesso diagnostico di una specie o, in alcuni casi, anche di singoli ceppi (Neilan *et al.*, 2002). Una tale metodica è ancora più valida quando si analizzano le sequenze ITS (Internal Transcribed Spacer), in quanto la natura stessa di queste regioni ad alta variabilità li rende buoni marcatori negli studi di tassonomia per distinguere ceppi più vicini evolutivamente e quindi con elevati livelli di omologia.

Un altro gene utilizzato per la tassonomia è lo spaziatore intergenico dell'operone della ficocianina (*PC-IGS*), che è stato identificato come regione potenzialmente ad alta variabilità utile per la caratterizzazione dei cianobatteri a livello di ceppo. La ficocianina è un pigmento accessorio dell'apparato fotosintetico PSII, ubiquitario nei cianobatteri, e dunque costituisce un buon marcatore per il loro rilevamento all'interno di un campione ambientale. L'intero operone contiene due geni codificanti per due subunità di bilina e tre polipeptidi *linker* (Figura 2).

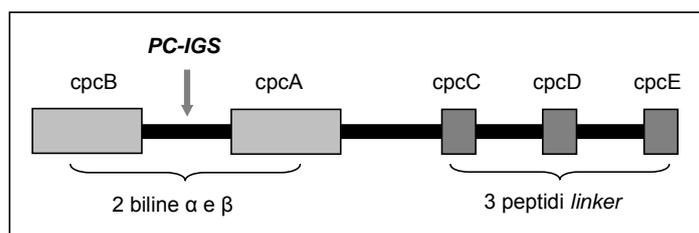


Figura 2. Schematica rappresentazione dell'operone PC

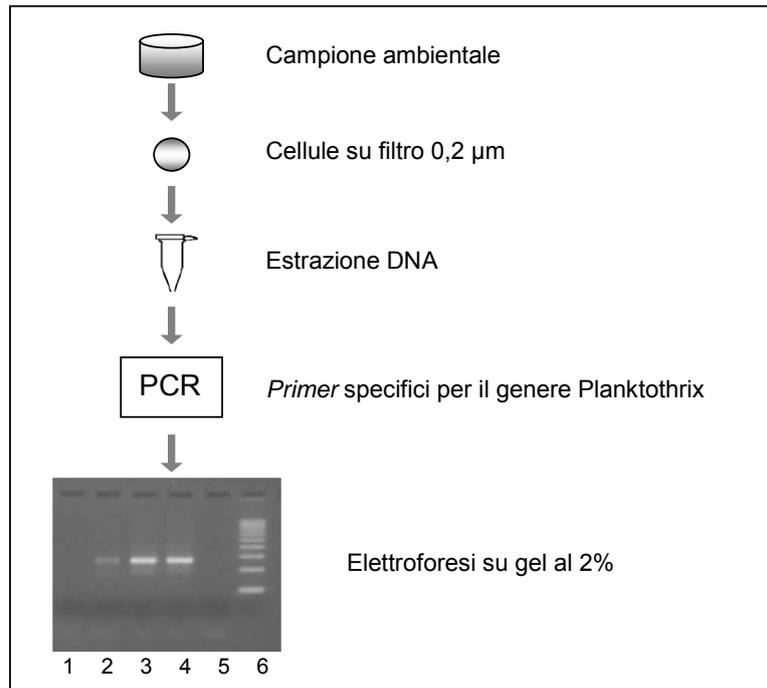
La sequenza *IGS* fra i due geni delle due subunità designate **b** (*cpcB*) e **a** (*cpcA*) viene analizzata mediante PCR-RFLP e permette di ottenere una inequivocabile identificazione di un isolato batterico a livello di genere, specie e di ceppo (Neilan *et al.*, 1995).

Nella Figura 3 è mostrato uno schema di conduzione di un saggio per l'identificazione della ficocianina e il relativo gel elettroforetico.

L'uso di queste tecniche permette di verificare la presenza di cianobatteri diversi all'interno di una fioritura nella quale una specie sia predominante. Il dato può essere rilevante soprattutto se la specie dominante è non tossica (es. *A. flos aquae*), al contrario delle minoritarie (es. *M. aeruginosa* o *A. issatschenkoi*), tanto da indurre all'errore di pensare che non sia necessario ricercare la presenza di tossine. Questo aspetto è stato evidenziato in uno studio di Saker *et al.* (2005) che mostra come attraverso la ricerca di marcatori genetici genere-specifici sia stato possibile rilevare l'organismo produttore della microcistina presente come contaminante in alcuni integratori alimentari in commercio a base di *A. flos aquae*, organismo normalmente non produttore di microcistina. Lo studio ha mostrato la presenza di *M. aeruginosa* in grado di produrre la cianotossina identificata come contaminante.

Il rischio che microrganismi tossici vengano accidentalmente inclusi nella preparazione degli integratori sussiste quando si utilizzano specie prelevate direttamente dall'ambiente naturale di crescita, come *A. flos aquae*, che possono coesistere con altre specie presenti in quantità limitate tanto da non essere evidenti all'analisi al microscopio.

L'impiego dei cianobatteri in quanto fonte di antiossidanti naturali è oggi in crescente aumento sia in campo alimentare (integratori) che cosmetico (creme solari e prodotti anti-ageing). L'impiego di tecniche ad elevata sensibilità come la PCR è dunque di particolare utilità e rilevanza nell'ambito delle procedure del controllo di qualità dei prodotti destinati ad uso umano.



**Figura 3. Procedura per testare la presenza di *Planktothrix* in un campione ambientale.** La fotografia mostra il prodotto di amplificazione della regione *PC-IGS* usato come marcatore genere-specifico: 1 = campione contenente *Microcystis*: assenza di amplificato; 2 = campione contenente miscela di *Microcystis* e *Planktothrix*: debole amplificato; 3 e 4 = campione ad elevata concentrazione di *Planktothrix*: prodotto abbondante; 5 = bianco; 6 = ladder

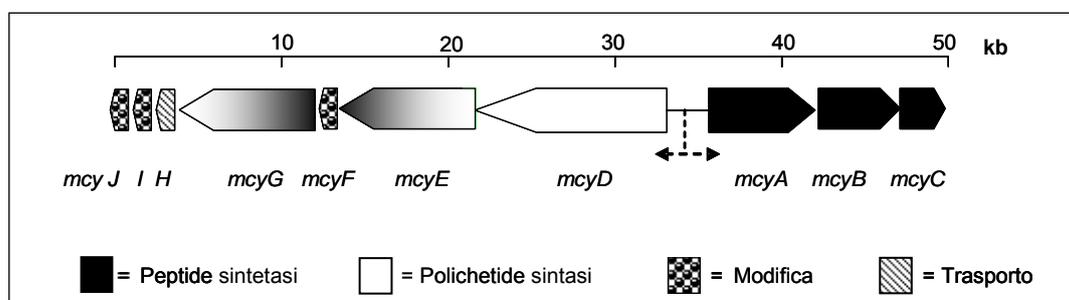
## Monitoraggio di specie tossiche mediante sonde molecolari

L'osservazione che il contenuto di microcistine in un lago mostri variazioni non solo stagionali (Sivonen & Jones, 1999) ma anche in periodi molto più brevi (Kurmayer & Kutzenberger, 2003) e il fatto che i livelli di cianotossina non possano essere correlati direttamente alla biomassa dei cianobatteri produttori (Kurmayer *et al.*, 2004) ha portato ad ipotizzare che, unitamente a fattori ambientali in grado di modulare la produzione di tossina, le fluttuazioni potessero essere imputate a dinamiche di popolazioni in grado di alterare il rapporto relativo tra i genotipi tossico/non tossico. Inoltre la produzione di una particolare tossina non risulta necessariamente legata ad un unico genere, ma spesso lo stesso gruppo di cianobatteri produce più di una cianotossina. L'ipotesi di utilizzare metodi molecolari nel monitoraggio delle specie tossiche ha trovato perciò applicazione affiancando alla ricerca di cianotossine l'identificazione degli individui potenzialmente in grado di produrle.

Le cianotossine più ampiamente studiate sono le microcistine, eptapeptidi ciclici epatotossici la cui attività biologica si esplica nell'inibizione delle fosfatasi di tipo 1 e 2A, a cui consegue un'iperfosforilazione delle proteine del citoscheletro degli epatociti (Funari & Testai, 2008). Probabilmente anche per questo motivo al momento sono considerate le cianotossine più diffuse e più frequentemente associate a casi di avvelenamento di animali e di effetti sull'uomo. Gli

studi genetici non fanno eccezione e anche in questo settore le informazioni più abbondanti sono disponibili per le microcistine.

Alla base della sintesi delle microcistine c'è la sintesi peptidica non-ribosomale che è stata dimostrata nei cianobatteri anche per il tripeptide glutatione e per alcuni peptidi della parete. La sintesi peptidica non-ribosomale è ottenuta per mezzo della funzione di tiotemplato di grandi complessi a struttura modulare, chiamati peptide sintetasi non-ribosomali (*NonRibosomal Peptide Synthetase*, NRPS), codificati da uno dei più grandi cluster genici batterici conosciuti, il cluster genico *mcy*. In *Microcystis* comprende 10 geni trascritti con modalità bidirezionale. Ciascun modulo è responsabile per la attivazione, la solfurazione, la modifica e la condensazione di uno specifico amminoacido alla catena. Ben 45 delle 48 reazioni che sequenzialmente partecipano alla sintesi delle microcistine fanno capo ai domini catalitici di sei sintasi/sintetasi multienzimatiche (*mcyA-E, G*). Una rappresentazione schematica dell'organizzazione genica dell'operone *mcy* in *Microcystis* è mostrata in Figura 4; *mcyA-C* contengono cinque dei sette moduli che servono per la sintesi: sono ritenuti responsabili della attivazione e della incorporazione successiva di Mdha, D-Ala, L-X, D-MeAsp, e L-Z durante la biosintesi della microcistina; *mcyE* e *G* sono enzimi chimerici con funzione di peptide sintetasi e polichetide sintasi e insieme a *mcyD* sono responsabili della sintesi dell'Adda (Dittmann & Corner, 2005).



**Figura 4. Organizzazione del cluster *mcy* per la biosintesi delle microcistine in *Microcystis***

Ortologi dei geni *mcy* per la microcistina sintetasi sono stati caratterizzati e sequenziati in molti altri cianobatteri tossici inclusi *Planktothrix*, *Nostoc*, *Anabaena* e *Nodularia* (Dittmann & Corner, 2005); ciò ha permesso la messa a punto di vari disegni sperimentali per la determinazione della presenza dei geni responsabili della produzione della microcistina con metodiche molecolari.

Sebbene il *core* del cluster genico *mcy* sia abbastanza conservato nella scala evolutiva, alcuni geni e/o parti di essi sono soggetti alla presenza di mutazioni ed eventi ricombinanti con una frequenza maggiore rispetto ad altri geni definiti *housekeeping* e conseguentemente ad una più elevata variabilità. *Microcystis* e *Planktothrix* ad esempio mostrano un livello di variabilità particolarmente elevato in 2 moduli NRPS (il 2° di *mcyA* ed il 1° di *mcyB*), che è stato associato almeno parzialmente alla possibilità di produrre diversi congeneri di microcistine da parte dei singoli ceppi.

La determinazione della presenza di cianobatteri produttori di microcistine si realizza attraverso PCR combinata a RFLP o all'analisi di sequenza per l'assegnazione al ceppo di origine.

In uno dei primi studi di *fingerprinting* genetico su *Microcystis* (Kurmayer *et al.*, 2003) la PCR è stata applicata per evidenziare la presenza di due specifiche sequenze: la regione dello

spaziatore intergenico entro l'operone *PC* per la classificazione del genere, e la regione *mcyB* per evidenziare i ceppi tossici.

Nell'applicazione dei metodi genetici è di fondamentale importanza della scelta del *marker* "giusto" nell'individuazione dei ceppi tossici: è stata, infatti, evidenziata l'esistenza di alcuni geni *mcy* anche in organismi non produttori di microcistine, che evidentemente avevano quei geni, ma difettavano di altri per cui il cluster biosintetico era incompleto (falso positivo); parallelamente, ceppi che erano stati erroneamente considerati non tossici per la presenza di mutazioni entro il cluster sia in *Microcystis* che in *Planktothrix* hanno mostrato la capacità di produrre cianotossina. A tale proposito, un recente studio (Mbedi *et al.*, 2005) ha identificato *mcyB* e *mcyE* come validi marcatori per la discriminazione di cianobatteri del genere *Planktothrix* produttori di tossina, in quanto è stata osservata una correlazione positiva fra numero di copie di *mcyB* e *mMcyE* e contenuto in microcistine nelle acque analizzate, mentre altri marcatori all'interno del cluster possono a volte generare falsi negativi (*mcyA*) o falsi positivi (*mcyT*, *mcyTD*) (Tabella 1).

**Tabella 1. Analisi di marcatori *mcy* in relazione alla presenza di microcistine in differenti ceppi di *P. agardhii* e *P. rubescens***

Ceppo	microcistina	<i>mcyT</i>	<i>mcyTD</i>	<i>mcyA</i>	<i>mcyB</i>	<i>mcyE</i>
<i>P. agardhii</i> HUB076/A1	+	+	+	+	+	+
<i>P. agardhii</i> LAN2	-	-	-	-	-	-
<i>P. agardhii</i> Max01	-	+	+	-	-	-
<i>P. agardhii</i> Max02	-	+	-	-	-	-
<i>P. agardhii</i> Max08	-	+	+	-	-	-
<i>P. rubescens</i> BL1	+	+	+	-	+	+
<i>P. rubescens</i> BL11	+	+	+	+	+	+
<i>P. rubescens</i> HUB148	+	+	+	-	+	+

In particolare il ruolo di *mcyE* come marcatore di ceppi tossici ha trovato plausibilità biologica nel fatto che codifica per il dominio coinvolto nella biosintesi dell'Adda e nell'incorporazione del D-Glu nelle microcistine, la cui presenza ha un ruolo chiave per la tossicità (Vaitomaa *et al.*, 2003; Rantala *et al.*, 2006).

Accanto a metodiche molecolari "classiche" sono state messe a punto tecniche di *real-time* PCR (qPCR) che permettono di ottenere risultati quantitativi e non solo qualitativi nella determinazione dei genotipi tossici presenti in un campione ambientale. In uno di questi studi (Kurmayer *et al.*, 2003) un saggio TaqMan è stato applicato in *Microcystis* per quantificare il numero di individui *mcyB*-positivi rispetto a tutti quelli che hanno il gene *PC* ottenendo così una stima del numero di genotipi potenzialmente tossici rispetto alla concentrazione della popolazione generale. Per quantificare il numero di copie di individui *PC*-positivi e *mcy*-positivi presenti in un campione ambientale eterogeneo è necessario costruire precedentemente una curva standard per ogni genotipo target utilizzando diluizioni seriali di una coltura pura a concentrazione nota. Una simile procedura è stata utilizzata per quantificare cellule produttrici e non produttrici di microcistina in *Microcystis*, *Anabaena* e *Planktothrix*. Questo è stato l'approccio da noi utilizzato in uno studio tuttora in corso per seguire il fenomeno delle fioriture cianobatteriche dovute a *P. rubescens* nelle acque del lago di Gerosa. Nel corso di un anno di rilevamenti è stato possibile descrivere le oscillazioni di numerosità degli individui tossici e non tossici in relazione alla presenza di microcistine nelle acque. Lo studio ha evidenziato in alcuni casi che il picco di concentrazione delle microcistine totali non corrispondeva al picco di numerosità degli individui. Dati preliminari (Tabella 2) indicano che tale sfasamento tra il

numero degli individui e la produzione della microcistina potrebbe essere parzialmente spiegato con una variazione della percentuale degli individui ‘tossici’ (in grado cioè di produrre la cianotossina) rispetto a quelli ‘non tossici’ (Funari *et al.*, 2007).

**Tabella 2. Quantificazione mediante *real-time* PCR dei genotipi *mcyB* positivi rispetto alla popolazione totale di *P. rubescens* nel lago di Gerosa nei mesi di novembre e dicembre 2006**

	Metodo	Novembre (superficie)	Dicembre (superficie)
Microcistine ( $\mu\text{g/L}$ )	ELISA	1,28	2,04
	LC/MS/MS	0,046	0,4
N. cellule ( $10^6$ )	Microscopio invertito	44	3,7
<i>mcyB</i> vs <i>Pc</i> (%)	qPCR	31	63,7

ELISA: *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*; LC/MS/MS: *Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry*

Recentemente, la messa a punto di metodiche di RT-PCR nei saggi di espressione genica ha reso possibile una più completa caratterizzazione dei ceppi tossici, poiché è stato osservato che la produzione di tossine può essere indotta o repressa in risposta a specifici stimoli ambientali come l'abbondanza o scarsità di nutrienti (fosforo, azoto, ferro). In particolare è stata fatta l'ipotesi che l'espressione dei geni della biosintesi della microcistina non sia la sola ad essere modulata da fattori ambientali. Infatti, l'esistenza di un gene che codifica per un trasportatore ABC di membrana nel cluster genico potrebbe suggerire che un aumento della sua espressione incrementerebbe il trasporto attivo della microcistina in sede extracellulare, in seguito al quale la cellula aumenterebbe la sintesi della tossina per mantenere costante il contenuto intracellulare, per ragioni legate ad un ancora non chiaro ruolo fisiologico delle cianotossine.

Alcuni studi (Tonk *et al.*, 2005) evidenziano come la produzione di microcistine sia incrementata in modo consistente anche in risposta a una aumentata irradiazione solare sia in *Microcystis* che in *Planktothrix*; la produzione di tossine risulta dunque aumentata nei mesi estivi, cioè nel periodo in cui le attività ricreative nei corpi idrici sono maggiormente frequentate.

L'approccio molecolare nell'ambito del monitoraggio di corpi idrici interessati da fioriture di cianobatteri può dunque offrire un potente strumento per monitorare il fenomeno sin dalle fasi più precoci per una migliore gestione della qualità delle acque potabili e di balneazione.

## Bibliografia

- Boutte C, Grubisic S, Balthasart P, Wilmotte A. Testing of primers for the study of cyanobacterial molecular diversity by DGGE. *J Microbiol Methods* 2006;65(3):542-50.
- Dittmann E, Borner T. Genetic contributions to the risk assessment of microcystin in the environment. *Toxicol Appl Pharmacol* 2005;15:203(3):192-200.
- Funari E, Testai E. Human health risk assessment related to cyanotoxins exposure *Crit Rev Toxicol* 2008;38:97-125.
- Funari E, Manganelli M, Bogianni S, Corradetti E, Gemma S, Mattei D, Scardala S, Stefanelli M, Testai E, Vichi S. Seasonal dynamics of *Planktothrix rubescens*, microcystins production and microbial activity in a small lake in central Italy (Gerosa). In: *Abstract book. International Conference on Toxic Cyanobacteria*, Rio de Janeiro State, 5-10 August 2007. p. 104

- Hisbergues M, Christiansen G, Rouhiainen L, Sivonen K, Borner T. PCR-based identification of microcystin-producing genotypes of different cyanobacterial genera. *Arch Microbiol* 2003;180(6):402-10.
- Neilan BA. The molecular evolution and DNA profiling of toxic cyanobacteria. *Curr Issues Mol Biol* 2002;4(1):1-11.
- Neilan BA, Jacobs D, Goodman AE. Genetic diversity and phylogeny of toxic cyanobacteria determined by DNA polymorphisms within the phycocyanin locus. *Appl Environ Microbiol* 1995;61(11):3875-83.
- Kurmayer R, Kutzenberger T. Application of real-time PCR for quantification of microcystin genotypes in a population of the toxic cyanobacterium *Microcystis* sp. *Appl Environ Microbiol* 2003;69(11):6723-30.
- Kurmayer R, Christiansen G, Fastner J, Borner T. Abundance of active and inactive microcystin genotypes in populations of the toxic cyanobacterium *Planktothrix* spp. *Environ Microbiol* 2004;6(8):831-41.
- Kurmayer R, Christiansen G, Chorus I. The abundance of microcystin-producing genotypes correlates positively with colony size in *Microcystis* sp. and determines its microcystin net production in Lake Wannsee. *Appl Environ Microbiol* 2003;69(2):787-95.
- Mbedi S, Welker M, Fastner J, Wiedner C. Variability of the microcystin synthetase gene cluster in the genus *Planktothrix* (*Oscillatoriales*, Cyanobacteria). *FEMS Microbiol Lett* 2005;245(2):299-306.
- Ouellette AJ, Wilhelm SW. Toxic cyanobacteria: the evolving molecular toolbox. *Front Ecol Environ* 2003; 1(7):359-66.
- Rantala A, Rajaniemi-Wacklin P, Lyra C, Lepisto L, Rintala J, Mankiewicz-Boczek J, Sivonen K. Detection of microcystin-producing cyanobacteria in Finnish lakes with genus-specific microcystin synthetase gene E (*mcyE*) PCR and associations with environmental factors. *Appl Environ Microbiol* 2006;72(9):6101-10.
- Saker ML, Jungblut AD, Neilan BA, Rawn DF, Vasconcelos VM. Detection of microcystin synthetase genes in health food supplements containing the freshwater cyanobacterium *Aphanizomenon flos-aquae*. *Toxicon* 2005;46(5):555-62.
- Sivonen K, Jones G. Cyanobacterial toxins. In: Chorus I, Bartram J (Ed.). *Toxic Cyanobacteria in Water: a Guide to their Public Health Consequences, Monitoring and Management*. London: E & FN Spon;1999. p.41-111.
- Tonk L, Visser PM, Christiansen G, Dittmann E, Snelder EO, Wiedner C, Mur LR, Huisman J. The microcystin composition of the cyanobacterium *Planktothrix agardhii* changes toward a more toxic variant with increasing light intensity. *Appl Environ Microbiol* 2005;71(9):5177-81.
- Vaitomaa J, Rantala A, Halinen K, Rouhiainen L, Tallberg P, Mokolke L, Sivonen K. Quantitative real-time PCR for determination of microcystin synthetase e copy numbers for *Microcystis* and *Anabaena* in lakes. *Appl Environ Microbiol* 2003;69(12):7289-97.

# VALUTAZIONE DEL RISCHIO ASSOCIATO ALLA ESPOSIZIONE A CIANOTOSSINE

Enzo Funari, Emanuela Testai

*Dipartimento di Ambiente e Connessa Prevenzione Primaria, Istituto Superiore di Sanità, Roma*

## Introduzione

L'uomo può essere esposto alle cianotossine attraverso diverse vie, la principale delle quali è quella orale, a seguito dell'ingestione di alcuni alimenti (prodotti ittici, prodotti agricoli), di supplementi alimentari (capsule e pillole contenenti estratti/liofili di cianobatteri), di acque potabili o dell'ingestione accidentale o involontaria di acque ad uso ricreazionale. Tuttavia l'esposizione alle cianotossine può avvenire anche attraverso la via cutanea e inalatoria (attività ricreative e professionali in acque contaminate, uso domestico delle acque, es. doccia). Esiste poi la possibilità di esposizione attraverso la via parenterale, quando acque provenienti da corpi idrici superficiali vengono utilizzate per emodialisi: pur essendo meno frequente ed interessando un gruppo specifico e ristretto di individui (i pazienti sottoposti al trattamento terapeutico), questa via di esposizione rappresenta, per le sue caratteristiche, un rischio maggiore per i soggetti esposti.

Il processo di valutazione del rischio segue procedure consolidate e adottate dalle varie organizzazioni internazionali (Funari & Testai, 2007). In accordo a tali procedure, per valutare adeguatamente il rischio per la salute derivante dall'esposizione alle cianotossine è indispensabile disporre delle informazioni relative al loro profilo tossicologico, provenienti sia da studi su modelli animali che da dati sull'uomo, e da studi epidemiologici, oltre che di misure del livello di esposizione rappresentative e rilevanti per i vari scenari da considerare.

## Proprietà tossicologiche delle cianotossine

Una visione sinottica delle principali caratteristiche tossicologiche delle varie cianotossine è presentata nelle Tabelle 1 e 2; per una descrizione dettagliata dei vari aspetti (meccanismo di azione, tossicocinetica, tossicità acuta e per dosi ripetute, genotossicità, cancerogenesi e tossicità dello sviluppo) si rimanda ad una rassegna recentemente pubblicata (Funari & Testai, 2008).

Dal punto di vista tossicologico le cianotossine più studiate sono sicuramente le microcistine (MC) e tra queste la maggior parte dei dati sono disponibili per uno dei 70 congeneri, la MC-LR, che sulla base dei risultati di tossicità acuta è uno dei più epatotossici. Per questo motivo, non avendo disponibili dati sugli altri congeneri e anche sulle nodularine (che condividono bersaglio e meccanismo di azione con le MC), spesso si parla di livelli espressi come MC-LR equivalenti, pensando all'applicazione di un approccio conservativo nei confronti della protezione della salute. È tuttavia ancora da dimostrare che il *ranking* di tossicità delle MC stabilito in base agli effetti acuti sia estrapolabile come tale anche agli effetti a breve e lungo termine.

Tabella 1. Caratteristiche tossicologiche delle principali cianotossine : tossicità acuta, meccanismo di azione e tossicocinetica\*

Cianotossina	LD <sub>50</sub> i.p.** (µg/kg p.c.)	LD <sub>50</sub> orale (µg/kg p.c.)	Organo bersaglio e meccanismo di azione	Informazioni di tossicocinetica
Microcistine(MC)	50-1200 (in dipendenza del congenere)	5000	Fegato (inibizione delle fosfatasi PP1 e PP2A. <i>dosi alte</i> : danni ai capillari sinusoidi ed emorragia intraepatica; <i>dosi basse</i> : induzione di proliferazione cellulare e ipertrofia epatica)	MC-LR: molto idrofila. Trasporto attivo sistema degli anioni organici (OATP) e degli acidi biliari Coniugazione con GSH nel fegato: i coniugati sono molto meno tossici del parentale Escrezione urinaria
Nodularine (NOD)	50	ND**	Fegato (inibizione delle fosfatasi PP1 e PP2A )	Non ci sono informazioni specifiche (probabili similitudini con MC)
Cilindrospermopsina (CYN)	2100 (24 h) 200 (6 giorni)	4400-6900 (2-6 giorni)	Rene e Fegato (composto parentale: inibizione della sintesi proteica; Metaboliti: meccanismo diverso ma ancora non chiarito)	Molto idrofila. Trasporto attivo (sistema degli acidi biliari) ma anche passivo. Evidenze indirette di bioattivazione da citocromo P450. Escrezione urinaria
Anatossina-a (ATX-a)	375	5000	Sistema neuromuscolare (legame al recettore nicotinico Ach ed effetti depolarizzanti sulla membrana)	Assorbimento g.i. rapido, degradazione ed eliminazione rapide, limitato potenziale di bioaccumulo
Omoanatossina-a	330	ND	Simile alla anatossina-a	Simile alla anatossina-a
Anatossina a-(s)	20-40		Sistema nervoso periferico (inibizione della acetilcolinesterasi ed ipereccitabilità nervosa )	Nessuna informazione diretta, ma possibile assorbimento g.i.** rapido, degradazione ed eliminazione rapide
Saxitossine (STX)	10-20	263 (topo)	Sistema neuromuscolare (blocco dei canali ionici di membrana) Effetti acuti sull'uomo: 144-304 µg/persona: sintomi lievi 456-1200 µg/persona: sintomi da moderati a gravi (paralisi e decesso)	Assorbimento g.i. rapido, ampia distribuzione e passaggio della barriera emato-encefalica. Escrezione rapida. Indicazioni indirette di detossicazione Bioaccumulo elevato in crostacei e molluschi.
Endotossine LPS**	40-190 mg/kg pc	ND	Pelle e mucose (irritazione, effetti topici)	Non ci sono informazioni specifiche

\*Le referenze bibliografiche sono rintracciabili in Funari &amp; Testai,2008.

\*\*i.p.= intraperitoneale; ND= Non Determinato; g.i.=gastrointestinale; LPS=lipopolisaccaridiche

Tabella 2. Caratteristiche tossicologiche delle principali cianotossine: tossicità ripetuta, genotossicità, cancerogenesi e tossicità riproduttiva\*

Cianotossina	NOEL** subcronico (µg/kg/g)	LOEL** (µg/kg/g)	ADI/TDI** (µg/kg/g)	Genotossicità/ Cancerogenesi	Tossicità riproduttiva e dello sviluppo
Microcistine (MC)	40 (MC-LR; topi; 13 settimane; gavaggio) 330 (MC-LR in estratti; topi; 13 settimane; orale-dieta)	200	0,04 (UF**=1000)	Non genotossica: risultati positivi secondari a citotossicità MC-LR: attività di promotore tumorale (categoria 2B secondo la IARC)	MC-LR pura: Non tossica per la riproduzione e lo sviluppo. Estratti: attività teratogena in rane
Nodularine (NOD)	ND** (possibile riferirsi alla MC-LR)	ND	-	Non ci sono informazioni specifiche Attività di promotore tumorale (dati non sufficienti alla classificazione secondo la IARC)	Non ci sono informazioni
Cillindropermopsina (CYN)	30 (Topi; 11 settimane; gavaggio) Estratti di <i>C. raciborskii</i> più tossici della CYN pura	60	0,03 (UF=1000)	Tossina parentale: non genotossica: risultati positivi secondari a citotossicità Metaboliti: possibili effetti genotossici Cancerogenesi: non ci sono dati affidabili	Nessun effetto evidenziato al momento
Anatossina-a	>510 (Topi; 54 giorni; acqua potabile) Rischio cronico limitato	ND	0,51 (UF=1000)	Non ci sono informazioni	Non tossica per la riproduzione e lo sviluppo
Omoanatotossina-a	Non esiste un NOEL Rischio cronico limitato	-	-	Non ci sono informazioni	Non ci sono informazioni
Anatossina a-(s)	Non esiste un NOEL Rischio cronico limitato	-	-	Non ci sono informazioni	Non ci sono informazioni
Saxitossine (STX)	Non esiste un NOEL Rischio acuto > cronico	-	-	Non ci sono informazioni	Attività teratogena in larve di pesce e anfibio. Nessuna informazione su mammiferi
Endotossine LPS	Non esiste un NOEL Rischio cronico limitato	-	-	Non ci sono informazioni	Non ci sono informazioni

\*Le referenze bibliografiche sono rintracciabili in Funari &amp; Testai, 2008.

\*\*NOEL= No Observed Effect Level; LOEL = Low Observed Effect Level; ND= Non Determinato; UF= fattori di incertezza; ADI/TDI= dose giornaliera accettabile/tollerabile

Relativamente alla tossicità acuta questo approccio porta inevitabilmente ad una sovrastima della tossicità di miscele di MC e NOD; per una valutazione più realistica è stato perciò proposto (Wolf & Frank, 2002) di utilizzare un metodo simile a quello adottato per le miscele di PCB e diossine, che prevede il calcolo di un fattore noto come *Toxicity Equivalent Factor* (TEF) a partire dai dati tossicologici disponibili sui principali congeneri. Al congenere di riferimento, la 2,3,7,8-TCDD che è il più tossico all'interno del gruppo, viene per definizione assegnato un TEF=1; agli altri congeneri sarà assegnato un TEF ( $\leq 1$ ) proporzionale al loro potenziale tossicologico nei confronti della 2,3,7,8-TCDD. Moltiplicando poi il TEF per la concentrazione dei corrispondenti congeneri presenti nella miscela e sommando i valori ottenuti si otterrà la tossicità della miscela.

La tossina di riferimento può essere considerata la MC-LR, cosicché il suo TEF è =1. Il TEF individuale di una tossina X può essere calcolato dal rapporto tra il valore di LD<sub>50</sub> della MC-LR e della tossina X, secondo l'equazione:

$$\text{TEFX} = \text{LD}_{50} \text{ MC-LR} / \text{LD}_{50} \text{ X}$$

Considerando di avere una miscela ipotetica composta da MC-LR (30 µg/L); MC-RR (100 µg/L) e MC-YR (15 µg/L) e NOD (20 µg/L), seguendo l'approccio conservativo, la tossicità della miscela sarebbe considerata equivalente a quella dovuta alla presenza di 165 µg/L di MC-LR. Se invece fosse applicato l'approccio descritto, il risultato indicherebbe una tossicità equivalente molto inferiore, come esemplificato in Tabella 3.

**Tabella 3. Applicazione del TEF ad una miscela di MC e NOD secondo l'approccio proposto da Wolf & Frank (2002)**

Tossina	Concentrazione (µg/L)	TEF	Equivalente di tossicità
MC-LR	30	1,0	30
MC-RR	100	0,1	10
MC-YR	15	1,0	15
NOD	20	1,0	20
Totale	165		75

Per quanto riguarda gli studi di tossicità per dosi ripetute, studi a lungo termine non sono disponibili per alcuna cianotossina; una delle ragioni principali sta nella difficoltà di disporre di quantità adeguate di cianotossine pure per i trattamenti previsti per un test secondo le linee guida OECD. Lavorare con gli estratti non sembra la soluzione più idonea, anche perché in molti casi gli estratti hanno mostrato un livello di tossicità maggiore rispetto alle cianotossine pure, suggerendo che possano esserci altre componenti della cellula cianobatterica corresponsabili degli effetti o in grado di interagire con le cianotossine, aumentandone la tossicità (Falconer, 2007).

Molta attenzione è stata dedicata anche a presunti effetti genotossici e cancerogeni delle cianotossine: in realtà, nella maggior parte dei casi gli effetti genotossici evidenziati in vivo ed in vitro solo ad elevate concentrazioni sia di MC che di cilindrospermopsina (CYN) sono secondari all'elevata citossicità. Tali effetti possono essere attribuiti alla attività di endonucleasi in grado di frammentare il DNA a seguito dei fenomeni di necrosi (Rao *et al.*, 1998; Zhan *et al.*, 2004; Humpage *et al.*, 2005). La loro rilevanza è quindi marginale. I risultati positivi ottenuti con estratti di cianobatteri ma non con la MC-LR purificata fanno ipotizzare che anche per gli effetti genotossici gli estratti possano contenere altre componenti attive, diverse dalle cianotossine (Ding *et al.*, 1999). L'unica eccezione è rappresentata dai metaboliti prodotti dalla bioattivazione P450-dipendente della CYN: in epatociti primari di topo metabolicamente

competenti sono stati ottenuti risultati positivi nel *comet assay* a dosi di CYN  $\leq 0,05 \mu\text{M}$ , che suggeriscono una possibile attività genotossicità non secondaria alla citotossicità (Humpage *et al.*, 2005). Dal momento che il test utilizzato dà indicazioni di lesioni pre-mutagene, non è possibile trarre conclusioni definitive sulla genotossicità della CYN. Tuttavia, questo è sicuramente uno dei settori nei quali è necessaria l'acquisizione di maggiori informazioni. Relativamente agli effetti cancerogeni, la MC-LR che non ha attività di iniziazione, ha però mostrato proprietà di promozione tumorale in modelli animali (Falconer, 1991; Nishiwaki-Matsushima *et al.*, 1992; Wanght & Zhuth, 1996; Sekijima *et al.*, 1999), che hanno indotto la *International Agency for Research on Cancer* (IARC) a classificare la MC-LR come un cancerogeno di classe 2B (IARC, 2006). I dati sulle nodularine e sulla CYN non sono sufficienti per trarre conclusioni relative alle attività cancerogene di queste tossine.

Un altro settore non sufficientemente esplorato è lo studio delle proprietà tossicologiche delle endotossine LPS (lipopolisaccaridiche). Gli effetti topici che sono stati associati a contatto diretto con le tossine LPS dei cianobatteri, tra cui irritazioni cutanee e oculari, problemi di tipo gastrointestinale e reazioni allergiche e infiammatorie, non sono mai stati dimostrati sperimentalmente. Tali effetti sono stati attribuiti alle LPS cianobatteriche in analogia a ciò che si verifica per contatto con le LPS presenti nella membrana dei batteri Gram negativi. Tuttavia l'entità dell'analogia strutturale non è ancora nota, soprattutto rispetto alla componente lipidica, che è responsabile del grado di tossicità nelle LPS batteriche.

## Dati disponibili sull'uomo

L'uso di acque superficiali interessate da presenza di cianobatteri tossici per l'emodialisi rappresenta un rischio notevole per i pazienti sottoposti a questo trattamento: la via di esposizione di tipo parenterale aumenta notevolmente la possibile dose interna di tossine, che entrano direttamente in circolo.

L'episodio di maggiore rilevanza sanitaria è stato riportato in Brasile, dove sono deceduti 56 pazienti dei 130 sottoposti a dialisi con acqua risultata poi contaminata da microcistine (Jochimsen *et al.*, 1998; Azevedo *et al.*, 2002).

## Acque potabili

In dipendenza dei livelli di cianotossine nelle acque grezze e dell'efficienza dei processi di trattamento delle acque per la rimozione di cianobatteri e cianotossine disciolte, nelle acque per uso umano può essere presente un ampio range di livelli di cianotossine. Alcuni episodi di intossicazioni acute per consumo di acque contaminate hanno chiaramente dimostrato la plausibilità di una tale eventualità (Tabella 4).

Relativamente al rischio cronico associato al consumo di acque contaminate, sono stati condotti alcuni studi epidemiologici, ma le informazioni sono limitate e non permettono di trarre alcuna conclusione. Infatti, in nessuno degli studi è stato possibile provare che le cianotossine fossero il vero agente causale degli effetti osservati, ma semplicemente uno dei più plausibili.

In alcune zone della Cina, in cui gli abitanti consumavano per uso potabile acqua di stagno o di canale non trattata, sono state esaminate le possibili cause della incidenza (doppia rispetto ad altre aree) di tumori primitivi del fegato (Ueno *et al.*, 1996).

**Tabella 4. Segnalazioni di effetti sull'uomo dovuti al consumo ad uso potabile di acque contaminate in varie aree geografiche**

Agente causale	Luogo	Effetti	Bibliografia
Fioritura di <i>Anabaena</i> e <i>Microcystis</i> spp.	Brasile	2000 casi di gastro-enteriti e 88 decessi in 42 giorni	Teixera <i>et al.</i> , 1993
Trattamento di una fioritura di <i>Cylindropermopsis raciborskii</i> con solfato di rame	Australia	140 bambini e 10 adulti ospedalizzati per danni epatici e renali in 1 settimana. Recupero completo di tutti i pazienti	Byth, 1980; Hawkins & Griffiths, 1993
Fioriture di diversi cianobatteri	Australia, Austria	Danni epatici e gastroenteriti	Botes <i>et al.</i> , 1985; Fawell <i>et al.</i> , 1993; Zilberg, 1996; El Saadi <i>et al.</i> , 1995; Falconer, 1989, 1994

È comunque facile intuire che il consumo di acqua non potabilizzata proveniente direttamente da stagni e corpi idrici non controllati comporta la presenza di tanti e tali fattori di rischio microbiologico e chimico, che è pressoché impossibile trovare un nesso causale tra i due eventi. Inoltre il consumo da parte di quelle stesse popolazioni di cibi contaminati da aflatossina B1, potente epatocancerogeno, rappresenta un ulteriore fattore confondente.

In Florida è stato condotto uno studio ecologico per valutare l'associazione tra rischio di contrarre tumore epatico o coloretale e consumo di acque superficiali potenzialmente contaminate da microcistine, utilizzando come popolazioni di controllo quelle che vivono in aree contigue, dove si consuma acqua di pozzo, assumendo a priori similitudine per stile di vita e caratteristiche demografiche. I risultati ottenuti non hanno permesso di provare né di negare alcuna associazione eziologia (Fleming *et al.*, 2001, 2002).

Alla luce della scarsa qualità dei dati epidemiologici disponibili, la IARC (2006) ha concluso che non è possibile associare l'eccesso di rischio di tumori epatocellulari e coloretale, riportati in alcuni studi, con l'esposizione alle MC.

## Integratori alimentari

Recentemente si è andato diffondendo nei paesi industrializzati l'uso come integratori alimentari di estratti di alghe verde-azzurre (*Blue Green Algae Supplements*, BGAS), in passato diffuse in paesi orientali come Cina e India (Carmichael *et al.*, 2000). Gli integratori, principalmente a base di *Aphanizomenon flos-aquae* e *Spirulina* spp., vengono consumati per le loro presunte attività di migliorare l'umore, aiutare nella perdita di peso durante diete ipocaloriche e come fonte energetica (Jensen *et al.*, 2001) e sono anche somministrati a bambini in età scolare che soffrono di disturbi dell'attenzione e iperattività (sindrome della *Attention Deficit Hyperactivity Disorder*, ADHD) come terapia alternativa. L'assunzione è strettamente dipendente da scelte individuali e può difficilmente essere controllata per la valutazione della esposizione.

Recentemente è stato pubblicato un caso di decesso in una donna 34enne per tossicità epatica. Sebbene una diretta relazione causa-effetto non sia ancora stata stabilita con certezza, la morte è stata correlata all'assunzione cronica di BGAS, di cui la paziente era abituale consumatrice, dal momento che: i) i prodotti in suo possesso sono risultati contaminati da MC

(2,62-4,06 µg MC-LR equivalenti/g di peso secco); ii) sezioni epatiche della paziente sono risultate positive ad analisi immunoistochimiche con anticorpi anti-MC; e iii) i danni epatici non sono risultati compatibili con cirrosi da consumo di alcol, ma tipici degli effetti prodotti da MC (Dietrich *et al.*, 2007).

## Acque di balneazione

Per quanto riguarda il rischio associato alle attività ricreative in acque di balneazione, sembra opportuno premettere che in Paesi temperati, come il nostro, la stagione balneare è limitata ai 4-5 mesi più caldi dell'anno. Questo tipo di esposizione non ha pertanto le caratteristiche necessarie per prefigurare un rischio cronico.

È invece possibile che in certe situazioni l'esposizione a cianobatteri durante le attività ricreative dia luogo ad effetti a breve termine, che sono stati, infatti, riportati in alcune pubblicazioni scientifiche.

Un unico caso di decesso è stato a posteriori associato ad esposizione ad anatoossina-a da un coroner negli Stati Uniti. Un ragazzo avrebbe ingerito involontariamente acqua contaminata da questa cianotossina in uno stagno di un campo da golf (la tossina era stata rilevata nel fegato). Tuttavia questa associazione è caratterizzata da rilevanti incertezze, soprattutto in relazione al lungo tempo di latenza tra esposizione e decesso (circa 48 ore), inconsistente con i tempi nettamente inferiori osservati negli animali di laboratorio (Stewart *et al.*, 2006b).

A seguito di esposizioni a cianobatteri nelle acque di balneazione sono stati riportati effetti sui bagnanti quali forti emicranie, polmoniti, febbre, mialgia, vertigini, formazione di vescicole (Dillenberg & Dehnel, 1960; Carmichael *et al.*, 1985; Stewart *et al.*, 2006c, Turner *et al.*, 1990). In un episodio, 10 su 20 soldati esposti ad un'intensa, prolungata attività di nuoto e canottaggio in un invaso infestato da una fioritura di *Microcystis*, riportarono vari sintomi respiratori, inclusi due casi di polmonite (Turner *et al.*, 1990).

In uno studio epidemiologico condotto in Australia, non sono risultate significative le differenze nei sintomi tra esposti e non esposti a due giorni dall'esposizione mentre sono risultate significative dopo sette giorni dall'esposizione a densità di cianobatteri superiori a 5000 cellule/mL (Pilotto *et al.*, 1997). Tuttavia, questo studio mostra diverse limitazioni, come, ad esempio, il numero ridotto di individui esposti e non. È stato anche osservato che le reazioni allergiche ritardate attribuite all'esposizione ai cianobatteri, osservate dopo 7 giorni, non sarebbero compatibili con i tempi tipici di queste reazioni, generalmente 4-24 ore dall'esposizione (Stewart *et al.*, 2006b).

In tre studi analitici condotti nel Regno Unito su 6 corpi idrici, 5 dei quali infestati da fioriture di cianobatteri, è emerso un quadro abbastanza comune: gli effetti osservati in tutti i casi erano comunque riconducibili a forme minori di morbidità (Philipp, 1992; Philipp & Bates, 1992).

A seguito di un'estesa fioritura di *Anabaena circinalis* in un corpo idrico in Australia, è stato riportato un aumento significativo del rischio di disturbi gastrointestinali e dermatiti in persone che avevano utilizzato le acque grezze non trattate per uso domestico ma non in coloro (soltanto 50) che praticarono attività ricreative nel corpo idrico (El Saadi *et al.*, 1995).

In uno studio prospettico, 1331 persone furono reclutate per studiare possibili effetti associati all'esposizione ai cianobatteri in 19 corpi idrici utilizzati per attività ricreative in Australia e in Florida (Stewart *et al.*, 2006b). Fu osservato un aumento significativo del rischio di sintomi respiratori e altri sintomi minori tra i soggetti esposti ai livelli più elevati di cianobatteri. Una relazione simile ma non significativa fu osservata per sintomi come febbre, dermatiti e otiti. Soltanto raramente le cianotossine vennero rilevate nelle acque utilizzate per attività ricreative;

quando presenti i livelli di MC, CYN e anatoxina-a erano generalmente bassi (intorno ad 1 µg/L), molto inferiori ai valori in grado di causare effetti sistemici.

A proposito degli effetti cutanei riportati in diversi studi, sembra opportuno rilevare che questi sono fortemente suggestivi di reazioni allergiche e che almeno alcuni dei sintomi osservati (come riniti, asma, congiuntiviti e orticaria) indicano una risposta dovuta a ipersensibilità immediata, probabilmente attribuibile ad una cascata di azioni scatenate all'azione infiammatoria delle citochine, consistente con le reazioni infiammatorie attribuite alle endotossine LPS. Non è possibile tuttavia escludere il ruolo dei batteri Gram negativi, come agenti eziologici per questi effetti, poiché anch'essi sono produttori di queste tossine. Infine, sembra opportuno rilevare che sintomi come dermatiti ed effetti gastrointestinali possono essere erroneamente attribuiti all'esposizione alle cianotossine ma potrebbero essere causati anche da altri agenti, come ad esempio alcuni composti organici rilasciati dalla lisi delle cellule dei cianobatteri (aldeidi, terpenoidi, chetoni, ecc.) che hanno proprietà irritanti e sensibilizzanti e altri fattori di rischio presenti nelle acque interne come la cercaria avicola, altri batteri e/o virus, ecc. (Stewart *et al.*, 2006a).

Sulla base dei dati aneddotici, epidemiologici e tossicologici (come illustrato di seguito) disponibili, sembra possibile concludere che il rischio di effetti gravi per la salute dei bagnanti è posto dai cianobatteri soltanto quando sono presenti in forma di fioriture o schiume.

Non sono disponibili studi riguardanti i possibili effetti sulla salute umana associati ad altre fonti di esposizione (es. prodotti ittici).

In conclusione, i dati disponibili mostrano che l'esposizione ad elevati livelli di alcune cianotossine e/o altri prodotti dei cianobatteri è in grado di causare effetti gravi (anche molto gravi) alla salute delle persone esposte (es. emodialisi, acque potabili, balneazione, supplementi alimentari). Tuttavia, nel loro insieme, i dati sull'uomo sono molto carenti, certamente non sufficienti per una valutazione esauriente del rischio associato all'esposizione, in particolare cronica, alle cianotossine.

Queste carenze possono essere almeno in parte colmate utilizzando le conoscenze acquisite attraverso gli studi disponibili riguardanti le caratteristiche tossicologiche delle cianotossine. Sulla base di queste conoscenze sono possibili le seguenti valutazioni del rischio, in relazione alle diverse tipologie di esposizione note alle cianotossine.

## Rischio cronico

Il valore di dose giornaliera accettabile/tollerabile per esposizioni a lungo termine (*Acceptable Daily Intake/Tolerable Daily Intake*, ADI/TDI), può essere ricavato seguendo l'approccio utilizzato a livello internazionale da varie organizzazioni (*U.S. Environmental Protection Agency*, EPA; Unione Europea) e seguito anche dall'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS).

Generalmente il valore di TDI si ottiene dal rapporto tra il NOEL tossicologicamente rilevante e una serie di fattori di incertezza (*Uncertainty Factors*, UF) che tengano conto delle incertezze del dato sperimentale e dei possibili fattori di variabilità, utilizzando considerazioni di tipo conservativo per dare adeguati margini di sicurezza alla protezione della salute dell'uomo:

$$TDI = NO(A)EL / UF .$$

Di seguito viene effettuato il calcolo del valore di TDI per la MC-LR, la CYN e la ATX-a, per le altre tossine non esistono dati tali da poter ricavare una TDI:

– *MC-LR*

In assenza di uno studio di tossicità cronica, è stato considerato come valido il valore di NOEL (*No Observed Effect Level*) subcronico quello derivante dallo studio a 13 settimane sul topo pari a 40 µg/kg pc/giorno (Fawell *et al.*, 1999a). La scelta di questo NO(A)EL (*No Observed Adverse Effect Level*) rappresenta un esempio della applicazione dell'approccio conservativo; infatti è stato derivato da uno studio sul topo, che almeno rispetto agli effetti acuti della MC-LR si è dimostrato più sensibile rispetto al ratto; nello studio le dosi testate sono molto distanti e il LO(A)EL (*Lowest Observed Adverse Effect Level*) (dose immediatamente superiore al NOAEL) è 200 µg/kg pc/giorno con effetti molto leggeri e presenti solo in un numero limitato degli animali trattati, per cui il valore di NOAEL potrebbe essere verosimilmente più elevato di 40 µg/kg pc/giorno; infine la via di esposizione è il gavaggio piuttosto che la somministrazione attraverso la dieta. Quest'ultima modalità di trattamento è stata utilizzata in un altro studio subcronico che ha fornito un NOAEL più alto (300 µg/kg pc/giorno), sulla base del fatto che il gavaggio introduce una dose 'bolo' nel tratto gastrointestinale con il raggiungimento di dosi interne più elevate, mentre attraverso la dieta l'introduzione è graduale e i sistemi di detossificazione possono essere più efficienti.

Al valore del NOAEL si applica un fattore di incertezza di 1000 dovuto alla moltiplicazione di 3 fattori pari a 10 che tengono conto:

- 1) della variabilità interspecifica (i dati sono ottenuti su animali sperimentali e si considera, a scopo puramente cautelativo, che l'uomo possa essere più sensibile);
- 2) della variabilità intraspecifica (si considera che all'interno della popolazione umana possano essere presenti individui più suscettibili per età come bambini e anziani, stati fisio-patologici e per caratteristiche genetiche e/o acquisite);
- 3) della mancanza di dati di tossicità cronica (lo studio subcronico corrisponde a circa 1/6 dell'intero arco della vita del topo) e delle proprietà biologiche della tossina.

Dall'applicazione dei suddetti fattori di sicurezza si ottiene la TDI per la MC-LR di 0,04 µg/kg pc/giorno (quindi 2,4 µg per una persona di 60 kg di peso). Questo vuol dire che un'assunzione fino a 2,4 µg di MC-LR/persona ogni giorno per l'intero arco della vita non comporta un rischio sanitario apprezzabile.

– *CYN*

Anche in questo caso non esistono studi di tossicità cronica. Il valore di NOEL subcronico più rilevante è quello pari a 30 µg/kg pc/giorno, derivato da uno studio in cui l'effetto critico considerato è una variazione del peso del rene (Humpage & Falconer, 2003). A questo valore, analogamente a quanto descritto per la MC-LR, è applicato un fattore di incertezza di 1000 che tiene conto della variabilità inter- e intra-specifica e della mancanza di dati di tossicità cronica. Dall'applicazione dei suddetti fattori di sicurezza si ottiene la TDI di 0,03 µg/kg pc/giorno; quindi 1,8 µg per una persona di 60 kg di peso. Questo vuol dire che un adulto può assumere fino a 1,8 µg di CYN ogni giorno per l'intero arco della vita senza che tale ingestione comporti un rischio sanitario apprezzabile. Questo valore di TDI deve essere considerato provvisorio: infatti, nel momento in cui dovessero essere dimostrate proprietà mutagene e/o cancerogene della CYN, al momento non ancora chiare, si renderebbe necessario aggiornarlo.

– *ATX-a*

Sulla base degli studi disponibili, l'OMS ha considerato che i dati di tossicità ripetuta non sono sufficienti per calcolare una vera TDI (Falconer *et al.*, 1999b). Infatti, negli studi per via orale disponibili (durata 4-7 settimane) non sono mai stati evidenziati effetti tossici

anche alle dosi più alte saggiate (fino a 510 µg/kg pc/d) (Astrachan *et al.*, 1980): non è stato perciò possibile calcolare un vero e proprio NOEL, dal quale ricavare la TDI. Tuttavia, per le considerazioni sopra esposte, sembra ragionevole ipotizzare che gli effetti cronici per la salute umana siano meno rilevanti rispetto a quelli acuti. Prendendo come range di valori provvisori di NOAEL 120-510 µg/kg pc/d (pur sapendo che il valore reale è sicuramente più elevato e quindi assumendo un atteggiamento conservativo) e applicando un fattore di incertezza di 1000 (100 per la variabilità inter- e intraspecifica e altri 10 per la mancanza di dati di tossicità cronica) si otterrebbero TDI di 0,12-0,51 µg/kg pc al giorno.

In quei casi nei quali acque interessate da fioriture di cianobatteri in corpi idrici superficiali siano utilizzate a scopo potabile, può configurarsi un rischio da esposizione cronica alle cianotossine. Tuttavia i trattamenti di potabilizzazione ai quali sono sottoposte le acque superficiali prima della loro distribuzione dovrebbero essere condotti in modo da ottenere una forte riduzione dei livelli delle cellule dei cianobatteri e delle cianotossine disciolte (Dietrich & Hoeger, 2005). Ovviamente dovrebbero essere evitate le condizioni, come ad esempio l'uso di alcuni disinfettanti, in grado di causare la lisi cellulare con il conseguente rilascio delle tossine (Jones & Orr, 1994). I trattamenti di potabilizzazione sono oggi in grado di rimuovere >99% delle cellule e delle cianotossine disciolte nelle acque grezze, ma dovrebbero comunque essere calibrati sulla base delle conoscenze sul corpo idrico e in relazione al contenuto delle cianotossine totali e di quelle disciolte in acqua. La somma del contenuto intracellulare e delle cianotossine disciolte è generalmente l'indice di esposizione più rilevante nella valutazione del rischio, tuttavia in alcuni casi è necessario differenziare tra forma particolata e disciolta. Ad esempio, quando i processi di potabilizzazione in atto sono capaci di rimuovere efficacemente solo le cellule di cianobatteri, il livello di tossine disciolte diventa il parametro di esposizione umana più rilevante. Il contenuto intracellulare delle MC è generalmente più alto della concentrazione di tossine disciolte nell'ambiente circostante (van Apeldoorn *et al.*, 2007; Ibelings & Chorus, 2007), dove sono solo parzialmente rilasciate attraverso processi di trasporto attivo (Rapala *et al.*, 1997). Al contrario la CYN spesso viene ritrovata in acqua a concentrazioni paragonabili e anche più elevate di quelle intracellulari (Rücker *et al.*, 2007); per le altre cianotossine non sono disponibili informazioni attendibili sulla proporzione relativa di tossina disciolta in acqua rispetto al totale. Quando le fioriture sono in fase di decadimento o in seguito all'uso di agenti lisanti, è possibile che le concentrazioni di tossine disciolte siano piuttosto elevate (van Apeldoorn *et al.*, 2007; Jones & Orr, 1994): il fenomeno è comunque limitato nel tempo a causa della forte diluizione all'interno del corpo idrico, del rimescolamento operato dal vento e da fenomeni di adsorbimento ai sedimenti e di (bio)degradazione.

## Acque potabili

La possibilità di esposizione umana a MC attraverso l'acqua potabile è stata considerata dalla OMS, che ha derivato a partire dalla TDI di 0,04 µg/kg pc/giorno relativa alla MC-LR, un valore guida (*Guidance Value*, GV) di 1 µg/L per la concentrazione della MC-LR, avendo considerato che l'assunzione attraverso l'acqua potabile rappresenti l'80% della assunzione totale (*Allocation Factor*, AF) ed un consumo di 2 L di acqua/giorno per una persona di 60 kg di peso.

$$GV = \frac{TDI \times \text{peso corporeo} \times AF}{\text{consumo giornaliero (C)}} = \frac{0,04 \mu\text{g/kg} \times 0,8 \times 60 \text{ kg}}{2\text{L}} \cong 1 \mu\text{g/L}$$

Non avendo a disposizione TDI relative agli altri congeneri, è stato proposto di estendere il GV al contenuto di MC totali (Chorus & Bartram, 1999). Considerando che la MC-LR è tra i congeneri più tossici, relativamente alla tossicità acuta, considerare che il livello di cianotossine totali sia espresso in equivalenti di MC-LR rappresenta un approccio conservativo per la protezione della salute.

L'OMS non ha definito GV per altre cianotossine. Tuttavia partendo dai dati tossicologici disponibili e utilizzando lo stesso tipo di approccio è possibile ricavare valori indicativi sia per la ATX-a e per la CYN.

Nel caso della ATX-a, pur non essendo stato identificato un NOEL per la tossicità subcronica, visto che nel range di concentrazioni 120-510 µg/kg pc/giorno non sono evidenziabili effetti (Astrachan *et al.*, 1980; Fawell *et al.*, 1999b), è possibile considerare il valore più alto saggiato come un NOEL, per ricavare una TDI provvisoria di 0,51 µg/kg pc/g, e un GV  $\cong$  12 µg/L (Duy *et al.*, 2000). Partendo da questo valore di TDI provvisoria, è stato proposto che un valore guida di 1 µg/L per la concentrazione massima nell'acqua potabile fornirebbe un margine di sicurezza adeguato alla protezione della salute di popolazioni potenzialmente esposte (Fawell *et al.*, 1999b).

Relativamente alla CYN, dal valore di TDI=0,03 µg/kg pc/giorno, calcolata sulla base del NO(A)EL subcronico (Humpage & Falconer, 2003), e considerando una percentuale di assunzione attraverso l'acqua da bere del 90% (dovuta essenzialmente alla carenza di informazioni su una possibile esposizione attraverso cibi contaminati o altre fonti) si può ricavare un GV= 0,81 µg/L, che può essere arrotondato a GV= 1 µg/L (Codd *et al.*, 2005).

## Dieta

Un'altra fonte di esposizione cronica alle cianotossine è rappresentata dalla dieta: le cianotossine potrebbero essere ingerite attraverso:

- le carni e/o il latte degli animali che si siano abbeverati con acque contaminate;
- il consumo di vegetali irrigati con acque contaminate;
- il consumo di prodotti ittici.

Il rischio proveniente dal consumo di carni e latte non sembra essere significativo dai dati disponibili. Infatti, i risultati di studi su bovini trattati con MC o estratti di *M. aeruginosa* indicano l'assenza di residui nelle carni e nel latte (Orr *et al.*, 2001; Feitz *et al.*, 2002). Non sono disponibili dati per le altre cianotossine.

Il possibile accumulo di cianotossine in prodotti vegetali, specialmente a foglia larga, è stato inizialmente ipotizzato sulla base di un lavoro nel quale piante di lattuga erano irrigate con acque contenenti fioriture e schiume di *M. aeruginosa*. L'analisi dei liofilati del materiale ottenuto dalla fioritura indicavano la presenza di equivalenti di MC-LR fino a 3,23 µg/mg peso secco (Codd *et al.*, 1999). Dopo 10 giorni dall'ultima irrigazione, furono trovati in estratti delle foglie di lattuga non lavati livelli di MC-LR tra 0,094 e 2,487 µg/g peso secco, che gli stessi autori attribuiscono con buona probabilità al contenuto intracellulare di cellule di cianobatteri depositate sulle foglie. Anche se in questo specifico caso si può considerare che i cianobatteri possano venire facilmente rimossi con le semplici operazioni di lavaggio delle verdure prima del consumo, altri lavori si sono interessati al possibile assorbimento delle tossine disciolte da parte di piante. Estratti di piantine di rapa e riso esposte ad acque contenenti MC-LR equivalenti fino a 3 mg/L contenevano livelli di MC proporzionali ai livelli di esposizione con livelli massimi di 651 e 5,4 ng/g peso fresco rispettivamente di rapa e riso (Chen *et al.*, 2004). Lo studio quindi mostra che, seppur con marcate differenze di specie, alcuni vegetali possono trattenere MC presenti nelle acque di irrigazione.

Negli studi appena descritti vengono comunque utilizzate acque interessate da livelli di MC corrispondenti a fioriture sostenute e a schiume. Non solo questo non può che essere un evento episodico e di durata limitata per poter essere rilevante per un consumo cronico, ma quei livelli di MC sono in grado di inibire la crescita delle piante e di causare fenomeni visibili di fitotossicità (presenza di foglie gialle e brune), che ovviamente limitano la possibilità che tali prodotti possano venire consumati dalla popolazione (Chen *et al.*, 2004). Quando invece vegetali come i broccoli siano stati irrigati con acque contenenti livelli di MC tipicamente misurati in acque superficiali (1-10 µg/L), le tossine sono rilevabili solo nelle radici, a livelli che non corrispondono ad alcun rischio apprezzabile per la salute umana (Järvenpää *et al.*, 2007).

L'insieme dei dati disponibili indica che il consumo di prodotti vegetali non rappresenta un rischio per la salute, anche se sembra ragionevole sconsigliare l'uso irriguo per acque chiaramente interessate da forti fioriture e schiume per piante ad uso alimentare.

Le MC possono accumularsi negli organismi acquatici e il loro consumo può rappresentare un problema significativo per la salute umana (Duy *et al.*, 2000), anche in seguito alla possibilità di accumulare lungo la catena alimentare. Dall'analisi dei dati disponibili sono state rilevate le seguenti concentrazioni massime di MC nelle parti eduli di pesci, nei crostacei e nei mitili: 300, 2700 e 16000 µg/kg, rispettivamente (Dietrich & Hoeger, 2005). Recentemente un valore anche più alto di MC (370 µg/kg) è stato riportato come livello di contaminazione nella carpa (*bighead carp*) pescata in un lago cinese (Chen *et al.*, 2007). Per le altre cianotossine invece le informazioni sono molto carenti, ma, data l'instabilità delle anatoxine, è ragionevole pensare che un loro accumulo nei prodotti ittici sia altamente improbabile.

Gli organismi acquatici (pesci, molluschi bivalvi crostacei e altri macroinvertebrati) possono accumulare le cianotossine attraverso l'ingestione di cianobatteri e/o di cibo contaminato o assorbendo le tossine disciolte attraverso la via transdermica. Quest'ultima via di esposizione potrebbe essere particolarmente rilevante per la CYN, che si trova spesso preferenzialmente in forma disciolta piuttosto che localizzata all'interno delle cellule batteriche (Preussel *et al.*, 2006; Rücker *et al.*, 2007). Nel caso delle MC, sebbene concentrazioni elevate siano state misurate in acqua in seguito alla lisi di fioriture superficiali senescenti o per l'uso di agenti in grado di produrre lisi, può essere ragionevolmente assunto che l'esposizione del biota a livelli elevati di MC disciolte sia un evento poco frequente e comunque di durata molto limitata (Ozawa *et al.*, 2003). Di conseguenza l'ingestione di cibo contaminato da MC e/o di cianobatteri rappresenta la via di esposizione più rilevante per il biota. Recentemente è stata pubblicata una rassegna molto accurata, a cui si rimanda per i dettagli, sul *pattern* di bioaccumulo delle cianotossine negli organismi eduli di acqua dolce e sulla possibilità di bio-magnificazione confrontata con i processi di bio-diluizione nella catena trofica (Ibelings & Chorus, 2007).

Dai dati disponibili ad oggi è possibile concludere che la fonte più rilevante di ingestione di MC attraverso la dieta per l'uomo è rappresentata dal consumo dei prodotti ittici.

La valutazione del rischio tossicologico associato al consumo cronico di prodotti ittici può essere effettuata confrontando la TDI con i livelli di cianotossine assunte giornalmente. Per valutare l'assunzione di cianotossine con i prodotti ittici è necessario misurarne per un periodo congruo le concentrazioni nelle parti eduli delle specie più rappresentative per il loro consumo, in modo da poter avere una stima attendibile della loro ingestione media. Se, nel caso delle MC, i valori di assunzione non superano o eguagliano la TDI definita dall'OMS (0,04 µg/kg pc/giorno, corrispondenti a 2,4 µg/giorno per una persona adulta di 60 kg di peso corporeo), anche consumi protratti per l'intero arco della vita non comportano un rischio sanitario significativo.

L'identificazione del livello di esposizione è un aspetto cruciale nel processo di valutazione quantitativa del rischio. Nel caso del consumo di prodotti ittici per avere una stima attendibile dell'ingestione media di cianotossine, è necessario misurare il contenuto di cianotossine nelle

parti eduli delle specie consumate per un periodo di tempo sufficientemente lungo, tenendo nella dovuta considerazione le variazioni stagionali nella produzione di cianotossine. È pertanto necessario elaborare programmi di monitoraggio adeguati per il corpo idrico d'interesse. Una stima dell'esposizione non accurata non permette una valutazione del rischio attendibile.

In riferimento alla stima delle quantità di cianotossine ingerite attraverso il consumo di prodotti ittici, non è noto in primo luogo quale forma delle cianotossine (libera, coniugata, associata alle proteine) sia realmente biodisponibile e a quale forma riferiscono i livelli misurati nei tessuti. Le differenze osservate applicando metodi immunoenzimatici e di LC/MS (*Liquid Chromatography/Mass Spectrometry*) fanno ritenere che con i primi viene rilevata la somma di cianotossine in forma libera e coniugata e forse in parte legate alle proteine tissutali; con i secondi vengono rilevate le cianotossine in forma libera (anche se difficilmente sono determinate tutte le possibili varianti presenti), ma ovviamente dipende dal metodo utilizzato per trattare il tessuto prima della estrazione.

Molti dei dati disponibili sono stati ottenuti in prove di laboratorio; quando invece provengano da prove sul campo, sono il frutto di misure sporadiche (valori picco) e non di piani di monitoraggio adeguati allo scopo o ottenuti su specie non comunemente consumate dalla popolazione: conseguentemente, i dati a disposizione sono generalmente poco rappresentativi della reale esposizione cronica dell'uomo.

Pur con tutti i limiti appena esposti, non avendo a disposizione dati di consumo cronico attendibili, sono stati considerati validi i limiti del *range* di concentrazioni di MC nelle parti eduli di pesci (0,25-100 µg/kg). Assumendo, in uno scenario decisamente considerabile come un *worst case*, un consumo medio giornaliero per tutta la vita adulta di 200 g (equivalente al peso di un pesce da porzione, ma superiore di circa 3 volte al consumo di pesce giornaliero previsto dalla FAO, *Food and Agriculture Organization*, per la dieta del nostro Paese), possono essere calcolate ingestioni pari a 0,05-20 µg/persona al giorno. Il valore più basso è ben al di sotto il valore della TDI e quindi non c'è un rischio apprezzabile nel consumo di pesce; al contrario il valore più alto dell'intervallo è quasi 10 volte più alto della TDI, indicando chiaramente che l'ingestione cronica di pesce contaminato a quei livelli rappresenta un rischio sanitario da considerare.

Considerazioni simili potrebbero essere utilizzate per valutare il rischio conseguente all'ingestione di pesci contenenti altre cianotossine, ma il data set disponibile è talmente limitato che ad oggi sembra azzardato anche condurre una valutazione di rischio provvisorio.

## Integratori alimentari

Un'altra possibile fonte di esposizione è costituita dagli integratori alimentari di estratti di alghe verde-azzurre, principalmente a base di *Aphanizomenon flos-aquae* e *Spirulina* spp. Vengono consumati per le loro presunte attività benefiche e in virtù del loro essere 'prodotti naturali', anche in dosi relativamente elevate, fino a 20 g al giorno (Dietrich & Hoeger, 2005). Non essendo farmaci non esistono specifiche prescrizioni, l'assunzione è strettamente dipendente da scelte individuali e può difficilmente essere controllata per la valutazione della esposizione.

Alcuni studi hanno evidenziato recentemente la contaminazione di alcuni integratori da MC-LR, con livelli variabili fino ad un massimo di 35 µg/g, e comunque con una percentuale elevata di campioni con livelli superiori a 1 µg/g di peso secco (Dietrich & Hoeger, 2005).

Per valutare il rischio che deriva da un'assunzione molto prolungata nel tempo di prodotti contaminati da MC-LR, dovrà essere confrontato il valore di MC-LR presente nella quantità totale di integratore ingerito nell'arco di una giornata con il valore di TDI di 0,04 µg/kg pc/g: valori inferiori o uguali alla TDI non comportano un rischio apprezzabile per la salute anche in

caso di consumo per l'intero arco della vita. Nel caso peggiore (*worst case*) in cui un adulto consumi 20 g di integratore al giorno (il livello più alto di consumo riportato in letteratura) contaminati da 35 µg/g di peso secco di MC-LR (il livello massimo determinato), si avrebbe una ingestione di 700 µg/persona/giorno con superamento significativo ( $\cong 250$  volte) della TDI totale (che per un adulto di 60 kg è 2,4 µg/persona al giorno). Considerando scenari più realistici del sopradescritto *worst case*, potremmo assumere un consumo medio di 4 g di BGAS giornalieri (che da una indagine molto preliminare sui prodotti disponibili sul mercato corrispondono a 4-8 capsule) e un livello di contaminazione di 1 µg MC/g: si avrebbe una assunzione totale di 4 µg MC/persona al giorno, con un superamento della TDI che potrebbe configurare una situazione di rischio cronico per un adulto. Visto che una buona percentuale (>60%) dei campioni analizzati fino ad oggi conteneva livelli superiori a 1 µg/g di peso secco, appare evidente come il superamento della TDI possa verificarsi frequentemente.

Alcuni autori (Gilroy *et al.*, 2000) hanno proposto un valore limite provvisorio per gli integratori di 1 µg MC/g di peso secco, ottenuto utilizzando un approccio simile a quello usato dall'OMS per la determinazione del GV per l'acqua potabile. Tuttavia, come appena evidenziato, con tale contaminazione è sufficiente un consumo di 4 g giornalieri di BGAS per porre problemi alla salute umana a seguito di un consumo cronico per un adulto. Questo valore porrebbe comunque rischi non trascurabili per la salute dei bambini, per i quali è stato descritto il consumo di tali prodotti anche in tenera età come terapia 'alternativa' per la ADHD, in considerazione del loro minore peso corporeo. Infatti per un bambino in età scolare del peso di circa 30 kg, la TDI risulterebbe di circa 1,2 µg MC al giorno e con un livello di contaminazione pari a 1 µg di MC/g di integratore il consumo verosimile di circa 1 g al giorno (equivalente a 1-2 capsule) porterebbe ad una ingestione simile a quella della TDI.

La presenza di cianotossine come contaminanti di integratori alimentari a base di alghe verde-azzurre non può essere trascurato e presuppone una attenzione particolare da parte delle Autorità sanitarie che nella impossibilità di bandire tali prodotti dal mercato dovrebbero porre limiti precisi e cautelativi per la popolazione per autorizzare la loro immissione in commercio.

## Rischio subacuto/subcronico

Una delle possibili obiezioni alla conduzione di una valutazione di rischio associata ad un consumo cronico sia di prodotti ittici che di integratori alimentari è legato all'adozione di scenari di esposizione poco realistici.

È, infatti, estremamente poco probabile che un individuo consumi pesce contaminato da cianotossine tutti i giorni della propria vita. Appare molto più realistico pensare che tale eventualità possa ragionevolmente verificarsi per un periodo di tempo limitato ma discreto, ad esempio in relazione alla stagione di fioritura dei cianobatteri nel corpo idrico di interesse. Questo scenario di esposizione configurerebbe un rischio associato ad un'esposizione subcronica e potrebbe essere considerato più rappresentativo delle reali condizioni di esposizione umana. Questa situazione nell'ambito della valutazione del rischio per il consumatore associato alla sicurezza d'uso dei prodotti fitosanitari, si traduce nella derivazione della dose acuta di riferimento (*Acute Reference Dose*, ARfD), allo scopo di proteggere gruppi di popolazione che consumino elevati livelli di una derrata contenente residui di prodotti fitosanitari dotati di una elevata tossicità acuta, soprattutto se si tratti di neurotossicità, come nel caso delle cianotossine.

La ARfD viene calcolata sulla base del NO(A)EL subacuto/subcronico, al quale vengono applicati gli opportuni fattori di incertezza (UF). Per la MC-LR un UF = 100, che copra le differenze inter- e intra-specifiche è considerato sufficiente; il risultato è una ARfD = 0,4 µg/kg al giorno, corrispondente a 24 µg/persona al giorno per un adulto di 60 kg. Il confronto della

ARfD con i valori di *intake* calcolati assumendo un consumo medio di 200 g di prodotto ittico e l'intervallo dei valori medi di contaminazione da MC (0,05-20 µg/persona adulta al giorno), evidenzia che, mentre nella parte bassa dell'intervallo, non si corrono rischi per la salute, il valore più alto dell'intervallo è molto vicino al valore di riferimento e di conseguenza è consigliabile un atteggiamento di attenzione da parte delle Autorità locali sia nel seguire attentamente i livelli di contaminazione, sia raffinando la valutazione del rischio attraverso la considerazione delle altre possibili fonti di esposizione, che potrebbe portare come rischio cumulativo ad una situazione di preoccupazione per la salute.

Una considerazione analoga può essere fatta anche per gli integratori alimentari, che possono essere assunti continuativamente ma per periodi relativamente brevi (qualche mese, ad esempio in concomitanza con una dieta dimagrante). Anche in questo caso si può considerare la dose acuta di riferimento ARfD per la MC-LR (0,4 µg/kg pc/g, corrispondente a 24 µg al giorno per una persona adulta di 60 kg), con la quale dovrebbero essere confrontati i dati sul contenuto di cianotossina negli integratori, per valutare i rischi di parte della popolazione che per un certo periodo ne abbia fatto uso. Nel *worst case* descritto per l'esposizione cronica (consumo massimo di 20 g giornalieri e livello massimo di contaminazione di 35 µg/g) la dose ingerita (700 µg) risulterebbe quasi 30 volte superiore alla ARfD per un adulto di 60 kg, ponendo un serio rischio per la salute.

Volendo analizzare scenari più realistici, visto che livelli di MC superiori a 10 µg/g sono una eccezione, ma che una buona percentuale (>60%) dei campioni analizzati conteneva livelli superiori a 1 µg/g di peso secco, possiamo assumere 5 µg/g come un livello medio di contaminazione: in questo caso con un consumo di 4 g giornalieri (corrispondenti a 4-8 capsule), comporterebbe una assunzione di MC molto vicina al valore di riferimento della ARfD per cui sarebbe necessario condurre una valutazione del rischio considerando anche le altre possibili fonti di esposizione (dieta, acqua potabile, attività ricreative), che potrebbe portare come rischio cumulativo ad una situazione di preoccupazione per la salute.

A maggior ragione una situazione del genere, porrebbe rischi non trascurabili per la salute dei bambini, in considerazione del loro minore peso corporeo.

## Rischio acuto

La valutazione del rischio acuto può essere condotta considerando che sono disponibili alcuni studi di tossicità acuta i.p. su topo che permettono di stabilire un NOEL acuto, vale a dire una dose alla quale non si osservano effetti di alcun genere, in particolar modo nel fegato, che rappresenta l'organo bersaglio maggiormente sensibile ai danni indotti dalla MC-LR (Fromme *et al.*, 2000; Dietrich & Hoeger, 2005). Tale NOEL si colloca in un intervallo di valori tra 25 e 50 µg/kg p.c. Dagli studi di tossicità acuta per via orale disponibili non è possibile ricavare un NOEL acuto perché alla dose più bassa testata (500 µg/kg p.c.) sono presenti segni di sofferenza epatica. I dati di tossicità acuta per via i.p. possono essere utilizzati per l'estrapolazione alla via orale moltiplicando il valore più basso dell'intervallo (25 µg/kg p.c.) per un fattore 10; si utilizza così un approccio conservativo, visto che i dati sperimentali indicano che le differenze tra le due vie di somministrazione sono più elevate (30-100 volte). Analogamente a quanto descritto per il rischio cronico, per estrapolare il dato ottenuto all'uomo è necessario applicare un fattore di sicurezza pari a 100, che tenga conto della variabilità inter- e intra-specifica: si ottiene un valore di dose acuta senza effetto = 2,5 µg/kg p.c., che per un uomo di 60 kg equivale all'ingestione di 150 µg di MC-LR. Essendo la MC-LR la più tossica tra i vari congeneri, considerare tale valore valido per l'ingestione di MC totali dovrebbe assicurare un adeguato margine di protezione. Tuttavia, in considerazione della ripidezza della curva dose-risposta

osservata è opportuno utilizzare questa soglia soprattutto per promuovere le più adeguate misure per prevenire esposizioni pericolose.

## Acque potabili

Per quanto riguarda le acque potabili, è possibile che vengano raggiunti livelli di esposizione alle cianotossine in grado di dar luogo ad effetti acuti. Questi superamenti sono possibili quando il corpo idrico superficiale utilizzato per l'approvvigionamento idropotabile è interessato da fioriture di cianobatteri o da schiume, che contengono livelli particolarmente elevati di cianotossine, anche di decine di mg/L (Chorus & Bartram, 1999). Se queste acque vengono usate tal quali per scopo potabile, le quantità di cianotossine presenti in un volume d'acqua ridotto, come quello di un comune bicchiere da tavola, possono essere sufficienti per causare effetti di tipo acuto. Nel caso delle MC, in un volume di acqua di 100 mL, il valore di dose acuta (150 µg per un adulto di 60 kg di peso) viene superato a partire da concentrazioni di microcistine di 1,5 mg/L. In relazione alle altre cianotossine, i dati tossicologici disponibili non consentono di derivare valori di sicurezza in relazione ad esposizioni acute. Tuttavia, non sembra improbabile che, analogamente alle MC, elevate densità dei cianobatteri che le producono possano dar luogo ad effetti acuti/a breve termine. Ad esempio, per l'anatossina-a(S) sono stati riportati livelli in Danimarca fino a circa 3,3 mg/g (Henriksen, 1997); per la CYN in Australia sono state rilevate concentrazioni comprese tra 0,2 e 10,1 mg/L, con un valore massimo di 589 mg/L (Sivonen & Jones, 1999).

Ovviamente queste esposizioni si possono verificare soltanto nelle seguenti situazioni: acque grezze non sottoposte a trattamenti di potabilizzazione; avarie al sistema di potabilizzazione; utilizzo di agenti di disinfezione che causano il rilascio di grandi quantità di cianotossine intracellulari non intercettate successivamente. In paesi come il nostro, con conoscenze e tecnologie avanzate nel settore della potabilizzazione delle acque per uso umano, questo rischio dovrebbe essere assai remoto. Infatti, con semplici trattamenti delle acque grezze è possibile ottenere una riduzione anche superiore al 99% del numero di cellule di cianobatteri; con trattamenti specifici è possibile ridurre notevolmente i livelli delle tossine disciolte (Jones & Orr, 1994; Dietrich & Hoeger, 2005).

Per quanto riguarda le cianotossine disciolte in acqua, è improbabile ma non impossibile che siano raggiunte concentrazioni in grado di causare effetti acuti/a breve termine. Le concentrazioni di MC disciolte in acqua risultano, infatti, in genere nettamente inferiori rispetto a quelle intracellulari (van Apeldoorn *et al.*, 2007; Ibelings & Chorus, 2007). Notevoli quantità di MC, come di altre cianotossine, possono tuttavia essere rilasciate a seguito del decadimento di una fioritura/schiuma o al loro trattamento con alghicidi. Questa situazione è circoscritta e le concentrazioni delle cianotossine disciolte diminuiscono in genere rapidamente per i processi di diluizione, adsorbimento ai sedimenti, degradazione, trasporto lungo la catena trofica. In Germania sono stati rilevati livelli di MC disciolte a valori nettamente inferiori rispetto a quelle intracellulari; tuttavia sono stati riportati valori massimi fino ad alcune centinaia di µg/L, con un picco di 1.800 µg/L a seguito del decadimento di un'estesa fioritura (Sivonen & Jones, 1999). A queste concentrazioni le microcistine potrebbero, in effetti, causare effetti acuti. Ma valgono le considerazioni sopra accennate in riferimento alla permanenza di valori così elevati di concentrazione e ai sistemi di potabilizzazione.

Contrariamente alle MC, la CYN disciolta in acqua può essere rilevata a livelli più alti di quella intracellulare. In Germania, questa tossina è stata rilevata in 19 dei 21 laghi analizzati; dei complessivi 115 campioni, la CYN è risultata presente in 45 campioni soltanto nella forma particolata e in 57 sia disciolta in acqua che in forma particolata (Rücker *et al.*, 2007). Sono state riportate concentrazioni di 0,002-0,484 µg/L per la forma particolata e di 0,08-11,75 µg/L

per la forma disciolta. Per la CYN, non sono disponibili dati tossicologici per derivare una dose acuta senza effetto. Tuttavia, le concentrazioni appena riportate non sembrano essere particolarmente elevate, tali da comportare un reale rischio acuto per la popolazione.

Per le altre cianotossine non risultano disponibili dati sulle concentrazioni raggiunte in acqua dalle forme disciolte.

## **Prodotti ittici**

Relativamente alla dieta, il consumo di prodotti ittici costituisce una fonte di esposizione in grado di comportare un possibile rischio acuto. Infatti, nelle viscere di pesci (fegato e intestino) sono stati riportati livelli medi di MC = 13,4 mg/kg, con un valore massimo di 478 mg/kg; nelle parti eduli dei pesci sono stati determinati valori fino a 370 µg /kg (nelle carpe). Assumendo un consumo episodico di 300 g di pesce con questo livello di contaminazione (caso peggiore) si assumerebbe una quantità di MC anche superiore a 100 µg /per una persona adulta. Questa dose è piuttosto vicina alla dose di sicurezza da effetti acuti e richiederebbe un atteggiamento di cautela in considerazione della ripidezza della curva dose/risposta. Questo scenario è assai improbabile, ma poiché è possibile si ritiene necessario che nei corpi idrici interessati da presenza a densità elevate di cianobatteri tossici vengano condotte attività di monitoraggio adeguate per controllare questo tipo di rischio. In relazione al consumo di viscere, visto i livelli più elevati di contaminazione, il rischio di effetti acuti può essere elevato anche con consumi di 100 g. Il consumo di viscere non rientra nelle comuni abitudini alimentari, tuttavia, sulla base dei dati analitici disponibili, potrebbe essere opportuno sconsigliarlo esplicitamente con un'adeguata informazione ai cittadini.

## **Acque di balneazione**

In riferimento alla balneazione, lo svolgimento di attività ricreative in acque infestate da elevate densità di cianobatteri tossici (fioriture o schiume) potrebbe dar luogo ad effetti acuti/a breve termine. In effetti, se si considera che nel corso di una nuotata possono essere ingeriti involontariamente/accidentalmente 100 mL di acqua, in questo volume potrebbero essere presenti dosi in grado di causare effetti acuti. Questo rischio non dovrebbe riguardare le persone adulte, ovviamente non attratte da un corpo idrico interessato dalla presenza di fioriture o schiume, ma non può essere escluso per i bambini. Per questa ragione è importante che in prossimità di corpi idrici dove vengono svolte attività ricreative siano predisposte le più opportune segnalazioni di esposizioni pericolose in situazioni di presenza di elevate densità di cianobatteri.

## **Supplementi alimentari**

Per quanto riguarda i supplementi alimentari a base di cianobatteri, considerando i livelli più elevati di MC riscontrati in questi prodotti e di consumo (rispettivamente di 35 µg/g e 20 g/persona/giorno) risulterebbe un'assunzione in grado di causare effetti acuti (700 µg/persona adulta >> 150 µg). Ovviamente quello stesso livello di contaminazione particolarmente elevato di 35 µg/g, nel caso di un bambino di 30 kg di peso costituirebbe un rischio di danno acuto anche a seguito di un consumo contenuto di BGAS (pari a circa 2 g).

## Bibliografia

- Astrachan NB, Archer BG, Hilbelink DR. Evaluation of the sub-acute toxicity and teratogenicity of anatoxin-a. *Toxicon* 1980;18: 684-8.
- Azevedo SM, Carmichael WW, Jochimsen EM, Rinehart KL, Lau S, Shaw GR, Eaglesham GK. Human intoxication by microcystins during renal dialysis treatment in Caruaru-Brazil. *Toxicology* 2002;181-182:441-6.
- Byth S. Palm Island mystery disease. *Med J Austr* 1980;2:40-2.
- Carmichael WW, Drapeau C, Anderson DM. Harvesting of *Aphanizomenon flos-aquae* Ralfs ex Born. and Flah. var. *flos-aquae* (Cyanobacteria) from Klamath Lake for human dietary use. *J Appl Phycol* 2000;12:585-95.
- Carmichael WW, Jonesm CLA, Mahomood NA, Theiss WC. Algal toxins and water-based diseases. *CRC Crit Rev Environ Cont* 1985;15:275-313.
- Chen J, Song L, Dai J, Gan N, Liu Z. Effects of micricystins on the growth and the activity of superoxide dismutase and peroxidase of rape (*Brassica rapus* L.) and rice (*Oryza sativa* L.) *Toxicon* 2004;43:393-400.
- Chen J, Xie P, Zhang D, Lei H. *In situ* studies on the distribution pattern and dynamics of microcystins in a biomanupaltion fish-bighead carp (*Aristichthys nobilis*). *Environ Pollution* 2007;147:150-7.
- Chorus I, Bartram J (Ed.). *Toxic cyanobacteria in water*. London: E & FN Spon; 1999.
- Codd GA, Metcalf JS, Beattie KA. Retention of *Microcystis aeruginosa* and microcystin by salad lettuce (*Lactuca sativa*) after spray irrigation with water containing cyanobacteria. *Toxicon* 1999;37:1181-6.
- Codd GA, Morrison LF, Metcalf JS. Cyanobacterial toxins: risk management for health protection *Toxicol Appl Pharmacol* 2005;203:264-72.
- Dietrich D, Hoeger S. Guidance values for microcystins in water and cyanobacterial supplement products (blue green algal supplements): a reasonable or misguided approach? *Toxicol Appl Pharmacol* 2005;203:273-89.
- Dietrich DR, Ernst B, Day BW. Human consumer death and algal supplement consumption: a post mortem assessment of potential microcystin-intoxication via microcystin immunoistochemical (MC-ICH) analyses. In: 7<sup>th</sup> *International Conference on Toxic Cyanobacteria (ICTC)*, Brazil, 2007. p. 132.
- Dillenberg HO, Dehnel MK. Toxic waterbloom in Saskatchewan. *Can Med Assoc* 1960;83:1151-4.
- Ding WX, Shen HM, Zhu HG, Lee BL, Ong CN. Genotoxicity of microcystic cyanobacteria extract of a water source in China. *Mutat Re* 1999;442:69-77.
- Duy TN, Lam PKS, Shaw GR, Connell DW. Toxicology and risk assessment of freshwater cyanobacterial (blue-green algal) toxins in water. *Rev Environ Contam Toxicol* 2000;163:113-86.
- El Saadi OE, Esterman AJ, Cameron S, Roder DM. Murray River water, raised cyanobacterial cell counts, and gastrointestinal and dermatological symptoms. *Med J Aust* 1995;162:122-5.
- Falconer IR Effects on human health of some toxic cyanobacteria (blue-green algae) in reservoirs, lakes and rivers. *Tox Assess* 1989;4:175-84.
- Falconer IR, Bartram J, Chorus I, Kuiper-Goodman T, Utkilen H, Burch M, Codd GA. Safe levels and safe practices. In: Chorus I, Bartram J (Ed.). *Toxic cyanobacteria in water*. London: E & FN Spon; 1999b. p. 155-78.
- Falconer IR. Cyanobacterial toxins present in *Mycrocystis aeruginosa* extracts-More than microcystins! *Toxicon* 2007;50:585-8.
- Falconer IR. Health problems from exposure to cyanobacteria and proposed safety guidelines for drinking and recreational water. In: Codd GA, Jefferies TM, Keevil CW, Potter E (Ed.). *Detection Methods for Cyanobacterial Toxin*. London: Royal Society of Chemistry; 1994. p.3-10.

- Falconer IR. Tumor promotion and liver injury caused by oral consumption of cyanobacteria. *J Environ Toxicol Water Qual* 1991;6:177-84.
- Fawell JK. *Toxins from blue-green algae: toxicological assessment of microcystin-LR. Microcystin-LR: 13 week oral (gavage) toxicity study in the mouse (final report)*. Volume 4. Medmenham, UK: Water Research Centre; 1993.
- Fawell JK, Mitchell RE, Everett DJ, Hill RE. The toxicity of cyanobacterial toxins in the mouse: I Microcystin-LR. *Human Exp Toxicol* 1999a;18:162-67.
- Fawell JK, Mitchell RE, Hill RE, Everett DJ. The toxicity of cyanobacterial toxins in the mouse: II Anatoxin-a. *Human Exp Toxicol* 1999b;18:168-73.
- Feitz AJ, Lukondeh T, Moffitt MC, Burns BP, Naido D, Vedova JD, Golden JM, Neilan BA. Absence of detectable levels of cyanobacterial toxin (microcystin-LR) carry-over into milk. *Toxicon* 2002;40:1173-80.
- Fleming LE, Rivero C, Burns J, Williams C, Bean JA, Shea KA, Stinn J. Blue-green algal (Cyanobacterial) toxins, surface drinking water, and liver cancer in Florida. *Harmful Algae* 2002;1:157-68.
- Fleming LE, Rivero C, Burns J, Williams C. *Final Report. Blue green algal exposure, drinking water and colorectal cancer study*. St. Petersburg, Florida: The Florida Harmful Algal Bloom Taskforce; 2001.
- Fromme H, Koehler A, Krause R, Fuehring D. Occurrence of cyanobacterial toxins –microcystins and anatoxin-a – in Berlin water bodies with implications to human health and regulation. *Environ Toxicol* 2000;15:120-30.
- Funari E, Testai E. Cianobatteri nelle acque superficiali: valutazione del rischio sanitario associato alla esposizione alle cianotossine *Notiziario Istituto Superiore di Sanità* 2007;20:11-7.
- Funari E, Testai E. Human health risk assessment related to cyanotoxins exposure. *Critical Rev Toxicol* 2008;38:97-125.
- Gilroy DJ, Kauffman KW, Hall RA, Huang X, Chu FS. Assessing potential health risks from microcystin toxins in bluegreen algae dietary supplements. *Environ Health Perspect* 2000;108:435-9.
- Hawkins PR, Griffiths DJ. Artificial destratification of a small tropical reservoir: effects upon the phytoplankton. *Hydrobiologia* 1993;254:169-81.
- Henriksen P, Carmichael WW, An J, Moestrup O. Detection of an anatoxin-a(s)-like anticholinesterase in natural blooms and cultures of cyanobacteria/blue-green algae from Danish lakes and in the stomach contents of poisoned birds. *Toxicon* 1997;35:901-13.
- Humpage AR, Falconer IR. Oral toxicity of the cyanobacterial toxin cylindrospermopsin in male Swiss Albino mice: determination of No Observed Adverse Effect level for deriving a Drinking Water Guideline Value *Environ Toxicol* 2003;18:94-103.
- Humpage AR, Fontaine F, Froscio S, Burcham P, Falconer IR. Cylindrospermopsin genotoxicity and cytotoxicity: role of cytochrome P450 and oxidative stress. *J Toxicol Environ Health Part A* 2005;68:739-53.
- IARC. Cyanobacterial peptide toxins. In: *Ingested nitrates and nitrites, and cyanobacterial peptide toxins*. Vol. 94. International Agency for Research on Cancer; 2006. Disponibile all'indirizzo: <http://monographs.iarc.fr/ENG/Meetings/94-cyanobacterial.pdf> 2006; ultima consultazione 30/12/2007.
- Ibelings BW, Chorus I. Accumulation of cyanobacterial toxins in freshwater 'seafood' and its consequences for public health: A review. *Environ Pollut* 2007;150:177-92.
- Järvenpää S, Lundberg-Niinistö C, Spoof L, Sjövall O, Tyystjärvi E, Meriluoto J. Effects of microcystins on broccoli and mustard, and analysis of accumulated toxin by liquid chromatography-mass spectrometry. *Toxicon* 2007;49:865-74.

- Jensen GS, Ginsberg DI, Drapeau C. Blue-green algae as an immuno-enhancer and biomodulator. *JAMA* 2001;3:24-30.
- Jochimsen EM, Carmichael WW, An J, Cardo DM, Cookson ST, Holmes CEM, Antunes MBDeC, De Filho MDA, Lyra TM, Barreto VST, Azevedo SMFO, Jarvis WR. Liver failure and death after exposure to Microcystins at a hemodialysis center in Brazil. *N Engl J Med* 1998;338:873-8.
- Jones GJ, Orr PT. Release and degradation of microcystin following algicide treatment of a *Microcystis aeruginosa* bloom in a recreational lake, as determined by HPLC and protein phosphatase inhibition assay. *Water Res* 1994;28:871-6.
- Nishiwaki-Matsushima R, Ohta T, Nishiwaki S. Liver tumor promotion by the cyanobacterial cyclic peptide toxin microcystin-LR. *J Cancer Res Clin Oncol* 1992;118:420-4.
- Orr PT, Jones GJ, Hunter RA, Berger K, De Paoli DA, Orr CLA. Ingestion of toxic *Microcystis aeruginosa* by dairy cattle and the implications for microcystin contamination of milk. *Toxicon* 2001;39:1847-54.
- Ozawa K, Yokoyama A, Ishikawa K, Kumagai M, Watanabe MF, Park HD. Accumulation and depuration of microcystin produced by the cyanobacterium *Microcystis* in a freshwater snail. *Limnology* 2003;4:131-8.
- Philipp R, Bate AJ. Health-risks assessment of dinghy sailing in Avon and exposure to cyanobacteria (blue-green algae). *J Inst Water Environ Management* 1992;6:613-20.
- Philipp R, Brown M, Bell R, Francis F. Health risks associated with recreational exposure to blue-green algae (cyanobacteria) when windsurfing and fishing. *Health Hyg* 1992;13:115-9.
- Pilotto LS, Douglas RM, Burch MD, Cameron S, Beers M, Rouch GJ, Robinson P, Kirk M, Cowie CT, Hardiman S, Moore C, Attewell RG. Health effects of exposure to cyanobacteria (blue-green algae) during recreational water-related activities. *Aust N Z J Public Health* 1997;21:562-6.
- Preussel K, Stuken A, Wiedner C, Chorus I, Fastner J. First report on cylindrospermopsin producing *Aphanizomenon flos-aquae* (Cyanobacteria) isolated from two German lakes. *Toxicon* 2006;47:156-62.
- Rao PVL, Bhattacharya R, Parida MM, Jana AM, Bhaskar ASB. Freshwater cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* (UTEX 2385) induced DNA damage in vivo and in vitro. *Environ Toxicol Pharmacol* 1998;5:1-6.
- Rapala J, Sivonen K, Lyra C, Niemelä SI. Variation of microcystins, cyanobacterial hepatotoxins, in *Anabaena* spp. as a function of growth stimuli. *Appl Environ Microbiol* 1997;64:2206-12.
- Rücker J, Stuken A, Nixdorf B, Fastner J, Chorus I, Wiedner C. Concentrations of particulate and dissolved cylindrospermopsin in 21 *Aphanizomenon* – dominated temperate lakes. *Toxicon* 2007;50:800-9.
- Sekijima M, Tsutsumi T, Yoshida T, Harada T, Tashiro F, Chen G, Yu S, Ueno Y. Enhancement of glutathione S-transferase placental-form positive liver cell foci development by microcystin-LR in aflatoxin B1-initiated rats. *Carcinogenesis* 1999;20:161-5.
- Sivonen K, Jones G. Cyanobacterial toxins. In: Chorus I, Bartram J (Ed.). *Toxic cyanobacteria in water: a guide to their public health consequences, monitoring and management*. London: E & FN Spon; 1999. p. 41-111.
- Stewart I, Webb PM, Schluter PJ, Fleming LE, Burns JW, Gantar M, Backer LC, Shaw GR. Epidemiology of recreational exposure to freshwater cyanobacteria- an international prospective cohort study. *BMC Public Health* 2006b;6:93.
- Stewart I, Webb PM, Schluter PJ, Shaw GR. Cyanobacterial lipopolysaccharides and human health – a review *Environ Health* 2006c;24(5):7.

- Stewart I, Webb PM, Schluter PJ, Shaw GR. Recreational and occupational field exposure to freshwater cyanobacteria – a review of anecdotal and case reports, epidemiological studies and the challenges for epidemiologic assessment. *Environ Health* 2006a;24(5):6.
- Teixera MGLC, Costa MCN, Carvalho VLP, Pereira MS, Hage E. Gastroenteritis epidemic in the area of the Itaparica Dam, Bahia, Brazil *Bull Pan Am Health Organ* 1993;27:244-53.
- Turner PC, Gammie AJ, Hollinrake K, Codd GA. Pneumonia associated with contact with cyanobacteria. *Br Med J* 1990;300:1440-1.
- Ueno Y, Nagata S, Tsutsumi T, Hasegawa A, Watanabe MF, Park HD, Chen GC, Yu SH. Detection of microcystins, a blue-green algal hepatotoxin, in drinking water sampled in Haimen and Fusui, endemic areas of primary liver cancer in China, by highly sensitive immunoassay. *Carcinogenesis* 1996;17:1317-21.
- van Apeldoorn ME, van Egmond HP, Speijers GJA, Bakker GJI. Toxins of cyanobacteria. *Mol Nutr Food Res* 2007;51:7-60.
- Wangth HB, Zhuth HG. Promoting activity of microcystins extracted from waterblooms in SHE cell transformation assay. *Biomed Environ Sci* 1996;9:46-51.
- Wolf HU, Frank C. Toxicity assessment of cyanobacterial toxins mixtures. *Environ Toxicol* 2002;17:395-9.
- Zhan L, Sakamoto H, Sakuraba M, Wu D-S, Zhang L-S, Suzuki T, Hayashi M, Honma M. Genotoxicity of microcystin-LR in human lymphoblastoid TK6 cells. *Mutat Res* 2004;557:1-6.
- Zielberg B. Gastroenteritis in Salisbury European children-a five year study. *Centr Afr J Med* 1996;12:164-8.

## INDIRIZZI INTERNAZIONALI PER LA TUTELA DELLA SALUTE

Enzo Funari, Simona Scardala, Emanuela Testai

*Dipartimento di Ambiente e Connessa Prevenzione Primaria, Istituto Superiore di Sanità, Roma*

Da un punto di vista della protezione della salute delle popolazioni la problematica dei cianobatteri richiede che siano definiti limiti all'interno dei quali l'esposizione alle cianotossine non sia responsabile di effetti dannosi, che siano adeguatamente valutati i livelli di esposizione, che siano avviate le misure per il contenimento dell'esposizione.

Per quanto riguarda la definizione dei limiti, è facile constatare quanto la normativa sui cianobatteri sia carente. Ciò è dovuto certamente al ritardo nelle conoscenze scientifiche disponibili per la valutazione del rischio sanitario. In effetti, fino ad alcuni anni or sono era stata prodotta una considerevole mole di dati su aspetti riguardanti la tassonomia, la chimica, l'ecologia, ecc.; gli studi epidemiologici e tossicologici disponibili erano invece limitati e non offrivano una base scientifica adeguata per definire in modo esauriente i limiti di sicurezza nei confronti dell'esposizione alle cianotossine.

L'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) ha definito una linea guida provvisoria per la qualità dell'acqua potabile di 1 µ/L limitatamente alla microcistina-LR (WHO, 2004). Questo valore può essere esteso all'intera categoria delle microcistine (Chorus & Bartram, 1999; Funari & Testai, 2008) ed è stato utilizzato anche come riferimento per definire i valori di linea guida per le acque di balneazione (WHO, 2003).

Non risulta che siano stati proposti da organizzazioni internazionali limiti protettivi dall'esposizione alle cianotossine con il consumo di alimenti (es. prodotti ittici). Questi limiti sono stati proposti tuttavia in pubblicazioni scientifiche recenti (Ibelings & Chorus, 2007; Funari & Testai, 2008) per alcuni scenari di esposizione alle microcistine a breve e a lungo termine, basati sulla *Tolerable Daily Intake* (TDI) (0,04 µg/kg peso corporeo= 2,4 µg/ persona adulta di 60 kg di peso corporeo= 0,4 µg/bambino di 10 kg di peso corporeo) definita dall'OMS (WHO, 2003).

Alcuni autori (Gilroy *et al.*, 2000) hanno proposto un valore limite provvisorio per gli integratori alimentari a base di cianobatteri di 1 µg microcistine/g di peso secco, ottenuto utilizzando questa TDI.

Come è noto, le linee guida dell'OMS rappresentano concentrazioni protettive per esposizioni croniche. L'OMS non ha definito linee guida per altre cianotossine né limiti protettivi per esposizioni a breve termine. Nel capitolo precedente, facendo riferimento ad alcune pubblicazioni scientifiche degli ultimi anni, sono stati presentati i limiti specifici proposti per la protezione della salute della popolazione da esposizioni acute/subacute e sub-croniche alle microcistine e croniche ad altre cianotossine (Duy *et al.*, 2000; Funari & Testai, 2008; Ibeling & Chorus, 2007; Gilroy *et al.*, 2000).

In conclusione, la maggiore disponibilità di informazioni scientifiche pubblicate negli ultimi anni ha permesso di migliorare nettamente le attività di valutazione del rischio, che possono ora essere utilmente applicate come riferimenti per la protezione della salute delle popolazioni.

Le linee guida dell'OMS rappresentano un importante riferimento a livello internazionale e vengono ampiamente applicate in molti paesi (Chorus, 2005), come riassunto di seguito.

Per quanto riguarda le acque di balneazione, l'Olanda ha definito un livello di allerta di 10µg/L; a 20µg/L viene vietata la balneazione. In presenza di schiume vengono avviate attività

di controllo più intense. In Francia, il Consiglio di Igiene Pubblica ha definito tre livelli di densità di cianobatteri per avviare piani di intervento che possono arrivare anche all'interdizione delle attività ricreative, incluse quelle sportive. Le informazioni sulla conta dei cianobatteri vengono pubblicate su un sito internet entro 5 giorni dal campionamento. In Australia la conta delle densità cellulari viene spesso preferita all'analisi delle tossine poiché risulta più semplice, veloce ed economica. Le *draft Guidelines for managing risks in recreational water* utilizzano tre livelli soglia per la gestione del rischio e valutano la vulnerabilità del corpo idrico alla proliferazione di cianobatteri, utilizzando i dati storici. In Germania la sorveglianza della qualità delle acque di balneazione viene condotta con un approccio a tre stadi. Il primo riguarda l'ispezione visiva e il monitoraggio dei nutrienti per valutare la capacità del corpo idrico di dare origine a fioriture; il secondo prevede l'analisi quantitativa dei cianobatteri quando si verificano fioriture; il terzo livello prevede anche l'analisi quantitativa delle microcistine. È interessante notare che, ovviamente, anche in presenza di fioriture consistenti, se le analisi chimiche rilevano basse concentrazioni di microcistine, non viene vietata la balneazione. In Danimarca, in presenza di fioriture massicce, viene analizzato il materiale organico, valutato il rischio ed eventualmente informata la popolazione con i più opportuni mezzi di comunicazione (cartellonistica, ecc.). In Finlandia le autorità competenti controllano questo problema con particolare attenzione, disponendo di specifiche linee guida già dalla fine degli anni '80. È attualmente attivo un network che vede coinvolti anche i cittadini per le attività di segnalazioni basate sulla sorveglianza visiva.

Per quanto riguarda le acque potabili, per le microcistine, viene fatto riferimento alla linea guida definita dall'OMS per la microcistina-LR (1 µg/L). Sono stati inoltre proposti i seguenti limiti per la tutela da esposizioni a lungo termine: 1 µg/L per la cilindrospermopsina (Humpage & Falconer, 2003; Codd *et al.*, 2005) e 12 µg/L per l'anatossina-a (Duy *et al.*, 2000).

In Brasile, il controllo della qualità delle acque potabili è basato sul monitoraggio dei cianobatteri nelle acque grezze. I controlli vengono intensificati e vengono effettuati test di tossicità e analisi delle tossine quando viene superato il limite di 10.000 cell/mL o 1 mm<sup>3</sup> di biovolume. Per le microcistine, il Brasile ha applicato il valore limite di 1 µg/L senza fare distinzioni tra le varianti, ed ha raccomandato i valori di 3 µg/L per le saxitossine e di 15 µg/L per la cilindrospermopsina. Il Canada ha definito una concentrazione massima accettabile di 1,5 µg/L per la microcistina-LR. In Polonia è previsto un limite per la sola MC-LR di 1 µg/L nelle acque potabili, come nella Repubblica Ceca. In Francia è stato stabilito, con un decreto sulla qualità delle acque potabili, un limite di 1 µg/L per la MC-LR e le analisi vengono richieste quando si verificano nelle acque grezze fenomeni di proliferazione cianobatteriche. Il decreto spagnolo che stabilisce i criteri per le acque potabili include il limite di 1 µg/L per le microcistine in generale. In Germania ed in modo molto simile anche in Finlandia ed in Italia, la linea guida provvisoria dell'OMS per la MC-LR è un riferimento fondamentale per aggiornare l'attuale regolamentazione che prevede che le acque potabili non devono contenere sostanze in concentrazioni tali da rappresentare un rischio per la salute umana. In Ungheria il decreto sulle acque potabili include i cianobatteri tra i parametri biologici da monitorare al microscopio; nessun limite è stato posto per le cianotossine ma solo per il numero di cellule di cianobatteri.

Linee guida di 3 e 1 µg/L di saxitossina-equivalenti vengono applicate rispettivamente in Australia (NHMRC, 2001) e in Nuova Zelanda (Orr *et al.*, 2004). Inoltre la Nuova Zelanda ha stabilito un limite di 6 µg/L per le anatossine totali e l'Australia di 3 µg/L per l'anatossina-a (Chorus, 2005).

## Acque di balneazione in Europa

Nel 2006 è stata pubblicata la nuova direttiva europea sulle acque di balneazione (Direttiva 2006/7/CE), che valuta e classifica queste acque sulla base delle densità di due parametri microbiologici. Questa direttiva, tuttavia, non ignora affatto la problematica dei cianobatteri e del rischio ad essi associato attraverso le attività di balneazione. La direttiva riconosce l'importanza di questa problematica e richiede, nell'articolo 8 riportato di seguito, che vengano intraprese le misure più opportune per prevenire esposizioni pericolose.

### Articolo 8

#### Rischi da cianobatteri

1. Qualora il profilo delle acque di balneazione indichi un potenziale di proliferazione cianobatterica, viene effettuato un monitoraggio adeguato per consentire un'individuazione tempestiva dei rischi per la salute.
2. Qualora si verifichi una proliferazione cianobatterica e si individui o si presuma un rischio per la salute, vengono adottate immediatamente misure di gestione adeguate per prevenire l'esposizione, che includano l'informazione al pubblico.

Per proliferazione cianobatterica si intende "un accumulo di cianobatteri sotto forma di fioritura, stratificazione o schiuma.

La previsione di una situazione di rischio inaccettabile è uno degli aspetti più importanti ed innovativi della nuova direttiva, che supera ed integra le canoniche attività di monitoraggio, permettendo di promuovere le necessarie attività di prevenzione.

Ovviamente, la gestione del rischio dovuto alla presenza di cianobatteri nelle acque di balneazione richiede una conoscenza adeguata della problematica e la capacità di prevedere, allo scopo di avviare le più opportune attività di prevenzione, situazioni tali da rappresentare un rischio significativo per i bagnanti.

## Situazione italiana

In attesa del prossimo recepimento della nuova direttiva europea, la qualità delle acque di balneazione in Italia è normata dal DPR 470/82, attuazione della Direttiva 76/160/CEE. Tale DPR stabilisce limiti per una serie di parametri microbiologici, fisici e chimici ma non prevede un controllo costante delle specie algali potenzialmente tossiche. Tale monitoraggio viene richiesto solo qualora vi sia un superamento dei limiti consentiti del parametro "ossigeno disciolto". Questo parametro viene considerato, nella normativa vigente, come indicatore di possibili proliferazioni algali. Nell'eventualità di superamenti dei valori stabiliti per questo parametro, è prevista la conduzione di programmi di sorveglianza algale.

Il Ministero della Salute, con le circolari 9/4/98 e 31/07/98, ha definito una lista di specie algali tossiche note e suggerito una serie di metodiche analitiche per dosarne le tossine. Nella seconda circolare "si consiglia una soglia di 5.000 cell/mL per interdire totalmente la balneazione in acque con fioriture algali di cianoficee in atto: oltre questo livello si configura il rischio inaccettabile".

I contenuti di questo consiglio sono completamente superati da quanto sopra presentato.

Il DL.vo 31/2001 in attuazione della direttiva 98/83/CE, relativa alla qualità delle acque destinate al consumo umano, include le alghe tra i parametri accessori. Tale inclusione comporta che le autorità competenti, quando ritengono che possa esservi un potenziale pericolo per la salute umana, dovrebbero avviare le indagini più appropriate per prevenire esposizioni

pericolose per la popolazione. Nel decreto non viene pertanto stabilito alcun limite di concentrazione massima per le cianotossine.

## Bibliografia

- Chorus I. *Current approaches to cyanotoxin risk assessment, risk management and regulations in different countries*. Dessau: Federal Environment Agency; 2005. (WaBaLu 02/05).
- Chorus I, Bartram J (Ed.). *Toxic cyanobacteria in water*. London: E & FN Spon; 1999.
- Codd GA, Morrison LF, Metcalf JS. Cyanobacterial toxins: risk management for health protection *Toxicol Appl Pharmacol* 2005;203:264-72.
- Duy TN, Lam PKS, Shaw GR, Connell DW. Toxicology and risk assessment of freshwater cyanobacterial (blue-green algal) toxins in water. *Rev Environ Contam Toxicol* 2000;163:113-86.
- Funari E, Testai E. Human health risk assessment related to cyanotoxins exposure. *Critical Rev Toxicol* 2008;38:97-125.
- Gilroy DJ, Kauffman KW, Hall RA, Huang X, Chu FS. Assessing potential health risks from microcystin toxins in bluegreen algae dietary supplements. *Environ Health Perspect* 2000;108:435-9.
- Humpage AR, Falconer IR. Oral toxicity of the cyanobacterial toxin cylindrospermopsin in male Swiss Albino mice: determination of No Observed Adverse Effect Level for deriving a drinking water guideline value. *Environ Toxicol* 2003;18:94-103.
- Ibelings BW, Chorus I. Accumulation of cyanobacterial toxins in freshwater 'seafood' and its consequences for public health: A review. *Environ Pollut* 2007;150:177-92.
- WHO. *Guidelines for safe recreational Water Environment*. Volume 1. Coastal and fresh waters. Geneva: World Health Organization; 2003.
- WHO. *Guidelines for drinking-water quality*. 3<sup>rd</sup> Edition. Volume 1. Recommendations. Geneva: World Health Organization; 2004.

*La riproduzione parziale o totale dei Rapporti e Congressi ISTISAN  
deve essere preventivamente autorizzata.  
Le richieste possono essere inviate a: [pubblicazioni@iss.it](mailto:pubblicazioni@iss.it).*

*Stampato da Litografia Chicca di Fausto Chicca  
Via di Villa Braschi 143, 00019 Tivoli (Roma)*

*Roma, gennaio-marzo 2008 (n. 1) 7° Suppl.*