

ISTITUTO SUPERIORE DI SANITÀ

**L'eutrofizzazione tossica in un complesso artificiale
multilacuale: i laghi del Fiastrone (1998-2007)**

Milena Bruno (a), Fabiola Serenelli (b), Romano Germozzi (b),
Vincenzina Scagnetti (b), Tristano Leoni (b), Beatrice Antonelli (c),
Serena Melchiorre (a), Valentina Messineo (a)

*(a) Dipartimento di Ambiente e Prevenzione Primaria, Istituto Superiore di Sanità, Roma
(b) Dipartimento di Macerata, ARPA Marche, Macerata
(c) Provincia di Macerata*

ISSN 1123-3117

Rapporti ISTISAN
09/21

Istituto Superiore di Sanità

L'eutrofizzazione tossica in un complesso artificiale multilacuale: i laghi del Fiastrone (1998-2007).

Milena Bruno, Fabiola Serenelli, Romano Gerozzzi, Vincenzina Scagnetti, Tristano Leoni, Beatrice Antonelli, Serena Melchiorre, Valentina Messineo
2009, 31 p. Rapporti ISTISAN 09/21

In Italia ogni anno gli invasi di diciannove regioni su venti sono interessati da fioriture di Cianobatteri tossici con produzione di biotossine epatossiche o neurotossiche di cui le più frequentemente riscontrate, le microcistine, sono a tutti gli effetti nuove sostanze di rischio oncogeno da seguire nel "destino" ambientale e in tutti i passaggi della catena alimentare. A causa dei fenomeni eutrofici tossici che si manifestarono in uno dei maggiori complessi di questi laghi, il Fiastrone-Chienti a sud di Macerata, gruppi di ricerca dell'Istituto Superiore di Sanità e dell'Arpam Dipartimento di Macerata instaurarono una collaborazione durata più di dieci anni (1997-2007) per lo studio del fenomeno e delle possibilità di risanamento dei corpi idrici coinvolti. Lo studio ha rivelato un'elevata alterazione degli equilibri lacustri con conseguenti periodiche ed estese fioriture di *Planktothrix rubescens* produttrici microcistine, che oltre ad interdire le acque agli usi umani contaminavano specie ittiche pregiate dei laghi Fiastrone e Le Grazie.

Parole chiave: Laghi, Fiastrone, Microcistine, *Planktothrix rubescens*, Pesci

Istituto Superiore di Sanità

Toxic eutrophication in a reservoir complex: the Fiastrone lakes (1998-2007).

Milena Bruno, Fabiola Serenelli, Romano Gerozzzi, Vincenzina Scagnetti, Tristano Leoni, Beatrice Antonelli, Serena Melchiorre, Valentina Messineo
2009, 31 p. Rapporti ISTISAN 09/21

In Italy the water bodies of nineteen out of twenty regions are interested by blooms of toxic Cyanobacteria with production of hepatotoxic or neurotoxic biotoxins. The most frequently detected, the microcystins, are overall new compounds of oncogenic risk needing to be followed in their environmental routes and in the food web. After several phenomena of toxic eutrophy occurred in one of the widest lake complexes, the Fiastrone-Chienti lakes, South of Macerata, research groups of the Istituto Superiore di Sanità and the Regional Agency of Environment Protection of Marche region realized a joint research for more than ten years (1997-2007) to study the toxic occurrences and the possibilities of water body restoration. Alterations in the lacustrine balance with periodic large and long lasting *Planktothrix rubescens* blooms microcystin producers were detected, possibly causing bannings for human uses. Ichthyic contaminations in valuable species of Fiastrone and Le Grazie lakes were also detected.

Key words: Lakes, Fiastrone, Microcystins, *Planktothrix rubescens*, Fish

Per informazioni su questo documento scrivere a: mbruno@iss.it.

Il rapporto è accessibile online dal sito di questo Istituto: www.iss.it.

Citare questo documento come segue:

Bruno M, Serenelli F, Gerozzzi R, Scagnetti V, Leoni T, Antonelli B, Melchiorre S, Messineo V. *L'eutrofizzazione tossica in un complesso artificiale multilacuale: i laghi del Fiastrone (1998-2007)*. Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2009. (Rapporti ISTISAN 09/21).

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 2009

INDICE

Introduzione	1
Caratteristiche delle microcistine	2
Il bacino del Fiastrone	6
Caratteristiche generali del luogo di studio.....	6
Contaminazioni trofiche al momento dello studio.....	8
Metodologia dell'indagine.....	9
Prelevamento campioni	9
Analisi quali- quantitativa del fitoplancton	10
Analisi tossicologiche.....	10
Risultati ottenuti.....	12
Lago Fiastrone.....	12
Lago Borgiano.....	16
Lago Le Grazie.....	17
Lago Polverina	19
Definizione di un protocollo tecnico gestionale.....	21
Ambito territoriale di riferimento	22
Attività gestionali adottate.....	22
Discussione dei risultati e conclusioni valutative	23
Bibliografia	28

INTRODUZIONE

I bacini d'acqua dolce rappresentano una delle risorse più importanti per la vita dell'uomo, non solo per tutte le attività che vi ruotano intorno ma anche perché sono fonti idriche di riserva utilizzabili direttamente.

Per il costante aumento del processo di industrializzazione e per l'incremento delle attività agricole in Italia questi bacini sono andati generalmente incontro ad un processo di "eutrofizzazione", ovvero un aumento di sostanze inorganiche caratterizzate da azoto e fosforo sotto forma di nitrati, nitriti, ammonio e fosfati inorganici. Questa eccessiva "fertilizzazione" ha portato negli ultimi anni all'aumento della presenza di organismi come le alghe, che quando si moltiplicano oltre certi livelli danno luogo al fenomeno definito fioritura (o "bloom") algale. Nei bacini idrici maggiormente eutrofizzati dove l'ambiente acquatico è più degradato, prendono spesso il sopravvento specie "di frontiera", capaci di produrre sostanze altamente tossiche che vengono utilizzate nell'azione allelopatica o per la protezione dai predatori.

Nel mondo è stato registrato un aumento nella frequenza di fioriture tossiche dal 1970 in poi, aumento dovuto anche alle rilevazioni più accurate e alla maggiore attenzione scientifica per le specie tossiche, capaci di causare concentrazione di tossine nella fauna ittica con arrivo fino all'uomo attraverso la catena alimentare (Christoffersen, 1996).

Le fioriture algali in condizioni eutrofiche sono composizioni fitoplanctoniche in cui una o due specie rappresentano l'80-90% del totale, raggiungendo dimensioni tali da essere percepite anche ad occhio nudo, formando sulla superficie dell'acqua dei veri e propri tappeti dello spessore anche di 3-5 cm, e costituendo una situazione patologica per l'ambiente.

La formazione del "bloom" è determinata da una combinazione di fattori come la presenza di una certa quantità di cellule che iniziano la replicazione in concentrazioni adeguate di nutrienti, alta intensità di luce, bassa torbidità e acque lievemente alcaline.

Le fioriture di alghe tossiche procariotiche appartenenti al phylum dei Cianobatteri, nelle acque dolci destinate al consumo umano stanno diventando un problema crescente in tutto il mondo, anche a causa della condizione di riscaldamento globale che aiuta la concentrazione dei nutrienti negli invasi sfruttati e non ricaricati dalle diminuite precipitazioni.

Le fioriture di specie come *Microcystis aeruginosa*, *Planktothrix rubescens*, *Anabaena flos-aquae* e altri Cianobatteri, produttori di microcistine, sono segnalate da decenni in tutto il mondo con frequenze alte in Stati come gli USA, l'Australia, il Giappone e il Sud Africa.

In Italia esse ormai riguardano ogni anno gli invasi di diciannove regioni su venti e le tossine più frequentemente riscontrate, le microcistine, sono a tutti gli effetti nuove sostanze di rischio oncogeno da seguire nel loro "destino" ambientale e in tutti i passaggi della catena alimentare.

Tra le diverse zone interessate, rilevante per ampiezza, numero di laghi coinvolti e completezza degli usi umani serviti è il complesso dei laghi del Fiastrone-Chienti a sud di Macerata, che ormai da più anni presentano imponenti fioriture del cianobatterio tossico *Planktothrix rubescens* (Komarek Anagnostidis). Questo cianobatterio d'acqua dolce produce microcistine e in condizioni di fioritura determina il colore rosso e l'aspetto torbido delle acque.

CARATTERISTICHE DELLE MICROCISTINE

Le microcistine sono una famiglia di più di 90 composti tossici inibenti le proteinfosfatasi serina-treonina 1, 2a e 3 (Welker and Von Döhren, 2006), prodotte da molte specie di cianobatteri (Chorus and Bartram, 1999), conosciute per essere epatotossiche (Codd, 1995; Dawson, 1998), promotrici tumorali (Nishiwaki-Matsushima, 1992) e probabilmente cancerogene per l'uomo (Grosse, 2006).

Negli animali si attiva un meccanismo di trasporto delle microcistine via acidi biliari che convoglia le tossine primariamente nel fegato, ma anche nei muscoli e in tutti gli altri organi e tessuti (Bischoff, 2001); nelle piante l'idrosolubilità delle microcistine fa sì che sia l'acqua a veicolarle agevolmente alle cellule.

Seri casi di intossicazioni acute umane da microcistine sono stati segnalati (Falconer, 1983; Harada and Teuji, 1998), ma anche decine di morti umane causate da intossicazioni acute per queste sostanze sono state segnalate in Brasile nel 1988 nello stato di Bahia, dove si produssero 2.000 casi di gastroenterite di cui 88 fatali in un periodo di 42 giorni, dovuti al consumo di acqua potabile resa eutrofica e contaminata da microcistine a seguito dell'inondazione provocata dalla grande diga di Itaparica (Texeira da Gloria Lima Crux, 1993), e nel 1996 nella cittadina di Caruaru, stato del Pernambuco, dove di 126 pazienti intossicati attraverso emodialisi utilizzando acqua di un vaso contaminato con microcistine, 60 decedettero entro un periodo di 5 mesi (Pouria, 1998). I pazienti presentavano un tasso di microcistine nel siero di 0,001-0,010 µg/mL (1-10 µg/L). Analoga contaminazione, fortunatamente diagnosticata in tempo, fu riscontrata nel 2001-2002 nei pazienti di quattro ospedali in Rio de Janeiro (Soares, 2006).

Poiché si pensa che le proteinfosfatasi possano invertire l'azione della protein chinasi C, la loro inibizione si traduce nell'attivazione di una serie di processi metabolici che hanno risvolti acuti, riguardanti tra l'altro la disgregazione delle membrane citoplasmatiche, e cronici, riguardanti l'attivazione di oncogeni che innescano tumori gastrointestinali ed epiteliali. Le microcistine promuovono negli animali tumori epiteliali (Falconer and Buchley, 1989), epatici (Nishiwaki-Matsushima, 1992) e del colon (Humpage, 2000). Indagini epidemiologiche condotte nei distretti cinesi di Qi-Dong ed Haimen hanno dimostrato la relazione tra incidenza di tumore epatico primario e consumo di acque potabili contaminate da microcistine. Il limite di sicurezza suggerito in questi studi da Ueno *et al.* (1996) per il rischio cronico (tumore epatico primario) da assunzione per lunghi periodi, è di 0,01 µg/L di microcistine. Recenti indagini epidemiologiche condotte sempre in Cina, nel distretto della città di Haining, hanno dimostrato la stretta correlazione tra consumo di acque contaminate da microcistine e tumore del retto-colon nell'uomo (Zhou, 2002). In questo studio, però, non sono stati indicati limiti di sicurezza.

Nello stesso periodo, in uno studio effettuato in Florida sono emerse indicazioni di un'associazione tra consumo di acqua potabile proveniente da invasi superficiali contaminati da microcistine e diffusione del tumore epatico primario; gli stessi autori rivendicano però la necessità di studi più approfonditi su questi dati di carattere preliminare (Fleming, 2002).

Dati sperimentali *in vitro* hanno evidenziato il loro ruolo di interferenza nella produzione di vari ormoni nel ratto: cellule di pancreas, incubate con microcistina-LR, raddoppiano il rilascio basale di insulina e innalzano il livello di Ca₂₊ citosolico (Leiers, 2000); le microcistine dereprimono la sintesi ed escrezione del progesterone nel corpo luteo (Ford, 1996), e deprimono la formazione dell'aldosterone nelle cellule della zona glomerulosa della cortex (Sayed, 1997). Nei reticolociti di coniglio inibiscono l'assunzione di ferro (Rojas, 1990).

Oltre a causare l'apoptosi in una quantità di cellule animali e umane (Mc Dermott, 1998), come ad esempio i linfociti umani (Mankiewicz, 2001), nei leucociti polimorfonucleati di uomo

esse causano l'aumento fino al 28% dell'aderenza precoce spontanea deprimendo l'attività immunitaria: le dosi attive (10 –11 M), paragonabili a quelle di alcuni ormoni umani (neuropeptidi), sono molto al di sotto dei limiti di sicurezza raccomandati dall'OMS (10-9 M), e simili invece ai limiti indicati per evitare il rischio cronico tumorale (Hernandez, 2000). Queste due ultime evidenze sperimentali suggeriscono come conseguenza la necessità di considerare in una popolazione esposta la morbilità complessiva piuttosto che la specifica incidenza tumorale, dato il ruolo immunodepressivo rilevato.

Le microcistine inattivano l'aggregazione piastrinica nelle piastrine umane (Babinska, 1996).

Il meccanismo di detossificazione delle microcistine è identico in tutti i viventi ma dipende per la rapidità dalle diversità specie-specifiche, e passa come primo stadio per la coniugazione con la glutatione-S-transferasi (Cazenave, 2006).

Le microcistine possono essere accumulate in crostacei dello zooplancton (*Daphnia parvula*, 1,78 mg di tossine/25 dafnidi) (Mohamed, 2001), in molluschi d'acqua dolce (*Anodonta wodiana*, *Unio douglasia* e *Cristaria plicata*, 1-5 mg/mollusco) (Watanabe, 1997), e in molluschi marini allevati alla foce di fiumi eutrofizzati (*Mitilus galloprovincialis*, fino a 10,5 mg di microcistina/g di mollusco) (Vasconcelos, 1995). Il tempo di depurazione per questi è attestato intorno ad 11 giorni, con la tossina localizzata primariamente nel tratto digestivo.

Episodi di morie ittiche su larga scala sono stati associati a presenze massicce di cianobatteri nei corpi d'acqua (Zimba, 2001; Jewel, 2003). Studi sulle contaminazioni ittiche hanno dimostrato sensibilità specie-specifica alle microcistine come risultato di differenze anatomiche, fisiologiche e comportamentali tra i vari ordini ittici (Tencalla e Dietrich, 1997; Fischer e Dietrich, 2000); l'assunzione di queste cianotossine è derivata primariamente dall'ingestione orale, e in modo minore dall'assorbimento tramite epitelio branchiale (Ernst, 2006). Le microcistine influenzano lo sviluppo, il comportamento e la vitalità degli stadi giovanili nei crostacei zooplanctonici e nei pesci (Baganz, 2004; Malbrouck and Kestermont, 2006), questi ultimi due effetti dovuti probabilmente all'abilità delle tossine di attraversare la barriera ematoencefalica, trasportate da polipeptidi che portano gli anioni (Fischer, 2005; Cazenave, 2006).

Le microcistine possono concentrarsi in diversi tessuti ittici (Xie, 2005): patologie epatiche, renali e branchiali sono riscontrate in pesci esposti, a causa dell'inibizione delle protein fosfatasi e di altri effetti a cascata come l'aumento dei valori degli enzimi epatici nel siero.

La tossicità negli stadi adulti dei pesci dipende dall'equilibrio tra accumulazione e metabolismo (Ito, 2002) e si esplica tramite intossicazione epatica e danneggiamento dei meccanismi di trasporto delle cellule branchiali, in particolare delle pompe di membrana Na⁺/K⁺ e Mg²⁺/HCO³⁻. Quest'ultimo dato, confermato sia per le carpe (*Ciprinus carpio*) (Zambrano e Canelo, 1996) che per la tilapia (*Oreochromis mossambicus*) (Bury, 1996) porta come conseguenza la morte non solo per intossicazione epatica, ma anche per asfissia da distruzione del tessuto respiratorio branchiale. Morie di pesci causate direttamente da esposizione a microcistine sono state documentate un po' ovunque; tra le ultime di notevole entità quelle dei salmoni (*Salmo salar*) allevati in Norvegia (malattia dei netpens, Williams, 1997) e dei pescigatto (*Ictalurus punctatus*) allevati negli USA (Zimba, 2001). Nei pesci la concentrazione primaria avviene nel tessuto epatico, e in misura minore nel tessuto muscolare.

Lo studio recente più interessante su questo aspetto è quello di Freitas de Magalhaes (2001), che in tre anni di osservazioni e analisi su campo compiute su *Tilapia rendalli* durante ricorrenti fioriture di *Microcystis aeruginosa*, riscontrò una concentrazione di microcistine nel muscolo vicina o superiore al limite proposto dall'OMS per il consumo umano (0,04 µg/kg al giorno per un adulto sano di 60 kg, WHO, 2004). In particolare, per fioriture di 100 milioni di cellule/L, la rilevazione di microcistine negli organi interni e nei muscoli dei pesci era stata contemporanea all'insorgere della fioritura. Solo il 24% della tossina assorbita è estraibile con metanolo, il resto si lega covalentemente e questo rende difficile la valutazione del reale assorbimento avvenuto.

Tuttavia, in trenta giorni si valuta la disintossicazione dei pesci in misura del 48% della microcistina ingerita, per eliminazione attraverso le feci. In passato il rischio dei consumatori umani di pesce eviscerato era tradizionalmente considerato basso, perché si pensava che le microcistine si accumulassero principalmente nel tessuto epatico.

Studi recenti, tuttavia, hanno rilevato concentrazioni di microcistine di 337,3 µg/kg (*Tilapia rendalli*, Magalhaes, 2001), 102 µg/kg (*Oreochromis niloticus*, Mohamed, 2003), 96,5 µg/kg (*Hypophthalmichthys molitrix*, Chen, 2006) e 28 µg/kg (*Oncorhynchus mykiss*, Wood, 2006) nel tessuto muscolare di pesce selvatico o allevato, indicando che anche il consumo di tessuto muscolare poteva costituire una minaccia per la salute umana.

Il metodo di cottura al forno è stato provato causare in media la maggior diminuzione del peso (43%) rispetto alla cottura in umido (16,3%) e alla cottura in sugo di pomodoro (31%), ma in cambio non ha causato nessuna degradazione delle tossine, risultando in una effettiva concentrazione nelle portate di tranci di pesce (28%) (una pubblicazione è in preparazione su questi e altri dati).

Il bersaglio biochimico primario delle microcistine fa sì che nessun organismo sia immune dal loro effetto tossico. Le microcistine danneggiano le piante acquatiche (*Spirodela oligorrhiza*, Romanowska-Duda e Tarczynska, 2002; *Ceratophyllum demersum*, Pflugmacher, 1999) e le piante superiori (*Lemna minor*, Weiss, 2000; *Arabidopsis thaliana*, Smith, 1994; *Ipomoea batata* e *Nicotiana tabacum*, Takeda, 1994; *Oryza sativa*, Ming-Yong e Hung-tu, 1994; *Sinapsis alba*, Kurki-Helasma e Meriluoto, 1998); in *Phaseolus vulgaris* inibiscono la fotosintesi nelle foglie danneggiando l'apparato fotosintetico già a basse dosi (10-1-10-2 mol/m³; Abe, 1996) e limitando la crescita delle radici del 30%, mentre concentrazioni tra 5 e 50 ng/cm³ inibiscono la crescita e la fotosintesi in *Solanum tuberosum* (McElhiney, 2001). Dopo tre giorni di esposizione alla tossina i tuberi erano già positivi al test monoclonale ELISA, avendo ritenuto il 96% della tossina somministrata. Le microcistine sono state ritrovate anche su colture di *Lactuca sativa* irrigate da riserve idriche durante una fioritura algale (Codd, 1999). In questo caso è stata osservata la capacità delle colonie di *Microcystis aeruginosa* di fissarsi alla superficie foliare e rimanervi adese anche dopo ripetuti lavaggi.

Non esistono limiti di sicurezza formulati per l'irrigazione, poiché non è valutabile la quantità di biomassa algale che può essere sparsa con gli irrigatori.

La membrana esterna delle cellule dei Cianobatteri è composta da lipopolisaccaridi che di per sé possono causare dermatiti e allergia respiratoria (Soong, 1992); questi effetti possono sommarsi a quelli per inalazione da microcistine (Fitzgeorge, 1994), possibili respirando l'aerosol che si forma sulle fioriture (Turner, 1990; WHO, 1999, Codd, 1999).

I limiti di sicurezza proposti per gli effetti patogeni indotti dall'esposizione a fioriture di Cianobatteri durante le attività sportive e ricreative sono trattati nello studio di Pilotto *et al.* (1997), dove viene proposto il limite di 5.000 cellule/mL. Il limite di sicurezza di 0,84 µg/L per l'ingestione di microcistina-LR da acque, trattato nel lavoro di Falconer *et al.* (1994), arrotondato ad 1 µg/L venne proposto dall'OMS (1999) come valore guida provvisorio (calcolato da 0,04 µg/kg per un adulto sano di 60 kg di peso).

L'incrocio tra la soglia numerica delle cellule totali di Cianobatteri presenti e la teorica quantità di microcistina da queste contenuta consentiva di tutelare i bagnanti sia dagli effetti dermosensibilizzanti causati dai lipopolisaccaridi di membrana dei Cianobatteri in genere (Pilotto, 1997), che dagli effetti tossici per ingestione e inalazione (Fitzgeorge, 1994; Falconer, 1994) propri delle microcistine.

Per questo motivo, quando la densità del cianobatterio supera il valore limite soglia di 5.000.000 cellule/litro (corrispondente alla quantità teorica di microcistine totali di 0,84 µg/L), come fissato dall'allegato tecnico alla legge italiana sulla balneazione 271/1988 (Circolare Min. San. IX.400.4/13.1/3/144 del 31 luglio 1998), l'acqua viene considerata un rischio per la salute

pubblica e viene interdetta da tutte le ARPA nazionali alla balneazione. Data la attualità delle ricerche menzionate, la raccolta della casistica sui danni all'uomo è appena iniziata.

La storia dell'attuale studio inizia il 5 novembre del 1997, quando venne notata per la prima volta una cospicua colorazione rossa sulla superficie del lago Fiastrone.

Tecnici dell'Arpam di Macerata, esaminati in tempo reale i prelievi subito raccolti, identificarono una fioritura del cianobatterio *Planktothrix rubescens*, noto per produrre tossine della classe delle microcistine. La fioritura, persistente per diversi mesi, contaminò gli altri laghi del complesso e minacciò di arrivare alla presa del potabilizzatore dell'acquedotto di Tolentino, nel lago Le Grazie. In riferimento ai fenomeni eutrofici tossici che si manifestarono nei laghi di Fiastrone, Borgiano e Le Grazie, gruppi di ricerca dell'Istituto Superiore di Sanità e dell'Arpam Dipartimento di Macerata instaurarono una collaborazione di indagine durata più di dieci anni (1997-2007) per lo studio del fenomeno e delle possibilità di risanamento dei corpi idrici coinvolti.

IL BACINO DEL FIASTRONE

Caratteristiche generali del luogo di studio

Il bacino idrografico del lago Fiastrone ha un'estensione di 8800 ettari ed è compreso all'interno del Parco Nazionale dei Monti Sibillini. In esso sono insediati 29 nuclei edificati che formano i comuni amministrativi di Fiastra, Acquacanina e Bolognola (Figura 1).

Il comune di Fiastra su una superficie di 3643 ettari possiede 17 nuclei abitativi ricadenti nel bacino idrografico; la popolazione residente stabile è di circa 600 abitanti che nel periodo estivo raggiungono circa 2600 presenze totali. L'altitudine media del territorio è di 783 metri slm.

Il comune di Acquacanina possiede un'estensione di 2671 ettari, comprende 9 nuclei abitativi, la popolazione residente stabile è di 122 abitanti a cui si aggiungono circa 400 residenti temporanei nella stagione estiva.

L'altitudine media del territorio è di 740 metri slm.

Il comune di Bolognola su una superficie di 2486 ettari possiede 3 nuclei abitati ricadenti nel bacino idrografico con una popolazione residente di circa 160 abitanti, ai quali si aggiungono circa 500 abitanti temporanei durante il mese di agosto.

L'altitudine media del territorio è di 1070 metri slm.

Il torrente Fiastrone e i suoi affluenti come Fosso dell'Acquasanta, Rio Sacro, Fosso Trocca e i fossi che alimentano direttamente il lago come Rio Bagno, Fosso del Colle e Fosso Rio, hanno un aspetto proprio dei torrenti di montagna, a portamento lineare con assenza di meandri, elevata pendenza e forte capacità erosiva.



Figura 1. Dislocazione geografica dei quattro laghi studiati

Il lago del Fiastrone è un invaso artificiale costruito nell'anno 1952, con una capacità di 20,4 milioni di m³, una profondità massima di 78,5 m e una superficie di 1 km². La sua diga del tipo ad arco-gravità è alta 87 m e sviluppa una larghezza di 250 metri. Esso rappresenta il più grande serbatoio per uso idroelettrico della regione Marche; nonostante ciò è un lago di montagna con spiccate caratteristiche di seminaturalità e con una notevole valenza turistica.

Attraverso il torrente Fiastrone confluiscono nel lago le acque trattate e non trattate dei collettori di scarico dei comuni di Bolognola e Acquacanina, e direttamente vi si immettono le acque in uscita del depuratore comunale e la maggioranza dei reflui non trattati del comune di Fiastra.

Dal lago Fiastrone la maggior parte delle acque, attraverso una galleria in pressione lunga 8800 m e una condotta forzata di 650 m, viene captata per la produzione di energia elettrica nella centrale idroelettrica di Valcimarra, mentre la restante parte segue il percorso naturale per raggiungere il fiume Chienti (Figura 2).

Alla centrale idroelettrica di Valcimarra giungono anche le acque del serbatoio artificiale denominato lago di Polverina, situato lungo l'asta fluviale del fiume Chienti.

Il lago di Polverina, ultimato nel 1967, è anch'esso di sbarramento con diga di contenimento non in cemento ma in terra, e nucleo centrale impermeabile. Alla massima quota ha un volume di contenimento di 5,8 milioni di m³, una profondità massima di 23 m e una superficie di circa 0,75 km². La presenza del lago ha ridefinito un nuovo ecosistema naturale ora riconosciuto come Oasi di Polverina.

All'uscita della centrale idroelettrica le acque vengono convogliate nel fiume Chienti, per poi racchiuderle in un ulteriore serbatoio idroelettrico denominato lago di Borgiano o di Caccamo, 4,5 milioni di m³ e profondità massima di 24,9 m anch'esso situato lungo il percorso del fiume.

Anche le acque del Borgiano vengono captate per la produzione di energia elettrica e convogliate in un altro serbatoio del fiume Chienti: il lago delle Grazie, con un volume di 2 milioni di m³, non molto profondo e con superficie di 34 ettari, le cui acque vengono utilizzate per scopo idropotabile e potabilizzate da un impianto in grado di erogare una portata massima di 50 L/s alla rete acquedottistica del comune di Tolentino. La zona umida formata dal lago delle Grazie ha raggiunto anch'essa una notevole valenza naturalistica: per le numerose specie di uccelli di palude e per la puzzola, mammifero raro, la zona ha avuto il riconoscimento di Oasi di Protezione della Fauna.

L'acquedotto di Tolentino, che ha un fabbisogno pari ad una portata continuativa di circa 75 L/s, riceve inoltre l'alimentazione dalla sorgente di Valcimarra, con portate variabili nel corso dell'anno da un minimo di 15 L/s ad un massimo di 80 L/s, e dal campo pozzi di Pianbianchi, con una portata media di 10 L/s.

Da ciò deriva che, nel corso dell'anno, in funzione della portata affluente dalla sorgente di Valcimarra, che presenta le minime portate nel periodo ottobre-gennaio, venga derivata una portata maggiore o minore dall'impianto di potabilizzazione.

Generalmente le acque del lago Le Grazie servono un massimo di 12.000 abitanti.

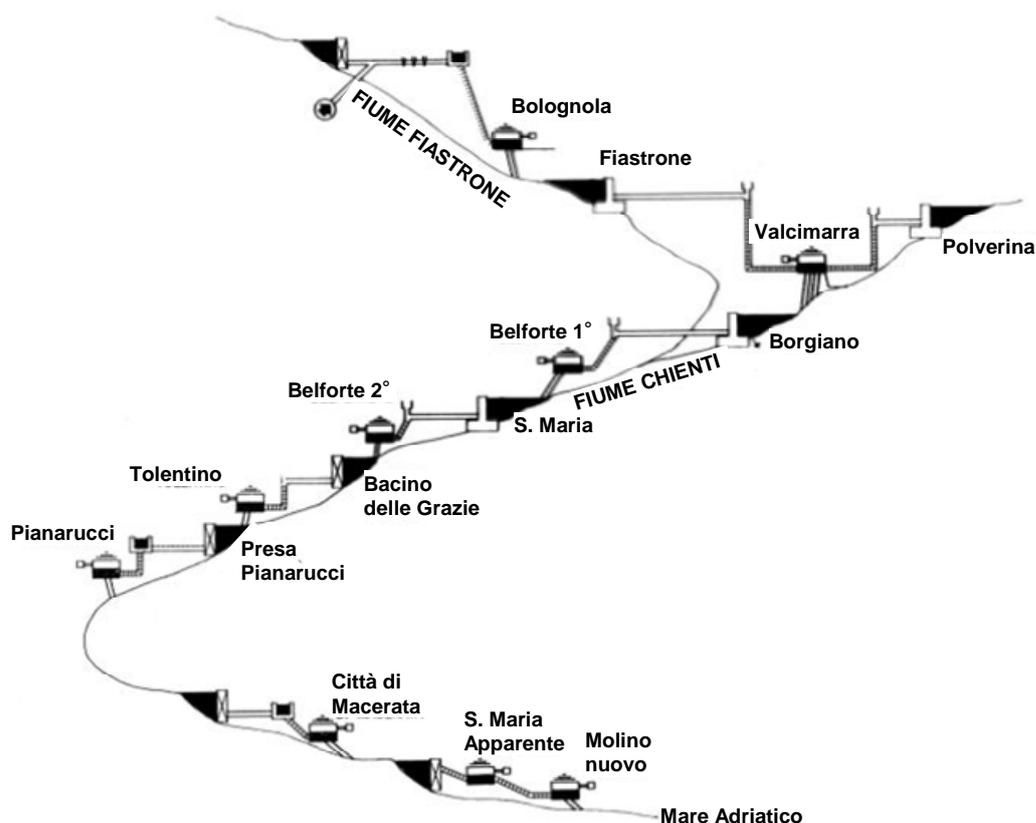


Figura 2. Profilo schematico delle centrali idroelettriche sul fiume Chienti

Contaminazioni trofiche al momento dello studio

Per acquisire una visione obiettiva sugli apporti allo stato trofico delle falde idriche da cui avevano origine i laghi del complesso, vennero classificate per quanto possibile tutte le fonti di contaminazione da nutrienti presenti nel territorio.

A seguito di un'indagine conoscitiva intrapresa dall'Arpam di Macerata circa la situazione dei sistemi fognari e della depurazione dei reflui civili dei 6 Comuni e delle 23 frazioni a monte del lago di Polverina che sversano i loro carichi nel bacino del fiume Chienti, fu appurato che dei comuni solo Serravalle di Chienti depurava i reflui civili inviandoli al depuratore a fanghi attivi della frazione di Bavareto; il comune di Muccia disponeva di un impianto di depurazione a fanghi attivi, ma questo non era stato ancora attivato né allacciato alle fognature del comune e delle frazioni comunali; i restanti comuni di Camerino, Pievetorina, Pievebovigliana, Fiordimonte e le rispettive frazioni erano dotati di reti fognarie più o meno estese ad eccezione della frazione di Sentino, comune di Camerino, che non aveva fognature e scaricava i propri reflui direttamente nei fossi.

In particolare Pievebovigliana disponeva di fosse Imhoff, mentre tutte le sue frazioni (sette) erano prive di qualsiasi trattamento di reflui; Fiordimonte e la frazione Di Nemi disponevano di fosse settiche ma tutte le altre frazioni (sette) non applicavano alcun trattamento; i comuni di Camerino (versante fiume Chienti) e Pievetorina e le loro frazioni non disponevano di fosse

Imhoff o settiche; dei comuni citati alcuni sversavano, direttamente o indirettamente tramite fossi, direttamente nel fiume Chienti, mentre gli altri li sversavano addirittura sul terreno a cielo aperto. Infine, nessuno dei comuni e delle frazioni di cui sopra applicava o era in grado di applicare trattamenti specifici o terziari per l'abbattimento dei fosfati e nitrati eventualmente presenti nei reflui, a fronte anche di un aumento estivo della presenza umana di quasi il 100% (da 3700 ab. a 6800 ab.).

Nel territorio a monte del lago di Polverina erano presenti numerosi allevamenti zootecnici, di cui quelli per suini smaltivano i liquami mediante fertirrigazione. Gli allevamenti di questo tipo erano ubicati a Pievebovigliana (circa 50 scrofe per maialetti, abbastanza distante dal Chienti), Pievevitorina (due allevamenti di 3500 e 400 capi rispettivamente, ambedue vicini al Chienti) e Serravalle di Chienti (circa 150 suini, ma distante dal fiume).

Infine, nella frazione di Colfiorito (Foligno) i reflui di tre caseifici, ad alto contenuto organico, ricadevano sul versante del fiume Chienti.

A queste fonti di inquinamento dovevano essere aggiunti gli apporti legati alle concimazioni agricole dei territori a monte del lago di Polverina, il cui controllo diretto era estremamente difficile data l'inesistenza di registri di carico e scarico dei concimi utilizzati.

Metodologia dell'indagine

Prelevamento campioni

I laghi Fiastrone (Figura 3), Borgiano, Le Grazie e Polverina sono stati monitorati nel corso di 10 anni con campionamenti mensili o quindicinali per raccogliere dati su nutrienti (azoto e fosforo), temperatura, pH e clorofilla a.

Sono state esaminate le popolazioni algali presenti, ed eseguiti test di tossicità e analisi chimiche in LC-massa per identificare e quantificare le eventuali tossine presenti, è stata verificata l'efficacia dei sistemi di trattamento del potabilizzatore di Tolentino sulle stesse.

Sono stati raccolti tutti i dati pregressi disponibili sugli stessi fattori.

I dati sono stati analizzati per investigare correlazioni tra l'aumento di nutrienti primari e la dinamica di popolazione delle specie tossiche.

In ciascun lago sono state definite 3 stazioni di campionamento:

- a 20 metri dalla diga
- al centro del lago
- all'inizio del lago

In ogni stazione sono stati prelevati due campioni: il primo a 0,5 metri dalla superficie e il secondo a circa un metro dal fondo.

I prelievi sono stati effettuati con una bottiglia di Niskin (TH3), dalla capacità di 5 litri.

L'acqua prelevata è stata trasferita in bottiglie scure di vetro o di plastica (500 mL per l'esame biologico e 1 litro per l'esame chimico) e trasportata in laboratorio in un contenitore termico ad una temperatura di 4 °C.

Oltre ai 91 campionamenti complessivi nei laghi interessati dal fenomeno, è stato eseguito un controllo specifico con una serie di 136 campionamenti specifici per verificare la presenza dell'alga *Plankothrix rubescens* e l'eventuale tossicità nell'acqua in entrata e in uscita del potabilizzatore e in alcuni punti della rete idrica del comune di Tolentino, che serve una popolazione di 12.000 abitanti nel territorio a sud del comune di Macerata.

Inoltre, sono stati eseguiti 8 campionamenti di fauna ittica (6 dal lago Fiastrone, marzo e giugno 2005; 2 dal lago Le Grazie, giugno 2005) per indagini istologiche e ricerca delle tossine nei visceri, nelle masse muscolari e negli ovari.

Analisi quali-quantitativa del fitoplancton

Una volta in laboratorio il campione, dopo essere stato opportunamente agitato per circa 50 volte è stato in parte esaminato a fresco, in parte fissato con soluzione di Lugol e acido acetico in ragione del 4% in 1 litro di campione.

Una volta fissato il campione è stato agitato delicatamente per almeno 50-100 volte e una parte di esso, in genere 25 mL, è stata fatta sedimentare in pozzetto di sedimentazione per 24-48 ore a temperatura ambiente, quindi esaminato al microscopio invertito a 320 ingrandimenti per il conteggio del fitoplancton.

Il calcolo totale delle cellule si è ottenuto con la seguente formula per la conta effettuata per campi:

$$\text{numero di cellule/litro} = \frac{C \times A_t}{A_f \times F} \times V$$

Dove

C = numero di cellule contate

A_t = area totale del fondo del pozzetto di sedimentazione in mm²

F = numero di campi contati

A_f = area del campo in mm²

V = volume del cilindro in mL

Nel caso di conta effettuata su tutto il fondo del pozzetto, il numero di cellule è stato moltiplicato per 40 se il campione sedimentato era di 25 mL.

Analisi tossicologiche

Biosaggio con *Vibrio fischeri*

Per la rilevazione della presenza di tossine nelle alghe è stato utilizzato il biosaggio con batterio *Vibrio fischeri*, secondo il sistema Microtox.

Il saggio su *Vibrio fischeri* in sistema Microtox è stato condotto secondo i dettami Microtox Application Notes: M 103-116, US *Environmental Protection Agency*, 1979. Gli standard delle tossine microcistine sono stati conservati a -30 °C fino all'utilizzo, e una curva di concentrazioni è stata composta per ognuno di essi, ai fini di testare la sensibilità del sistema, che per sua natura non è quantitativo. Metodi ISO per il *Vibrio fischeri* sono attualmente in elaborazione a livello UE. Il sistema Microtox, nato per la rilevazione delle sostanze tossiche acquatiche, (McFeters, 1983) è stato adattato alla rilevazione delle tossine algali (Bruno, 1992), utilizzando estrazioni non acide e non idrofobiche (Meriluoto and Eriksson, 1988; Gjolme and Utkilen, 1996), data l'altissima sensibilità del batterio ai solventi.

Estrazione per analisi immunologiche ELISA

Per la determinazione delle microcistine nelle acque di lago e nel tessuto ittico, è stato utilizzato il metodo immunologico mediante il kit Envirogard, specifico nel campo della ricerca semi-quantitativa e quantitativa delle tossine.

5 g di tessuto omogeneo (muscolo, fegato intero, visceri o uova, laddove presenti) già precedentemente sminuzzato e tritato sono stati estratti con 10 mL di metanolo 100%, omogeneizzando per 5 minuti in Polytron; il campione è stato poi centrifugato per 5 minuti a 5000 giri.

Il surnatante è stato filtrato su filtro a pieghe e lasciato percolare su pallone per Rotavapor da 100 mL; con il residuo solido si è ripetuta l'estrazione in 10 mL di metanolo e 15 minuti di Polytron. Il campione è stato poi direttamente filtrato sullo stesso filtro usato primo, e lasciato percolare sul pallone da 100 mL per Rotavapor, già ospitante i precedenti 10 mL.

Il filtro è stato poi lavato con 5 mL di metanolo per 3 volte (tot 15 mL) e l'estratto metanolico portato a piccolo volume (circa 1-2 mL dai 35 mL iniziali) in Rotavapor e trasferito quantitativamente in matraccio tarato da 5 mL lavando il pallone del Rotavapor con metanolo.

Il volume del matraccio tarato è stato poi portato a volume noto (5 mL) con metanolo; 1 mL di estratto (corrispondente ad 1 g di tessuto) è stato poi diluito in 1 mL di acqua bidistillata (totale 2 mL metanolo/acqua 50%) e caricato su cartuccia HLB SPE Waters OASIS condizionata con 1 mL di metanolo e 1 mL di acqua bidistillata.

L'eluizione del campione è stata eseguita con 1 mL di metanolo/acqua 5%, e il campione raccolto con 1 mL di metanolo.

Quest'ultima frazione è stata portata a secco in Rotavapor e ripresa con 2 mL di acqua bidistillata, quindi analizzata con kit ELISA (EnviroGard).

Analisi ELISA

Tutti I campioni sono stati analizzati con il kit EnviroGard Microcystins Plate Kit, un ELISA diretto competitivo per la rilevazione quantitativa delle microcistine e nodularine (limite di quantificazione 0,1 ppb). Non differenzia tra le varie microcistine ma ne rileva la presenza a diverse concentrazioni. Le concentrazioni al 50% di inibizione (50% Bo) per questi composti (ppb) sono: microcistina-LR 0,31, microcistina-RR 0,32, microcistina-YR 0,38.

Il kit è basato sugli anticorpi policlonali di Chu *et al.* (1989) creati contro la microcistina-LR, e leganti le microcistine e i loro metaboliti, ad esempio i coniugati glutatione-microcistina (Metcalf, 2000).

Le assorbanze finali delle soluzioni di reazione sono state misurate a 450 nm con uno spettrofotometro Anthos 2010.

Analisi chimico-fisica

In tutti i campioni esaminati sono stati determinati i seguenti parametri: temperatura dell'acqua (°C), e ossigeno disciolto (mg/L) con metodo elettrometrico in ossimetro Oxi 320; trasparenza mediante disco Secchi; pH mediante pHmetro Orion EA940.

Analisi chimica

In tutti i campioni esaminati sono stati determinati i seguenti parametri chimici: clorofilla *a* (µg/L) mediante spettrofotometro Cary Varian e metodo spettrofotometrico APAT IRSA CNR 9020; azoto nitrico (mg/L) e azoto nitroso (mg/L) mediante cromatografo Dionex e metodo di cromatografia ionica APAT IRSA CNR 4020 anioni; azoto ammoniacale (mg/L) mediante cromatografo Dionex e metodo di cromatografia ionica APAT IRSA CNR 3030 cationi; fosforo totale (mg/L) mediante Kit Lange LCK349 e strumento Lange (spettrofotometro).

I metodi analitici utilizzati sono quelli ufficiali pubblicati dall'IRSA-CNR (1994).

I dati di ossigeno disciolto, trasparenza, pH e clorofilla *a* non vengono qua discussi perché non significativi ai fini del presente rapporto. Parte dei dati relativi agli anni 1999-2003 sono stati oggetto di precedente pubblicazione in questi Rapporti (Serenelli, 2005).

Risultati ottenuti

Lago Fiastrone

Le indagini svolte tra novembre del 1997 e giugno 1998 rilevarono la presenza di filamenti del cianobatterio *Planktothrix rubescens* sia nel tratto del fiume Fiastrone a monte del lago, che nella sorgente “Pompa” nel comune di Bolognola, anch’essa a monte del lago. Da qui i filamenti venivano convogliati al lago Fiastrone, dove trovavano un ambiente calmo e soleggiato, adeguatamente provvisto di nutrienti, dove moltiplicarsi.



Figura 3. Lago Fiastrone visto da Fiastra

L'utilizzo a scopi idroelettrici del lago Fiastrone comporta una variazione del livello del lago durante l'inverno e la primavera, causata dalla regolazione del flusso di passaggio nella centrale di Valcimarra (Figura 4). La velocità di variazione è influenzabile dalla gestione delle dighe, ed è scelta in funzione dei fabbisogni energetici in carico alla centrale di volta in volta.

Le rilevazioni nell'arco di dieci anni evidenziarono che la dinamica di popolazione di *P. rubescens* nel lago mostra un andamento ciclico (max 125.525.200 cell/L dic. 2003, staz. centro lago) (Figura 5): durante i mesi di luglio, agosto e in parte settembre la popolazione cellulare diminuiva in superficie fin quasi a sparire, ma lungo la colonna d'acqua in questi periodi si verificava una stratificazione algale con punte di densità cellulare anche oltre i 70 milioni di cellule/L (-25 m, luglio 1998).

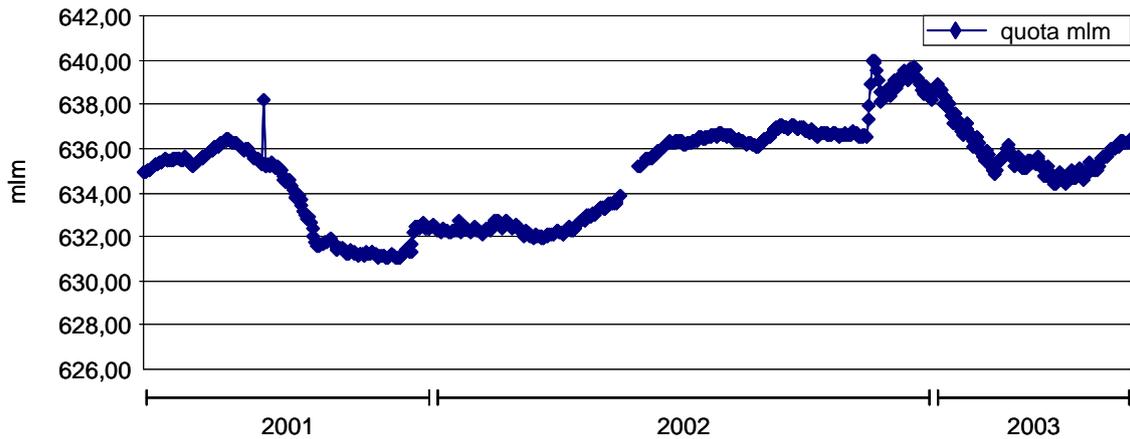


Figura 4. Variazione di livello del lago artificiale Fiastrone (luglio 2001-maggio 2003)

Nei mesi successivi, precisamente fine settembre-inizio ottobre, la popolazione iniziava a risalire aumentando contemporaneamente la densità algale fino a raggiungere i valori massimi superficiali nei mesi di gennaio, e il fenomeno eutrofico giungeva ad interessare tutta la colonna d'acqua.

Nel periodo di febbraio-maggio la densità algale superficiale ricominciava a diminuire per ridursi al minimo durante il periodo estivo.

Questo andamento ciclico ha mostrato una correlazione diretta tra la presenza del cianobatterio e la temperatura dell'acqua: *Planktothrix rubescens* predilige temperature al di sotto dei 18 °C, e diminuisce la sua galleggibilità approfondendosi negli strati freschi ricchi di nutrienti durante l'estate, sfruttando la regolazione dei vacuoli intracitoplasmatici contenenti gas.

Durante tutto il periodo monitorato, e in particolare nei mesi autunnali e invernali si è osservata notevole riduzione della presenza di altre specie algali.

Lo studio dei parametri chimici del lago Fiastrone ha evidenziato valori medi di azoto nitrico non elevati fin dal 1998-1999 (media di 0,32 mg/L, seguita da medie varianti tra 0,18 e 0,35 mg/L nel 2001-2007, mentre i valori medi di fosforo totale hanno variato da 0,040 a 0,01 mg/L (2001-2007), valori in genere superiori ai livelli ammessi nei laghi oligotrofici (Landner e Wahlgren, 1988). Queste concentrazioni di nutrienti possono definire lo schema di classificazione del lago Fiastrone, ponendolo nel comparto oligo-mesotrofico. L'osservazione dell'entità delle fioriture invernali rivela contemporaneamente la dipendenza della *P. rubescens* dalla concentrazione di fosforo, il cui valore medio più alto ha corrisposto alla stagione di fioritura più forte in assoluto: quella dell'inverno 2003-2004.

Dalle Figure 6, 7 e 8 si evidenzia che l'apporto maggiore dei nutrienti fa derivare un rapporto N/P spesso maggiore di 10, e ciò appare favorevole allo sviluppo di questo cianobatterio secondo le evidenze europee e italiane.

Nei tessuti (visceri, muscoli e ovari) di campioni ittici (*Leuciscus cephalus*) prelevati nel 2005 vennero rilevate microcistine fino ad un massimo di 25,41 ng/g nei visceri, di 3,3 ng/g nei muscoli e di 2,69 ng/g negli ovari (Tabella 1). Campioni da pellet algali e acqua prelevati in gennaio 1998 e in luglio 2005, risultati positivi con il biosaggio *Vibrio fischeri* vennero riesaminati in immunosaggio ELISA, con valori di 32 ng/g nel primo caso e 3,72 µg/L nel secondo. Nei campioni di acqua del 2005 esaminati anche in LC-MS venne rilevata una produzione qualitativa di isomeri già noti come tipici della specie *P. rubescens*, come 2 diverse demetil-RR, la microcistina -YR e la microcistina -LR (Messineo, 2009).

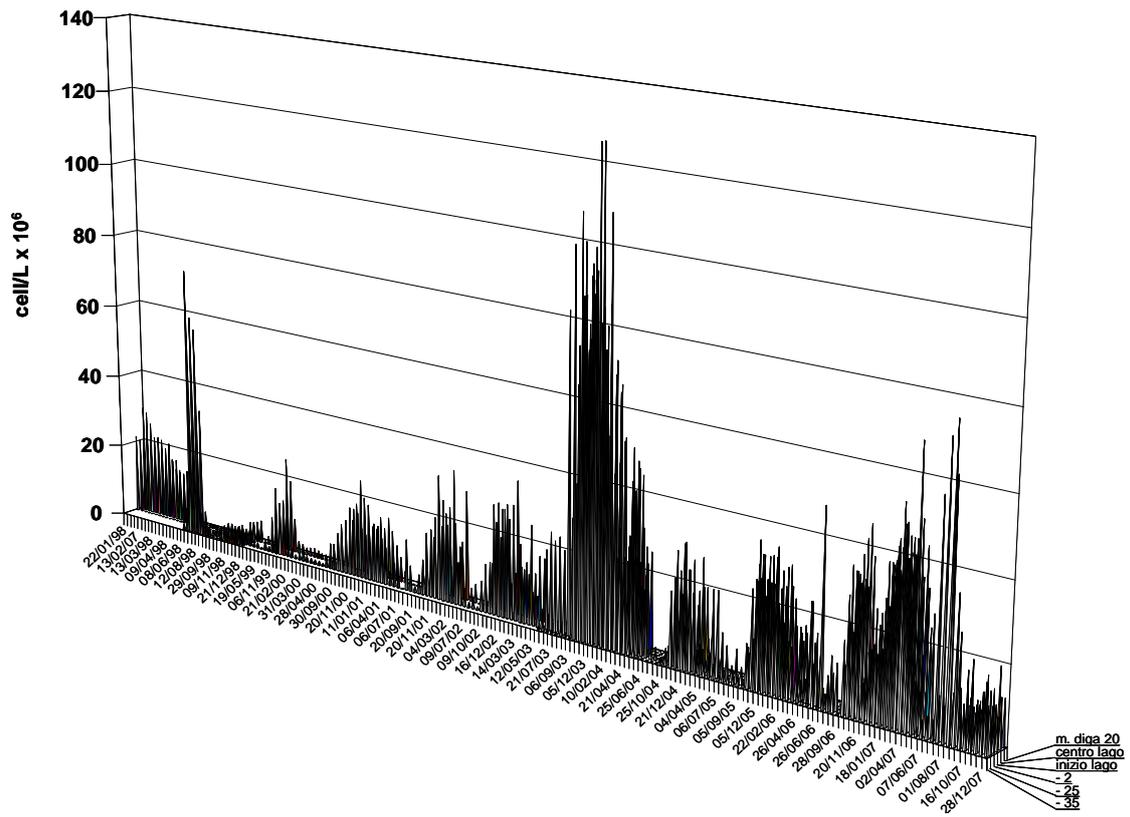


Figura 5. Lago Fiastrone: dinamica di *P. rubescens* (1998-2007)

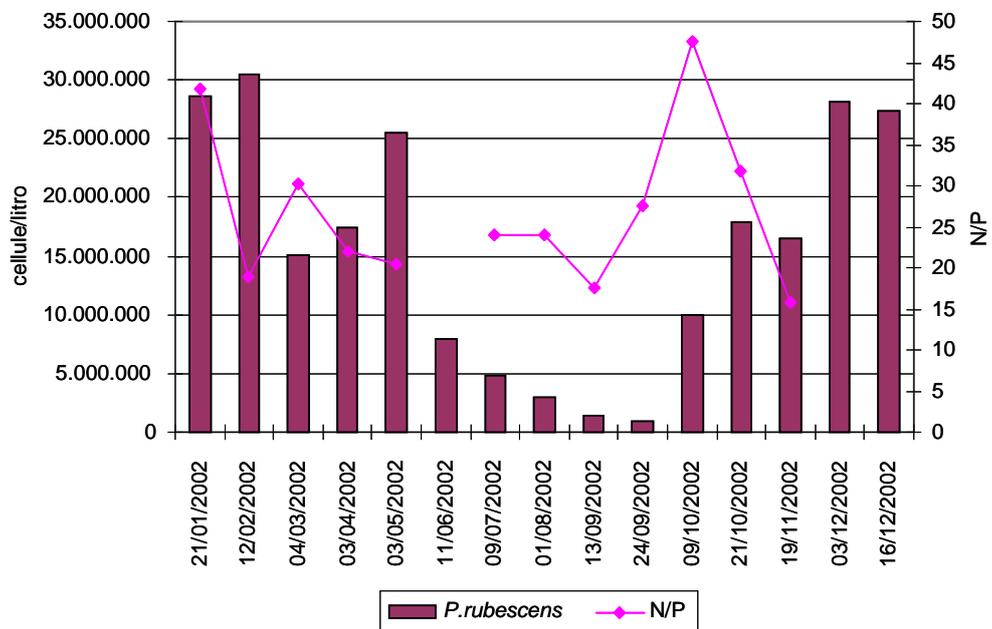


Figura 6. Lago Fiastrone: andamento medio di *P. rubescens* e rapporto azoto/fosforo (2002)

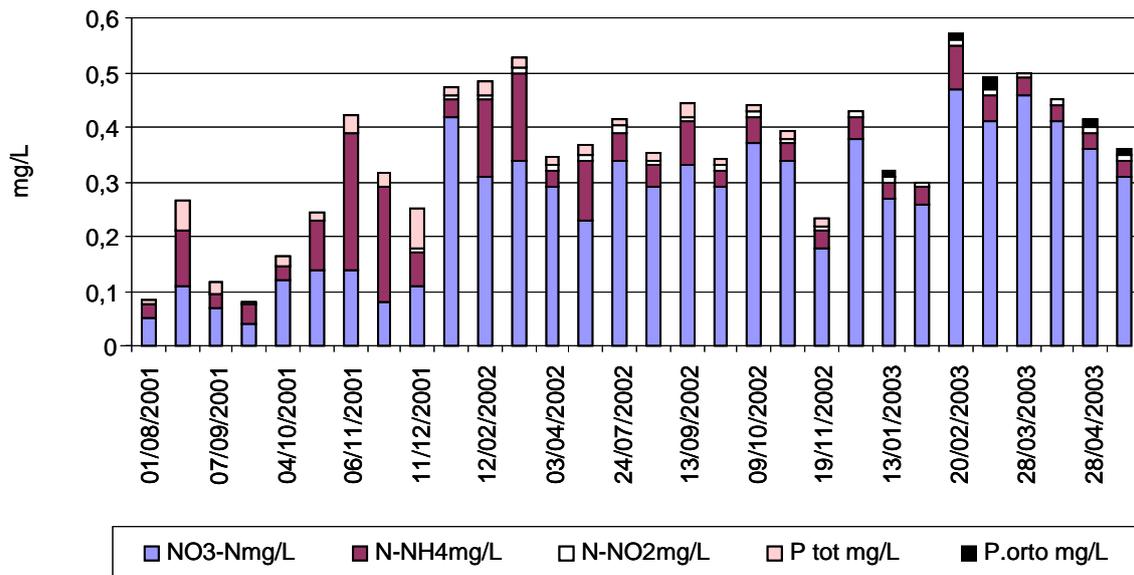


Figura 7. Lago Fiastrone: azoto nitrico, azoto nitroso, azoto ammoniacale, ortofosfato e fosforo totale (2001-2003)

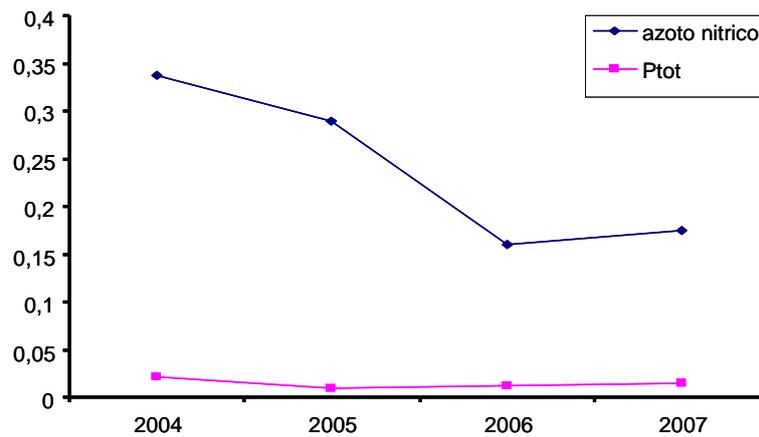


Figura 8. Medie annuali (2004-2007) di fosforo totale e azoto nitrico (mg/L) nel lago Fiastrone

Tabella 1. Contaminazione da microcistine nella fauna ittica del lago Fiastrone (ng/g)

Campioni	Visceri	Muscolo	Ovario
Marzo 2005			
<i>Leuciscus cephalus</i> 1	3,53	0,57	1,34
<i>Leuciscus cephalus</i> 2	12,21	3,3	--
<i>Leuciscus cephalus</i> 3	25,41	0,81	2,69
<i>Leuciscus cephalus</i> 4	23,52	1,51	1,64
Giugno 2005			
<i>Leuciscus cephalus</i> 1	17,2	1,64	1,06
<i>Leuciscus cephalus</i> 2	3,11	1,79	1,15

Lago Borgiano

Il lago di Borgiano risente dell'entità delle fioriture che si sviluppano nel lago Fiastrone, distante circa 11 km, perché ne riceve gli apporti di fitoplancton attraverso le acque del fiume omonimo. Da studi eseguiti precedentemente a questo monitoraggio è stato rilevato che arrestando la turbina delle acque ricche di filamenti algali provenienti dal lago Fiastrone per la produzione di energia elettrica, la densità del cianobatterio nel lago di Borgiano si riduceva in tempi molto brevi, grazie anche al veloce ricambio idrico delle acque che non favoriscono l'instaurarsi di un ambiente ottimale per *P. rubescens*, adatta ad ambienti a lento ricambio idrico.

L'analisi dei prelievi effettuati nel lago di Borgiano ha evidenziato la presenza di una popolazione di *P. rubescens*, con oscillazioni di densità sincrone alla popolazione del lago Fiastrone. L'intensità delle fioriture è però in media un decimo (max. 14×10^6 cell/L, genn. 2004, Figura 9) di quella riscontrata nel lago principale, nonostante i valori medi di fosforo totale siano più o meno gli stessi (da 0,017 a 0,021 mg/L) e i valori di azoto nitrico siano tre volte maggiori (da 0,55 a 1,099 mg/L) (Figura 10). Nel lago la presenza di *P. rubescens* è sempre più concentrata all'inizio del corso d'acqua, a causa della turbina effettuata dalla centrale idroelettrica di Valcimarra che deriva le acque del Fiastrone nel Borgiano. Dallo studio dei parametri chimici (Figura 10) il Borgiano risulta ricco di nutrienti e può essere definito, secondo lo schema di classificazione della trofia delle acque interne, un lago meso-eutrofico: cioè in condizioni fisico-chimiche favorevoli per consentire lo sviluppo di elevate biomasse algali. Numerose fioriture di Cloroficee e Diatomee sono state effettivamente riscontrate nel lago durante gli anni di studio, in periodi stagionali diversi.

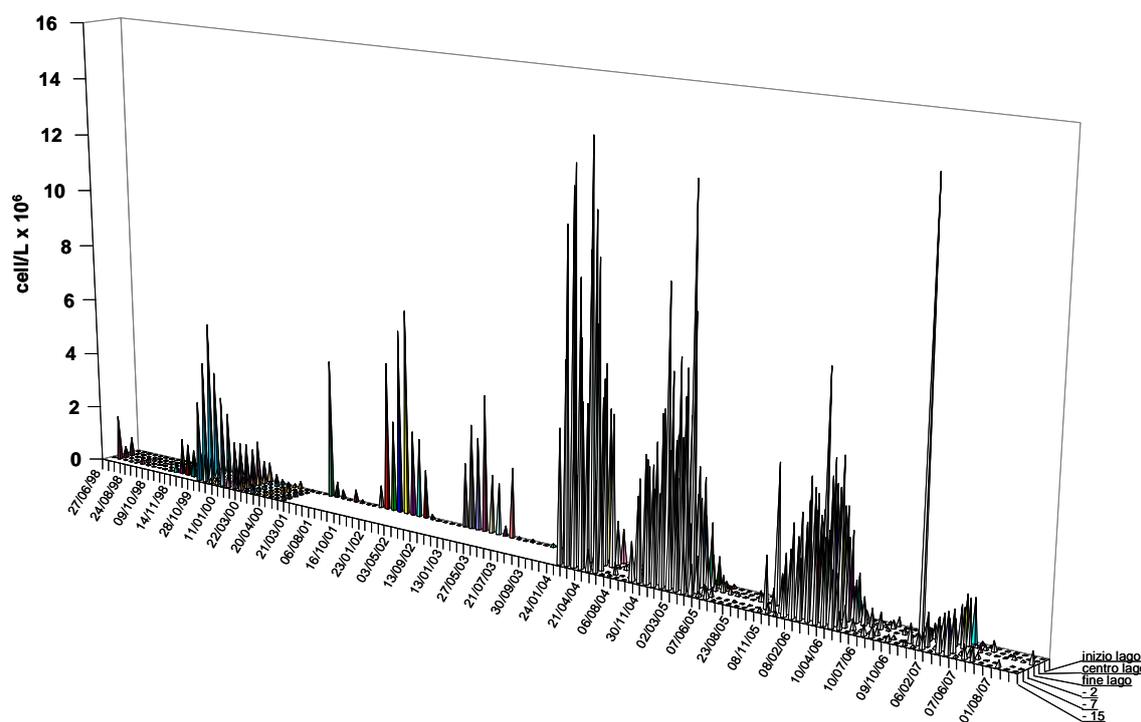


Figura 9. Lago Borgiano: dinamica di *P. rubescens* (1998-2007)

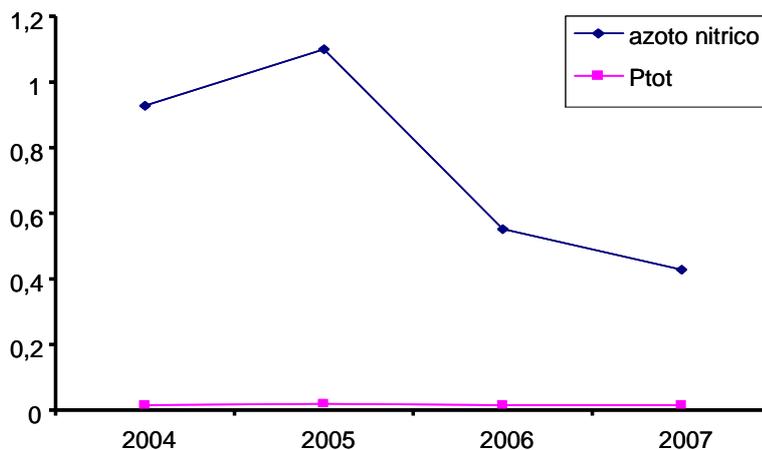


Figura 10. Medie annuali (2004-2007) di azoto nitrico e fosforo totale (mg/L) nel lago di Borgiano

Lago Le Grazie

Il lago Le Grazie si trova a valle del lago di Borgiano e origina anch'esso per sbarramento del fiume Fiastrone, emissario del lago a monte, da cui dista circa 10 km. L'analisi dei prelievi ha rivelato anche per questo lago la presenza della specie *P. rubescens*, con pulsazioni di fioritura corrispondenti a quelle dei laghi a monte. Anche in questo caso venivano però rilevate densità massime pari a circa la metà di quelle del Borgiano (max. 8×10^6 cell./L, feb. 2004) (Figura 11), nonostante i valori medi di fosforo totale e azoto nitrico siano superiori di un terzo rispetto a quelli del Borgiano (da 0,018 a 0,033 mg/L, e da 0,586 a 1,458 mg/L) (Figura 12).

Dallo studio dei parametri chimici si rileva come il lago Le Grazie possa essere definito un lago eutrofico; anche in esso la presenza di *P. rubescens* è dovuta all'arrivo di acque ricche di filamenti algali provenienti dal lago a monte. Nel giugno 2005 due pesci provenienti dal lago vennero esaminati per la presenza di microcistine nei tessuti. Vennero rilevate contaminazioni fino a 4,9 ng/g nei visceri e 3 ng/g nei muscoli (Tabella 2).

Nonostante la moderata densità del cianobatterio nel lago Le Grazie, la presenza è stata sufficiente a causare problemi nella rete di distribuzione dell'acquedotto del comune di Tolentino, a valle dell'invaso.

Dalla Figura 13 si evidenzia che la densità del cianobatterio all'entrata del potabilizzatore ha superato il valore di 5.000.000 cell/L in data 30/01/2003.

Dalla Figura 14, che riporta la densità di *P. rubescens* all'uscita dell'impianto di potabilizzazione, si rileva che il cianobatterio è stato di norma assente, ad eccezione dei periodi 7-29/11/2001, 27/12/2001-03/01/2002 e 27/02/2002-21/03/2002, in cui l'alga raggiunge densità intorno a 10.000, 1.000 e 2.000 cellule/litro.

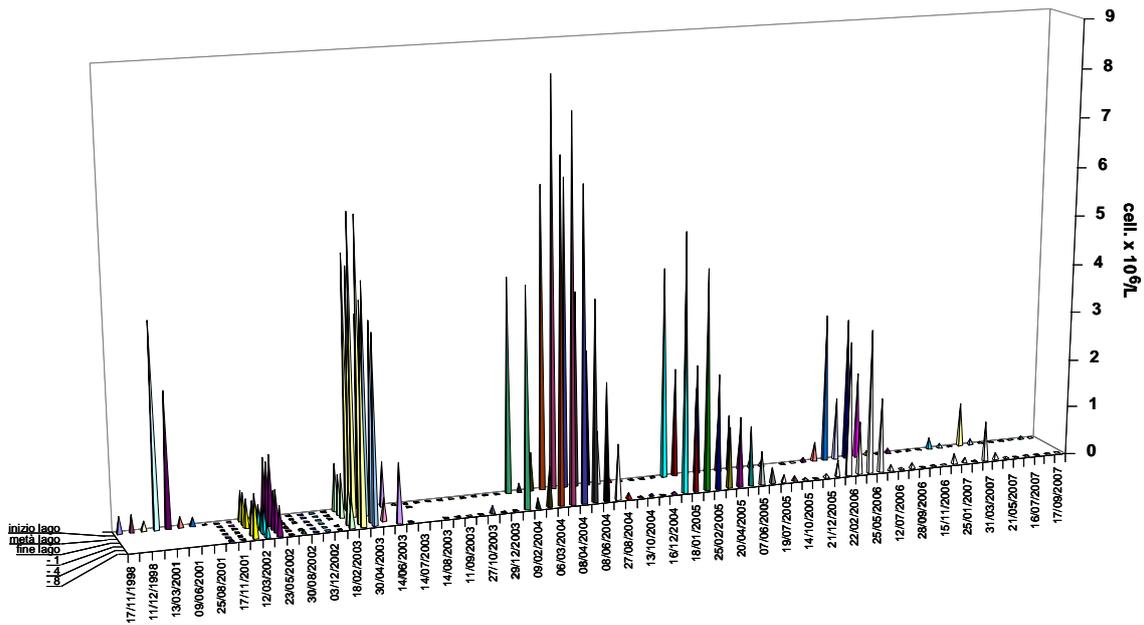


Figura 11. Lago Le Grazie: dinamica di *P. rubescens* (1998-2007)

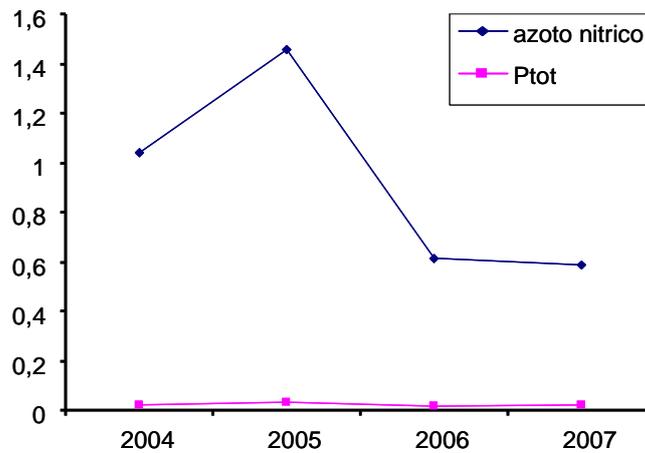


Figura 12. Medie annuali (2004-2007) dell'azoto nitrico e del fosforo totale (mg/L) nel lago Le Grazie

Tabella 2. Contaminazione di fauna ittica da microcistine nel lago Le Grazie (ng/g)

Giugno 2005	Visceri	Muscolo	Visceri+ovario
<i>Scardinium scardafa</i> 1	4,97	1,97	
<i>Scardinium scardafa</i> 2		3,06	4,41

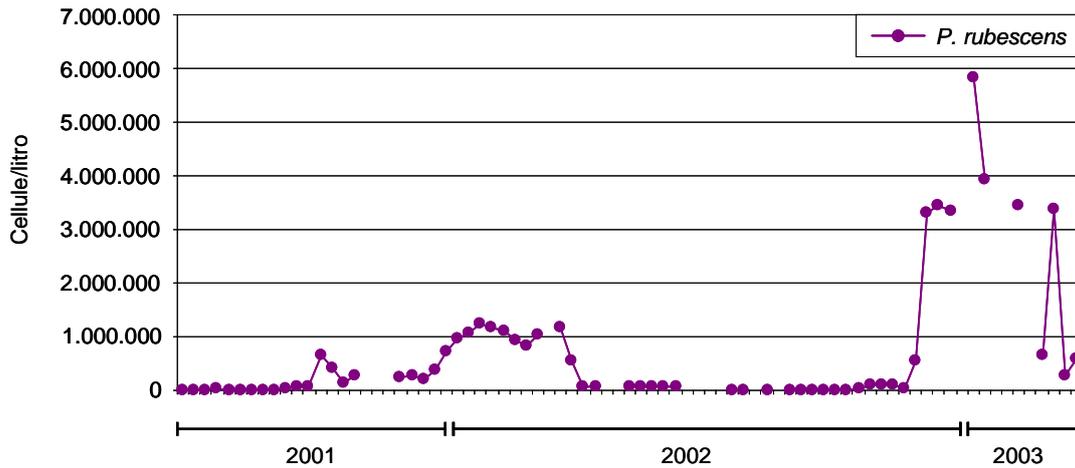


Figura 13. *P. rubescens* all'entrata dell'impianto di potabilizzazione di Tolentino (luglio 2001- maggio 2003)

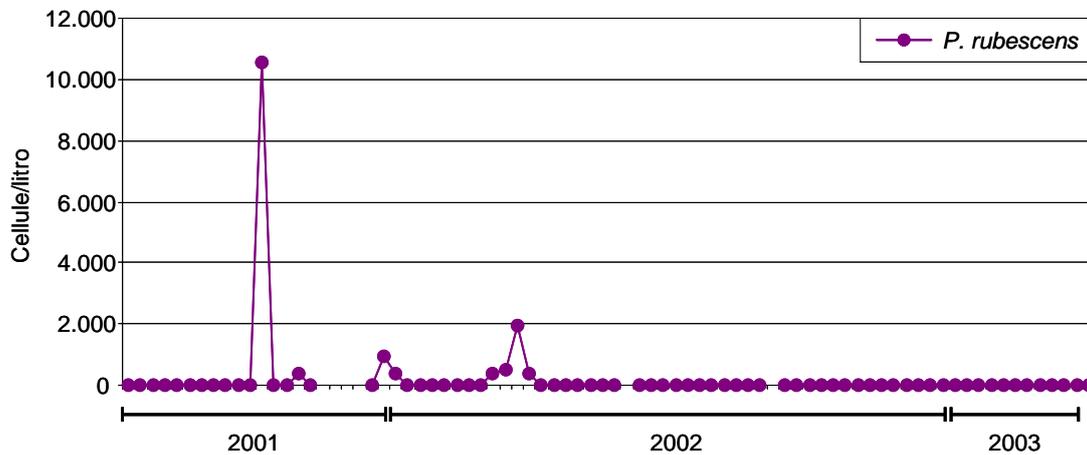


Figura 14. *P. rubescens* in rete all'uscita dall'impianto di potabilizzazione di Tolentino (luglio 2001- maggio 2003)

Lago Polverina

Nel 1998 il lago di Polverina, formato per sbarramento del fiume Chienti, secondo ramo fluviale del complesso, presentò una forte fioritura della specie tossica *Microcystis aeruginosa* (max. $2,9 \times 10^9$ cell/L, sett. 1998) (Figura 15). Due misure di azoto nitrico rilevate nel 1999 mostrarono valori fino a 1,91 mg/L.

La fioritura non si ripeté negli anni successivi, nonostante i valori medi di fosforo totale arrivassero fino a 0,025 mg/L e quelli di azoto nitrico raggiungessero 1,247 mg/L, denotanti condizioni di mesotrofia-eutrofia (Figure 16 e 17).

Questa caratteristica associata ad un lento ricambio idrico, ad elevate temperature delle acque nel periodo estivo (con punte di 26-28 °C nei mesi di luglio e agosto) e alla bassa profondità del lago, facilita lo sviluppo di molte specie algali. Infatti durante i periodi di

monitoraggio sono state evidenziate numerose fioriture, sostenute principalmente da generi appartenenti alla classe delle Diatomee come *Asterionella*, *Cyclotella*, *Synedra*, ecc.

Nei periodi in cui non si sono verificate fioriture algali, è risultata comunque molto elevata la densità totale del fitoplancton, ed hanno avuto luogo fenomeni di anossia con morie ittiche. Negli ultimi anni il lago non è stato più idoneo alla balneazione.

I fenomeni eutrofici che hanno interessato il lago successivamente al 1998 non vennero causati da alghe tossiche per l'uomo, ma come per il lago di Borgiano stanno ad indicare uno squilibrio del sistema lacustre, e possibili danni agli organismi di ordine superiore.

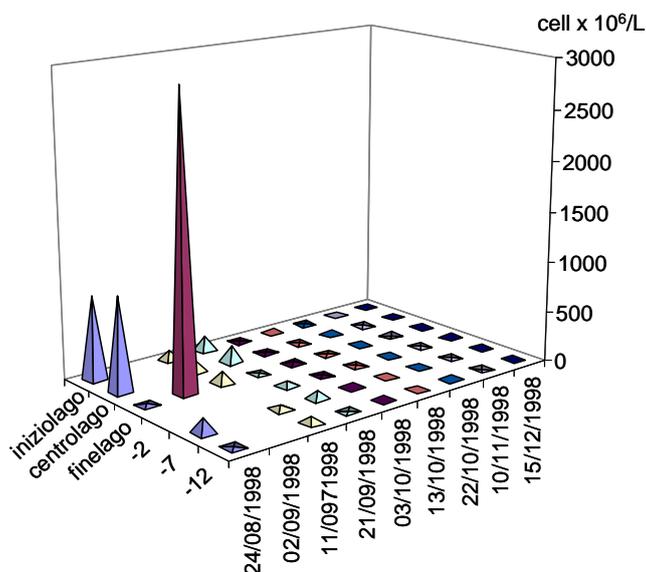


Figura 15. Lago di Polverina, fioritura di *Microcystis aeruginosa* (1998)

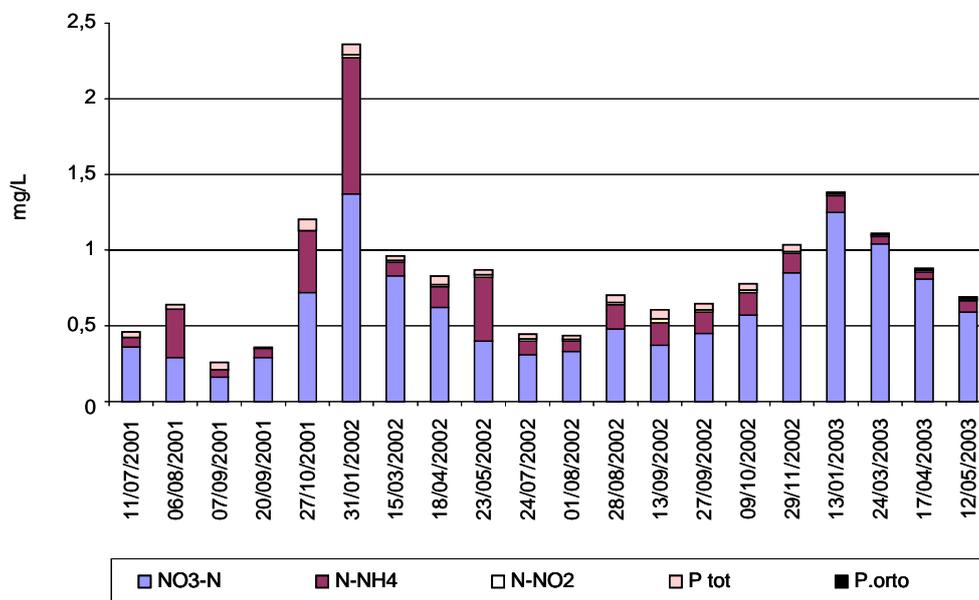


Figura 16. Concentrazione dei nutrienti nel lago di Polverina (luglio 2001-maggio 2003)

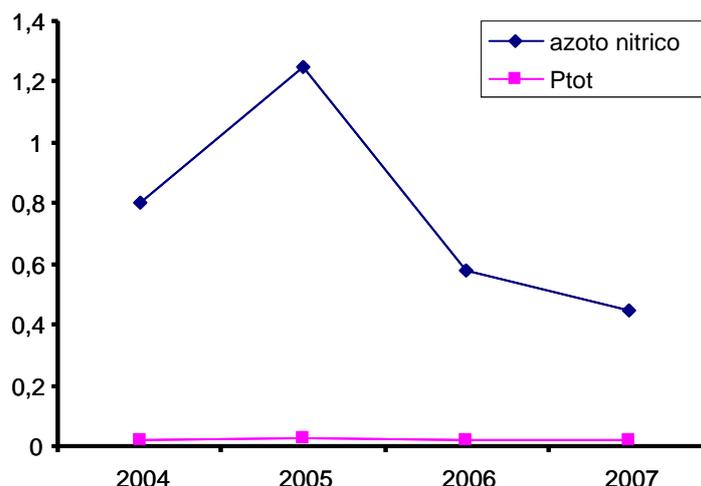


Figura 17. Medie annuali (2004-2007) di azoto nitrico e fosforo totale (mg/L) nel lago di Polverina

Definizione di un protocollo tecnico gestionale

Gli Enti preposti al controllo e alla protezione dell'ambiente e della salute pubblica durante l'anno 2001 formarono un Gruppo Tecnico, inizialmente allargato, nominato dalla Provincia di Macerata e costituito dai rappresentanti Anpa, Istituto Superiore di Sanità, Arpam Dipartimento Provinciale, Dipartimenti di Prevenzione AUSL9 e AUSL10, Istituto Zooprofilattico ed Enel Green Power e i Sindaci il cui territorio ricade nel bacino del Chienti, al fine di affrontare tempestivamente le varie problematiche causate dalla presenza di *P. rubescens*.

Si decise nelle riunioni tenutesi in data 30/10/01 e 4/12/01 di vietare la turbinazione delle acque del Fiastrone per fini idroelettrici da parte della centrale idroelettrica dell'Erga nel caso in cui il prelievo di acqua comportasse un abbassamento del livello inferiore ai 631 mlm.

Inoltre si stabiliva, come ulteriore precauzione, di diluire le acque turbinate con quelle del lago di Polverina in un rapporto minimo 1:2, tenendo sempre sotto controllo l'eventuale aumento della concentrazione algale sul lago di Borgiano e Le Grazie.

Nonostante questi provvedimenti non si poté evitare l'interdizione con ordinanza sindacale a scopo cautelativo, della distribuzione di acqua potabile da parte dell'ASSM di Tolentino, in quanto si riscontrò la presenza di cellule algali lungo la rete idrica.

L'ordinanza fu rimossa quando a seguito delle analisi effettuate presso l'ISS, non venne riscontrata presenza di tossine algali.

Sempre in data 04/12/01 il Gruppo Tecnico allargato manifestò l'esigenza di definire uno specifico protocollo per la gestione programmata e controllata del fenomeno, e istituì al suo stesso interno un Gruppo Tecnico ristretto costituito dai rappresentanti Anpa, Istituto Superiore di Sanità, Arpam Dipartimento Provinciale, Dipartimenti di Prevenzione AUSL9 e AUSL10, Istituto Zooprofilattico ed Enel Green Power, al fine di formulare una proposta di protocollo gestionale strettamente tecnica da proporre al Gruppo Tecnico allargato ai rappresentanti delle istituzioni, per essere integrato al fine di apprezzare eventuali interessi pubblici e sociali.

In data 04/06/2002 il Gruppo tecnico ristretto definì il protocollo per la tutela dell'utenza pubblica e la gestione dell'inquinamento algale del lago Fiastrone e dei bacini dell'alto Chienti.

Il protocollo è di seguito riportato:

Ambito territoriale di riferimento

L'ambito territoriale di riferimento del presente protocollo è costituito dai laghi del Fiastrone, Polverina, Borgiano e le Grazie, interessati direttamente e/o indirettamente dal fenomeno inquinante in questione.

Attività gestionali adottate

1) Attività relative al bacino idrografico del Lago del Fiastrone e dei laghi di Polverina, Borgiano e le Grazie, indipendenti dalla concentrazione algale:

- controllo annuale degli scarichi di acque reflue di aziende e attività ricadenti nel bacino a monte del lago del Fiastrone;
- rispetto delle disposizioni conseguenti l'utilizzazione agronomica dei suoli agrari, in particolare inclusi nelle aree sensibili e/o vulnerabili ai nitrati, individuate dal Piano regionale di tutela delle acque;
- promozione da parte degli Enti interessati di azioni di politica agricola finalizzate a migliorare le pratiche agricole in funzione della criticità da carico di nutrienti e l'applicazione del Codice di Buona Pratica Agricola;
- rispetto rigoroso del divieto di scarichi idrici di ogni genere non a norma;
- divieto al singolo pescatore di detenere e utilizzare più di 1 kg di bigattini e più di 1,5 kg di pasture per ogni giornata di pesca;
- realizzazione immediata dei progetti di risanamento del bacino del lago del Fiastrone e degli altri bacini,
- eliminazione, per quanto possibile, dei periodi prolungati di fermo acque e rapide oscillazioni del livello del lago del Fiastrone;
- escursione massima consentita del livello delle acque del lago del Fiastrone fino alla quota minima di invaso di 631 m;
- comunicazione mensile, o settimanale in caso di fioritura, delle portate del lago del Fiastrone in ingresso, in uscita e derivate;
- obbligo del Gruppo Tecnico di riunirsi almeno una volta allorquando si superi la soglia dei 10 milioni di cell/L, per analizzare lo stato delle attività programmate e monitorare l'evoluzione delle diverse forme di collaborazione.

2) Popolazione algale nel lago Le Grazie superiore a 1×10^6 cell/L:

- attivazione del monitoraggio settimanale della presenza algale nella rete acquedottistica nel Comune di Tolentino;
- contemporanea ricerca di tossine algali all'ingresso della rete dell'acquedotto;
- emanazione di Ordinanza Sindacale di divieto di utilizzo dell'acqua potabile nel Comune di Tolentino qualora dalle attività di monitoraggio della rete acquedottistica si rilevi il superamento del limite di presenza algale stabilito in 1000 cell/mL in due campioni su quattro, se confermati da verifica analitica dei prelievi ripetuti entro 24 ore.

3) Popolazione algale nel lago del Fiastrone e/o negli altri bacini interessati al di sotto della soglia di 5×10^6 cell/L:

- normali canoni di monitoraggio della densità algale e dei parametri chimico-fisici con prelievi mensili;
- nessuna restrizione dell'uso delle acque.

4) *Popolazione algale nel lago del Fiastrone e/o negli altri bacini interessati, compresa tra 5×10^6 cell/L e 10×10^6 cell/L:*

Continuazione di tutte le attività previste al terzo punto e inoltre:

- intensificazione del monitoraggio con prelievi da effettuarsi al massimo ogni quindici giorni;
- al superamento dei 5×10^6 cell/L in ogni bacino interessato, emanazione di ordinanze sindacali:
 - di divieto dell'utilizzo dell'acqua per uso potabile, in assenza di impianti di potabilizzazione;
 - di divieto di pesca, anche sportiva, di qualsiasi specie ittica;
 - di divieto di balneazione;
 - di divieto dell'uso dell'acqua per irrigazione a pioggia;
 - di divieto dell'uso dell'acqua per abbeveraggio del bestiame;

5) *Popolazione algale nel lago del Fiastrone e/o negli altri bacini interessati, maggiore di 10×10^6 cell/L*

Continuazione di tutte le attività previste al quarto punto e inoltre:

- intensificazione del monitoraggio di densità algale con frequenza settimanale nel Lago Le Grazie;
- ricerca di tossine algali nelle acque dei laghi;
- espletamento di indagini istologiche e delle tossine nei fegati e nelle masse muscolari della fauna ittica e selvatica, qualora dalle indagini del punto precedente emerga la presenza di tossine algali nelle acque di lago;
- produzione di energia elettrica mediante turbinazione delle acque derivate dal lago del Fiastrone con le portate del fiume Chienti a monte (lago di Polverina) in rapporto di almeno 1:2.

Il protocollo tecnico gestionale, approvato dal Gruppo Tecnico allargato e dalla Provincia di Macerata (Del. N. 341) il 23/7/2002 e applicato nelle sue prescrizioni in tutti i casi segnalati dall'ARPA durante il monitoraggio, era ancora in vigore all'estensione del rapporto.

Discussione dei risultati e conclusioni valutative

Dallo studio dei dati raccolti, il lago Fiastrone è risultato caratterizzato da una forte e ben attestata popolazione del cianobatterio tossico *P. rubescens*, che nei dieci anni di osservazioni ha causato nel lago estese fioriture superficiali producenti microcistine oltre i valori citati nella circolare Min. San. di riferimento, dall'inizio dell'autunno alla tarda primavera.

Tra le specie tossiche del genere *Planktothrix*, *P. rubescens* ha una produzione di tossine elevata (Akcaalan, 2006), suscettibile di aumento in condizioni ambientali sfavorevoli (Messineo, 2006). Al contrario di altre specie affini, le popolazioni naturali di *P. rubescens* non presentano ceppi privi dei geni producenti microcistine, e malgrado in passato siano stati clonati ceppi con geni disattivati e con frequenze massime del 21% all'interno della popolazione naturale, (Kurmayer, 2004), studi successivi non hanno confermato queste presenze (Akcaalan, 2006).

La provenienza della specie è stata accertata attraverso il corso superiore del fiume Fiastrone, a partire dalla sorgente di quota "Pompa", che con ogni probabilità ha permesso l'affioramento di filamenti algali veicolati dalle falde idriche, forse provenienti da altri laghetti

di quota. Questo modo è uno dei tanti che le specie algali sfruttano per raggiungere gli ambienti acquatici: altri sono il trasporto delle spore con il vento, oppure l'adesione alle zampe e alle piume degli uccelli che percorrano distanze non grandi (Manti e Bruno, 2004).

L'aspetto particolare presentato da questo sistema di laghi è stato inoltre la trasmissibilità delle popolazioni di *P. rubescens* in fioritura ai corpi d'acqua posizionati a valle, nei quali però, nonostante l'alto livello di nutrienti presente, le fioriture non riuscivano a raggiungere valori elevati grazie alla forte velocità di ricambio dei volumi d'acqua.

Tutto questo ha creato molte preoccupazioni per la salvaguardia ambientale e soprattutto per la protezione della salute pubblica, poiché i laghi del complesso sono un forte richiamo per i turisti e gli sportivi della caccia e della pesca.

Particolare attenzione nello studio è stata rivolta al lago Le Grazie, in quanto le sue acque vengono captate per usi potabili e utilizzate per servire un'utenza di 12.000 abitanti del comune di Tolentino; nonostante esista un impianto di potabilizzazione, la densità delle biomasse di fioritura nel 2001-2002 è stata tale da saturare rapidamente i filtri a carbone attivo e dar luogo a presenza di filamenti algali all'uscita dell'impianto e nella rete di distribuzione. In seguito a ciò il potabilizzatore è stato addizionato con un sistema ad ultrafiltrazione aggiunto a quello già presente con filtri a carbone attivo, i quali attualmente sono i più sicuri nel trattenere le tossine.

La presenza di una specie tossica nel fitoplancton lacustre non è di per sé indicativa di rischio ecologico. Quando però la concentrazione dei nutrienti risulta comunque sufficiente a creare condizioni ottimali, insieme ad altri fattori come temperatura, profondità del lago, bruschi abbassamenti di livello dovuti ai prelievi necessari per la produzione di energia elettrica con conseguenti concentrazioni dei contaminanti ambientali, si possono innescare i fenomeni eutrofici, in questo caso sostenuti da *P. rubescens*.

Questa specie richiede un'alta concentrazione di azoto, espressa dall'elevato rapporto N/P in genere almeno uguale a dieci, tipico delle acque dei laghi che ne ospitano le fioriture. Laghi in transizione non completata verso la mesotrofia sono già in grado di ospitare fioriture di *P. rubescens*, purché la quantità media di fosforo totale, e soprattutto di ortofosfato nelle acque abbia raggiunto i 20 µg/L. Il controllo e la riduzione di quest'ultima specie chimica, più facilmente metabolizzabile dal cianobatterio, porta come conseguenza l'abbattimento in pochi mesi delle abbondanze cellulari fino alla scomparsa della specie come problema ecologico (Bruno, 2004).

Nonostante il livello trofico del lago Fiastrone non fosse ancora superiore alla oligo-mesotrofia, è apparso subito chiaro che la riduzione degli apporti di nutrienti fosse l'unica chiave per scongiurare l'aumento dell'eutrofizzazione e le conseguenti fioriture tossiche a biomassa crescente che il lago avrebbe trasmesso ai bacini più a valle, fino al potabilizzatore di Tolentino. Nel 2000 vennero quindi richiesti finanziamenti al Ministero per l'Ambiente per consentire la realizzazione di impianti fognari moderni e funzionali nella massima parte possibile di comuni e frazioni abitate che incidevano nel bacino idrico interessante il lago Fiastrone. Lo svolgimento delle opere relative ha richiesto diversi anni, e di fatto la maggior parte delle autorizzazioni per le conseguenti messe in opera è stata emessa tra la fine del 2007 e l'inizio del 2008, con l'eccezione degli impianti di San Lorenzo al Lago e Boccioni, autorizzati per primi all'inizio del 2006 (Tabella 3). L'efficacia dei trattamenti sul livello trofico del lago non è perciò ancora valutabile, ma degna di nota è la diminuzione del quantitativo medio annuo di azoto nitrico, e in minor misura del fosforo totale che si apprezza nella Figura 8 nel 2006, e che si ripercuote in misura minore anche negli altri laghi (Figure 10, 12, 17). A questa non si associa per il momento una apprezzabile diminuzione delle biomasse riscontrate nelle fioriture tossiche di questa specie; la causa di questo può essere individuata nella ancora insufficiente azione dei pochi depuratori attivati prima del 2008.

Lo studio ha evidenziato la contaminazione da microcistine di specie ittiche pregiate presenti nel lago Fiastrone e nel lago Le Grazie. L'accumulo ittico di tossine algali d'acqua dolce è ben conosciuto internazionalmente e anche in Italia (Magalhaes, 2003; Mohamed, 2003). Un essere umano adulto di circa 70 kg ingerisce generalmente porzioni di pesce da 100 a 300 g (Magalhaes, 2003; Mohamed, 2003). Le recenti linee guida per il rischio acuto e cronico proposte dall'US EPA sono rispettivamente 0,006 e 0,003 µg microcistine/kg di peso corporeo/giorno, US EPA 2006). In studi precedenti questo laboratorio ha rilevato che diverse proposte culinarie tradizionali per il pesce pregiato operano una riduzione in peso delle porzioni tramite evaporazione (dal 16,3% al 43%), senza causare la distruzione delle tossine e perciò determinandone di fatto la concentrazione (fino al 28%). Queste valutazioni abbassano di fatto il limite di peso delle porzioni cotte da considerare in sicurezza.

La quantità di tossine rilevate nei campioni qui esaminati è di medio-bassa entità (max. 3,3 ng/g di muscolo edibile in cavedano da Fiastrone e 3,06 ng/g di muscolo edibile in scardola da Le Grazie). Questa considerazione deve essere però incrociata con l'esigua quantità di campioni esaminati, e l'avanzata stagione di fioritura (con presumibili bassi valori di microcistine nelle acque) in cui il periodo di campionamento si è svolto: di fatto i risultati delle analisi hanno solo rivelato l'esistenza del problema, la cui quantificazione potrà essere esperita con un monitoraggio analitico seguente l'intera dinamica annuale di popolazione del cianobatterio, in tutti i laghi interessati da *P. rubescens*.

La presenza di microcistine nei tessuti di fauna ittica pregiata, come i coregoni, implica anche considerazioni sugli effetti tossici esercitati durante la crescita e il normale sviluppo degli individui, che in queste condizioni presentano stock ittici con peso medio ridotto e minore adattabilità (Ernst, 2006; Smith e Haney, 2006).

La potenzialità delle microcistine di dare luogo a concentrazioni nella fauna acquatica è un serio problema, specie quando gli organismi sono utilizzati per il consumo umano; in questo quadro dovrà essere considerata la possibile esposizione al rischio delle popolazioni locali attraverso il consumo di pesce pregiato i cui muscoli abbiano accumulato la tossina.

Il decennio di studio descritto ha rivelato una elevata alterazione degli equilibri lacustri nell'intero complesso del Fiastrone. La specie *P. rubescens* rende le acque dei bacini interdette alla balneazione, alla pesca e all'uso irriguo per lunghi periodi dell'anno. Questo degrado riguarda anche il lago di Polverina.

Tabella 3. Interventi progettati e realizzati per la tutela del bacino idrico del lago Fiastrone

Interventi depurazione ecosostenibile acque reflue urbane	LAGO DEL FIASTRONE					
	Comune	Intervento	Capacità A/E	Autorizzazione	Recettore	Fognatura
1 San Lorenzo al Lago	Fiastra	Impianto biologico a fanghi attivi ad aerazione totale	500	109/14° del 29/03/2006	Lago Fiastrone	Separata
2 Boccioni	Fiastra	4 Imhoff e vassoio SFS (Fitodepurazione)	250	110/12° del 29/03/2006	Fosso senza nome poi Lago Fiastrone	Separata
3 Rio, Trebbio, Colle	Fiastra	6 Imhoff e vassoio SFS (Fitodepurazione)	260	208/12° del 01/08/2007	Fosso Rio e poi Lago Fiastrone	Separata
4 Colpodalla	Fiastra	2 Imhoff e vassoio SFS (Fitodepurazione)	25	50/12° del 08/02/2008	Lago Fiastrone	Separata
5 Podalla	Fiastra	Imhoff	25	50/12° del 08/02/2008	Fosso senza nome poi Lago Fiastrone	Separata
per le località sopra elencate	Fiastra	Separazione reti fognarie				
6 Piè di Vescia	Acquacanina	4 Imhoff e vassoio SFS (Fitodepurazione)	500	382/12° del 01/12/2008	Torrente Fiastrone	Separata
Per tutte le località recapitanti a Piè di vescia	Acquacanina	Separazione reti fognarie				
Ulteriori impianti						
7 Vallecanto	Acquacanina	Imhoff	20	In corso istruttoria	Torrente Fiastrone	Unitaria
8 Rapacozzi 1	Fiastra	Imhoff	25	50/12° del 08/02/2008	Lago Fiastrone	Separata
9 Rapacozzi 2	Fiastra	Imhoff	25	50/12° del 08/02/2008	Lago Fiastrone	Separata
10 Collesanto	Fiastra	Imhoff	50	50/12° del 08/02/2008	Fosso senza nome poi Lago Fiastrone	Unitaria
11 Boccioni	Fiastra	Imhoff	20	50/12° del 08/02/2008	Fosso senza nome poi Lago Fiastrone	Separata
12 Planinventre	Fiastra	Imhoff	40	50/12° del 08/02/2008	Fosso senza nome poi Lago Fiastrone	Unitaria

Inoltre, i laghi che ospitano fioriture da specie tossiche danno origine anche ad un nuovo e pericoloso fattore di rischio, la cui incidenza non è ancora del tutto valutabile. Sia le microcistine che le cilindrospermopsine sono in grado di percolare attraverso gli strati geologici che formano la cuvetta lacustre, e da questi raggiungono i terreni e le falde idriche circostanti, che concorrono alla creazione dei laghi stessi (Dodds, 2002).

Dalle falde le tossine raggiungono le riserve e i pozzi artesiani creati per usi potabili, e da questi le reti idriche cittadine. (Ueno, 1996; Eynard, 2000; Fleming, 2002). Queste evidenze sono state riscontrate anche in Italia (Messineo, 2006; Bruno, 2008; Messineo, 2009) e come in altri Paesi, sono con ogni probabilità tipiche di tutte le situazioni in cui si sono attestate fioriture tossiche.

Nel corso di questo studio non è stato possibile ricercare la eventuale presenza di tossine nelle reti idriche dei centri abitati che circondano i laghi del Fiastrone. La prosecuzione degli studi sul complesso lacustre non dovrà trascurare questo nuovo aspetto di rischio.

Nel quadro generale di una riduzione del rischio andrà velocizzato per quanto possibile l'approvvigionamento di depuratori adeguati per tutte le fonti di inquinamento puntiforme afferenti al bacino idrico del fiume Fiastrone. Fondamentale, inoltre, sarà la diminuzione nell'area dello stesso dell'uso di concimi artificiali in agricoltura, per evitare il dilavamento di eccessive quantità di azoto dai territori circostanti il fiume.

A questo scopo potrà essere utile sperimentare l'uso di nuovi trattamenti terziari per l'abbattimento dei nutrienti primari nel fiume prima dell'ingresso nel lago Fiastrone.

Sarà fondamentale, inoltre, continuare il controllo e la valutazione dei livelli di nutrienti e dell'entità delle biomasse tossiche presenti nei laghi per gli anni a venire, in modo da verificare l'efficacia dei nuovi impianti fognari nella diminuzione delle immissioni contaminanti.

BIBLIOGRAFIA

- Abe T, Lawson T, Weyers JDB, Codd GA. Microcystin-LR inhibits photosynthesis of *Phaseolus vulgaris* primary leaves: implications on current spray irrigation practice. *New Phytol* 1996;133:651-8.
- Akcaalan R, Young FM, Metcalf JM, Morrison LF, Albay M, Codd GA. Microcystin analysis in single filaments of *Planktothrix* spp. in laboratory cultures and environmental blooms. *Water Research* 2006;40:1583-90.
- Babinska A, Ehrlich YH, Kornecki E. Activation of human platelets by protein kinase C antibody: role for surface phosphorylation in homeostasis. *Am J Physiol* 1996;271:H2134-H2144.
- Bischoff K. The toxicology of microcystin-LR: occurrence, toxicokinetics, toxicodynamics, diagnosis and treatment. *Vet Human Toxicol* 2001;43(5):294-7.
- Bruno M, Gucci PMB, Pierdominici E, Sestili P, Ioppolo A, Sechi N, Volterra L. Microcystin-like toxins in different freshwater species of *Oscillatoria*. *Toxicon* 1992;30(10):1307-11.
- Bruno M, Mazza R, Capelli G, Teoli P, Di Corcia A, Messineo V, Melchiorre S. Toxin contamination of surface and subsurface water bodies connected with Lake Vico's watershed (Central Italy). In: Romero JD, Molina PS (Ed.). *Drinking water. Contamination, toxicity and treatment*. New York: Novascience Publishers; 2008. p. 1-100.
- Bruno M, Messineo V, Mattei D, Melchiorre S. Dinamica di specie algali tossiche nei laghi di Albano e di Nemi. Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2004 (Rapporti Istisan 04/32).
- Bury NR, Flik G, Eddy FB, Codd GA. The effects of cyanobacteria and the cyanobacterial toxin microcystin-LR on Ca²⁺ transport and Na⁺/K⁺-ATPase in *Tilapia* gills. *The Journal of Experimental Biology* 1996;199:1319-26.
- Chorus I, Bartram J. (Ed.) *WHO. Toxic cyanobacteria in water. A guide to their public health consequences, monitoring and management*. London and New York: E. & F.N. Spon, 1999.
- Christoffersen K. Ecological implications of cyanobacterial toxins in aquatic food webs. *Phycologia* 1996;35:42-50.
- Codd GA, Bell SG, Kaya K, Ward CJ, Beattie KA, Metcalf JS. Cyanobacterial toxins, exposure routes and human health. *Eur J Phycol.* 1999;34:405-15.
- 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;37:1181-5.
- Dodds WK. *Freshwater Ecology. Concepts and Environmental Applications*. San Diego, USA: Academic Press; 2002.
- Ernst B, Hoeger SJ, O'Brien E, Dietrich DR. Oral toxicity of the microcystin-containing cyanobacterium *Planktothrix rubescens* in European whitefish (*Coregonus lavaretus*). *Aquatic Toxicology* 2006;79:31-40.
- Eynard F, Mez K, Walther JL. Risk of cyanobacterial toxins in Riga waters (Latvia). *Water Res.* 2000;34:2979-88.
- Falconer IR, Beresford A, Runnegar MTC. Evidence of liver damage in human populations exposed to toxin from a bloom of the blue-green alga *Microcystis aeruginosa* in a drinking water supply reservoir. *Med J Aust* 1983;1:511-5.
- Falconer IR, Buckley TH. Tumor promotion by *Microcystis* sp, a blue-green alga occurring in water supplies. *Med J Aust* 1989;150:351.

- Falconer IR, Burch M.D, Steffensen D, Choisce M, Coverdale OR. Toxicity of the blue-green alga (Cyanobacterium) *Microcystis aeruginosa* in drinking water to growing pigs, as an animal model for human injury and risk assessment. *Environ Toxicol Water Qual.* 1994;9:131.
- Fitzgeorge RB, Clark SA, Keevil CW. Routes of intoxication. In: Codd GA, Jefferies TM, Keevil CW, Rosser E. (Ed.). *Detection methods for Cyanobacterial Toxins*. Cambridge, UK: The Royal Society of Chemistry; 1997. p.69-77.
- Fleming LE, Rivero C, Burns J, William C, Bean JA, Shea KA, Stinn J. Blue green algae (cyanobacterial) toxins, surface drinking water, and liver cancer in Florida. *Harmful Algae* 2002;1:57-168.
- Ford SL, Abayasekara DRE, Persaud SJ, Jones PM. Role of phosphoprotein phosphatases in the corpus luteum: I Identification and characterization of serine/threonine phosphoprotein phosphatases in isolated rat luteal cells. *Jour of Endocrinol* 1996;150:205-11.
- Freitas de Magalhaes V, Soares MR, Azevedo SMFO. Microcystin contamination in fish from the Jacarepaguà Lagoon (Rio de Janeiro, Brazil): ecological implications and human health risk. *Toxicon* 2001;39:1077-85.
- Gjolme N, Utkilen H. The extraction and stability of microcystin-RR in different solvents. *Phycologia* 1996;35(Suppl. 6):80-2.
- Harada KI, Teuji K. Persistence and decomposition of hepatotoxic Microcystins produced by Cyanobacteria in natural environment. *J Toxicol - Toxin reviews* 1998;17(3):385-403.
- Hernandez M, Macia M, Padilla C, Del Campo F. Modulation of human polymorphonuclear leukocyte adherence by cyanopeptide toxins. *Environ Res Section A* 2000;84:64-8.
- Humpage AR, Hardy SJ, Moore EJ, Froscio SM, Falconer IR. Microcystins (cyanobacterial toxins) in drinking water enhance the growth of aberrant crypt foci in the mouse colon. *J of Toxicol and Environ Health Part A* 2000;61:155-65.
- IRSA. Metodi analitici per le acque. Quaderno 100(2). Quaderni IRSA. Roma: CNR, Istituto Poligrafico e Zecca dello Stato; 1994.
- Jurczak T, Tarczynska M, Karlsson K, Meriluoto J. Characterization and diversity of cyanobacterial hepatotoxins (microcystins) in blooms from Polish fresh- waters identified by liquid chromatography–electrospray ionization mass spectrometry. *Chromatographia* 2004;59:571-8.
- Kurku-Elasmo K, Meriluoto J. Microcystin uptake inhibits growth and protein phosphatase activity in mustard (*Sinapis alba* L.) seedlings. *Toxicon* 1998;36(12):1921-6.
- Kurmayer R, Christiansen G, Fastner J, Borner T. Abundance of active and inactive microcystin genotypes in populations of the toxic cyanobacterium *Planktothrix* spp. *Environmental Microbiology* 2004;6(8):831-41.
- Landner L, Wahlgren U. Eutrophication of lakes and reservoirs in warm climates. *Environmental Health Series*, part 1: eutrophication problems and control. World Health Organization, Copenhagen, 1988.
- Leiers T, Bihlmayer A, Ammon HPT, Wahl MA. [Ca²⁺]_i- and insulin-stimulating effect of the non-membranepерmeable phosphatase-inhibitor microcystin-LR in intact insulin-secreting cells (RINm5F). *Brit Jour Pharmacol* 2000;130:1406-10.
- Magalhaes VF, Marinhao MM, Domingos P, Oliverira AC, Costa SM, Azevedo LO, Azevedo SMFO. Microcystins (cyanobacterial hepatotoxins) bioaccumulation in fish and crustaceans from Sepetiba Bay (Brasil, RJ). *Toxicon* 2003;42:289-95.
- Mankiewicz J, Tarczynska M, Fladmark KE, Doskeland SO, Walter Z, Zalewski M. Apoptotic effect of cyanobacterial extract on rat hepatocytes and human lymphocytes. *Environmental Toxicol* 2001;16(3):225-33.
- Manti G, Bruno M. La cilindrospermopsina: un esempio di tossina algale di recente diffusione. *Ambiente, Risorse, Salute* 2004;99:21-4.

- Mc Dermott CM, Nho CW, Howard W, Holton B. The cyanobacterial toxin, microcystin-LR, can induce apoptosis in a variety of cell types. *Toxicon* 1998;36(12):1981-96.
- McElhiney J, Lawton LA, Leifert C. Investigations into the inhibitory effects of microcystins on plant growth, and the toxicity of plant tissues following exposure. *Toxicon* 2001;39:1411-20.
- McFeters G A, Bond PJ, Olson SB, Tchan YT. A comparison of microbial bioassays for the detection of aquatic toxicants. *Water Research* 1983;17(12):1757-62.
- Meriluoto J, Eriksson J. Rapid analysis of peptide toxins in cyanobacteria. *Journal of Chromatography* 1988;438:93-9.
- Messineo V, Bogialli S, Melchiorre S, Sechi N, Luglie` A, Casiddu P, Mariani MA, Padedda BM, Di Corcia A, Mazza R, Carloni E, Bruno M. Cyanobacterial toxins in Italian freshwaters. *Limnologica* 2009;39:95-106.
- Messineo V, Mattei D, Melchiorre S, Salvatore G, Bogialli S, Salzano R, Mazza R, Capelli G, Bruno M. Microcystin diversity in a *Planktothrix rubescens* population from Lake Albano (Central Italy). *Toxicon* 2006;48:160-74.
- Ming-Yong L, Hung-tu L. Protein phosphatase inhibitors enhance the expression of an α -amylase gene, α Amy3, in cultured rice cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1994;205(1):807-16.
- Mohamed ZA, Carmichael WW, Hussein AA. Estimation of microcystin in the freshwater fish *Oreochromis niloticus* in an Egyptian fish farm containing a microcystin bloom. *Environmental toxicol* 2003;18:137-141.
- Mohamed ZA. Accumulation of cyanobacterial hepatotoxins by *Daphnia* in some Egyptian irrigation canals. *Ecotoxicology and Environmental Safety (Environmental Research, Section B)* 2001;50:4-8.
- Nishiwaki-Matsushima R, Ohta T, Nishiwaki S, Suganuma M, Kohyama K, Ishikawa T, Carmichael WW, Fujiki H. Liver tumor promotion by the cyanobacterial cyclic peptide toxin microcystin-LR. *J Cancer Res Clin Oncol* 1992;118:420-4.
- Pflugmaker S, Codd GA, Steinberg CEW. Effects of the cyanobacterial toxin microcystin-LR on detoxication enzymes in aquatic plants. *Environ Toxicol* 1999;14:111-5.
- 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.
- Pouria S, de Andrade A, Barbosa J, Cavalcanti RL, Barreto VTS, Ward CJ, Preiser W, Poon GK. Fatal microcystin intoxication in haemodialysis unit in Caruaru, Brazil. *The Lancet* 1998;352:21-6.
- Rojas M, Nunez MT, Zambrano F. Inhibitory effect of a toxic peptide isolated from a waterbloom of *Microcystis* sp. (cyanobacteria) on iron uptake by rabbit reticulocytes. *Toxicon* 1990;28(11):1325-32.
- Romanowska-Duda Z, Mankiewicz J, Tarczynska M, Walter Z, Zalewski M. The effect of toxic cyanobacteria (blue-green algae) on water plants and animal cells. *Polish Journal of Environmental Studies* 2002;11(5):561-6.
- Romanowska-Duda Z, Tarczynska M. The influence of microcystin-LR and hepatotoxic cyanobacterial extract on the water plant *Spirodela oligorrhiza*. *Environ Toxicol* 2002;17:434-40.
- Sayed SB, Whitehouse BJ, Jones PM. Phosphoserine/threonine phosphatases in the rat adrenal cortex: a role in the control of steroidogenesis? *Jour Endocrinol* 1997;154:449-58.
- 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 algali tossiche nelle acque italiane: gestione del rischio ed evidenze epidemiologiche*. Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2005 (Rapporti Istisan 05/29) p. 17-29.

- Smith JL, Haney JF. Foodweb transfer, accumulation and depuration of microcystins, a cyanobacterial toxin in pump-kinseed sunfish (*Lepomis gibbosus*). *Toxicon* 2006;48:580-9.
- Smith RD, Wilson JE, Walker JC, Baskin TI. Protein-phosphatase inhibitors block root hair growth and alter cortical shape of Arabidopsis roots. *Planta* 1994;194:516-24.
- Soares RM, Yuan M, Servaites JC, Delgado A, Magalhaes VF, Hilborn ED, Carmichael WW, Azevedo SMFO. Sublethal exposure from microcystins to renal insufficiency patients in Rio de Janeiro, Brazil. *Environmental Toxicology* 2006;21:1035-42.
- Soong FS, Maynard E, Kirke K, Luke C. Illness associated with blue-green algae. *Med J Aust* 1992;156:67.
- Takeda S, Mano S, Ohto M, Nakamura K. Inhibitors of protein phosphatases 1 and 2a block the sugar-inducible gene expression in plants. *Plant Physiol* 1994;106:567-74.
- Teixeira da Gloria Lima Crux M, Da Conceicao Nascimento Costa M, Lucia Pires de Carvalho V, Dos Santos Pereira M, Hage E. Gastroenteritis epidemic in the area of the Itaparica dam - Bahia Brazil. *Bulletin of the Pan American Health Organization* 1993;27(3):244-53.
- Turner PC, Gammie AJ, Hollinrake K, Codd GA. Pneumonia associated with contact with cyanobacteria. *Brit Med J* 1990;300:1440-1.
- Ueno Y, Nagata S, Tsutsumi T, Hasegawa A, Watanabe M, Park HD, Chen GC, Chen G, Yu SZ. 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(6):1317-21.
- US Environmental Protection Agency. *Toxicological reviews of cyanobacterial toxins: microcystins LR, RR, YR and LA (external review draft)*. Washington, DC: US Environmental Protection Agency, 2006. EPA/66/R-06/139.
- Vasconcelos VM. Accumulation and depuration of the heptapeptide toxin microcystin-LR in *Mytilus galloprovincialis*. *Aquatic Toxicology* 1995;32:227-37.
- Watanabe MF, Park HD, Kondo F, Harada KI, Hayashi H, Okino T. Identification and estimation of microcystins in freshwater mussels. *Natural Toxins* 1997;5:31-5.
- Weiss J, Liebert HP, Braune W. Influence of Microcystin-RR on growth and photosynthetic capacity of the duckweed *Lemna minor L.* *Journal of Applied Botany* 2000;74:100-105.
- Welker M, Von Dohren, H. Cyanobacterial peptide – nature' own combinatorial biosynthesis. *FEMS Microbiol Rev* 2006;30:530-63.
- WHO. *Guidelines for Drinking-water Quality*. Vol. 1, 3rd ed. Geneva: WHO; 2004.
- Williams DE, Craig M, Dawe SC, Kent ML, Andersen RJ, Holmes CFB. ¹⁴C-labeled microcystin-LR administered to Atlantic salmon via intraperitoneal injection provides in vivo evidence for covalent binding of microcystin-LR in salmon livers. *Toxicon* 1997;35(6):985-9.
- Zambrano F, Canelo E. Effects of microcystin-LR on the partial reactions of the Na⁺ - K⁺ pump of the gill of carp (*Cyprinus carpio Linneo*). *Toxicon* 1996;34(4):451-8.
- Zhou L, Yu H, Chen K. Relationship between microcystin in drinking water and colorectal cancer. *Biomedical and Environmental Sciences* 2002;15:166-71.
- Zimba PV, Khoo L, Gaunt PS, Brittain S, Carmichael WW. Confirmation of catfish, *Ictalurus punctatus* (Rafinesque), mortality from Microcystis toxins. *Journal of Fish Disease* 2001;24:41-7.

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

*Stampato da Tipografia Facciotti srl
Vicolo Pian Due Torri 74, 00146 Roma*

Roma, luglio-settembre 2009 (n. 3) 5° Suppl.