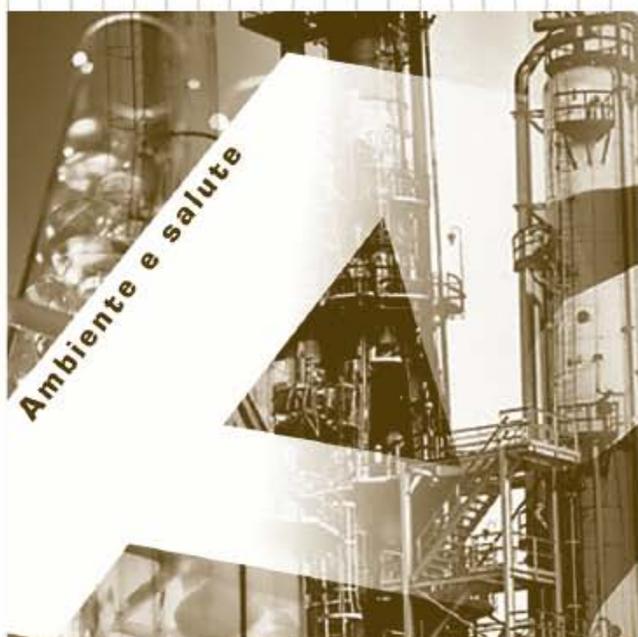




Rapporti

ISTISAN

11/35 Pt.1



**Cianobatteri in acque destinate
al consumo umano**

**STATO DELLE CONOSCENZE
PER LA VALUTAZIONE DEL RISCHIO**

Volume 1



ISSN 1123-3117

A cura di
L. Lucentini e M. Ottaviani
per il "Gruppo nazionale per la gestione
del rischio cianobatteri in acque
destinate al consumo umano"

www.iss.it

ISTITUTO SUPERIORE DI SANITÀ

Cianobatteri in acque destinate al consumo umano

**STATO DELLE CONOSCENZE
PER LA VALUTAZIONE DEL RISCHIO**

Volume 1

a cura di
Luca Lucentini e Massimo Ottaviani
per il “Gruppo nazionale per la gestione del rischio cianobatteri
in acque destinate a consumo umano”

Dipartimento di Ambiente e Connessa Prevenzione Primaria

ISSN 1123-3117

**Rapporti ISTISAN
11/35 Pt. 1**

Istituto Superiore di Sanità

Cianobatteri in acque destinate a consumo umano. Stato delle conoscenze per la valutazione del rischio. Volume 1.

A cura di Luca Lucentini e Massimo Ottaviani per il “Gruppo nazionale per la gestione del rischio cianobatteri in acque destinate a consumo umano”

2011, xxii, 165 p. Rapporti ISTISAN 11/35 Pt. 1

Il volume presenta il quadro delle conoscenze sulla valutazione del rischio da cianobatteri e loro tossine in acque destinate a consumo umano fornendo strumenti necessari per la definizione della probabilità di accadimento e la stima del potenziale impatto di fenomeni di contaminazioni massive di cianobatteri in invasi destinati alla produzione di acqua potabile. Sono anche indicati gli elementi fondamentali per la strutturazione dei piani di monitoraggio e le misure di prevenzione e mitigazione del rischio nell'intera filiera idro-potabile. Trattazione specifica è rivolta all'assetto normativo sulla problematica con la definizione dei valori di riferimento nazionali per le cianotossine nelle acque destinate a consumo umano ai sensi del DL.vo 31/2001 e s.m.i. Il rapporto si coordina con il volume Rapporti ISTISAN 11/35 Pt. 2, relativo alla definizione delle linee guida per la gestione del rischio da cianobatteri nelle acque per consumo umano. Questo volume contiene anche la Prefazione e la Premessa comuni alle due parti oltre al dettaglio del Piano dell'opera.

Parole chiave: Cianobatteri; Cianotossine; Acque destinate a consumo umano; Acque potabili; Valutazione del rischio; Gestione del rischio

Istituto Superiore di Sanità

Cyanobacteria in water for human consumption. State of knowledge for risk assessment. Volume 1.

Edited by Luca Lucentini and Massimo Ottaviani for “National Group for cyanobacteria risk management in water for human consumption”

2011, xxii, 165 p. Rapporti ISTISAN 11/35 Pt. 1 (in Italian)

This volume reports the state of knowledge on risk assessment on cyanobacteria and their toxins in water intended for human consumption. Specific tools are provided to define the probability of occurrence and the estimation of the potential impact of the phenomenon of massive contamination of cyanobacteria in reservoirs for the production of drinking water. Based on the scientific data and technical knowledge reported in the volume, the essential elements for structuring of the monitoring plans and measures for prevention and mitigation of risk throughout the drinking water supply chain are established. The legal framework on cyanobacteria impact is discussed, with the definition of national reference values for cyanotoxins in water intended for human consumption under DL.vo 31/2001 and subsequent amendments. The document is coordinated with the report Rapporti ISTISAN 11/35 Pt. 2, concerning the definition of guidelines for the cyanobacteria risk management in water for human consumption. This volume contains the Preface and the Presentation common to both parts as well as the details of the publication plan.

Key words: Cyanobacteria; Cyanotoxins; Water for human consumption; Drinking water; Risk assessment; Risk management

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

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

Citare questo documento come segue:

Lucentini L, Ottaviani M per il “Gruppo nazionale per la gestione del rischio cianobatteri in acque destinate a consumo umano” (Ed.). *Cianobatteri in acque destinate a consumo umano. Stato delle conoscenze per la valutazione del rischio. Volume 1*. Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2011. (Rapporti ISTISAN 11/35 Pt. 1).

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.



Il documento è stato realizzato da:

Gruppo nazionale per la gestione del rischio cianobatteri in acque destinate a consumo umano

Coordinamento

Massimo Ottaviani*	Dipartimento di Ambiente e Connessa Prevenzione Primaria, Istituto Superiore di Sanità, Roma
Luca Lucentini	Dipartimento di Ambiente e Connessa Prevenzione Primaria, Istituto Superiore di Sanità, Roma

Normativa e procedure

Liliana La Sala	Direzione Generale Prevenzione Sanitaria, Ministero della Salute, Roma
Rossella Colagrossi	Direzione Generale Prevenzione Sanitaria, Ministero della Salute, Roma
Lucia Bonadonna	Dipartimento di Ambiente e Connessa Prevenzione Primaria, Istituto Superiore di Sanità, Roma
Paola Bottoni	Dipartimento di Ambiente e Connessa Prevenzione Primaria, Istituto Superiore di Sanità, Roma

Biologia dei cianobatteri

Patrizia Albertano	Dipartimento di Biologia, Università di Roma Tor Vergata, Roma
--------------------	--

Limnologia ed ecologia dei cianobatteri

Neil Thomas William Ellwood	Dipartimento di Scienze Geologiche, Università di Roma 3, Roma
Aldo Marchetto	Istituto per lo Studio degli Ecosistemi, Consiglio Nazionale delle Ricerche, Pallanza

Specie tossiche e produzione di cianotossine

Emanuela Viaggiu**	Dipartimento di Biologia, Università di Roma Tor Vergata, Roma
Giuseppe Morabito	Istituto per lo Studio degli Ecosistemi, Consiglio Nazionale delle Ricerche, Pallanza
Simonetta Della Libera	Dipartimento di Ambiente e Connessa Prevenzione Primaria, Istituto Superiore di Sanità, Roma

Valutazione del rischio da cianotossine e valori di riferimento

Laura Achene	Dipartimento di Ambiente e Connessa Prevenzione Primaria, Istituto Superiore di Sanità, Roma
Lucia Bonadonna	Dipartimento di Ambiente e Connessa Prevenzione Primaria, Istituto Superiore di Sanità, Roma
Luca Lucentini	Dipartimento di Ambiente e Connessa Prevenzione Primaria, Istituto Superiore di Sanità, Roma
Massimo Ottaviani*	Dipartimento di Ambiente e Connessa Prevenzione Primaria, Istituto Superiore di Sanità, Roma

Metodi di identificazione di cianobatteri

Roberta Congestri	Dipartimento di Biologia, Università di Roma Tor Vergata, Roma
Emanuela Viaggiu**	Dipartimento di Biologia, Università di Roma Tor Vergata, Roma
Domenico D'Alenio	IASMA Research and Innovation Centre, Fondazione Edmund Mach, San Michele all'Adige

Metodi innovativi e in-situ per il controllo di cianobatteri

Giuseppe Morabito	Istituto per lo Studio degli Ecosistemi, Consiglio Nazionale delle Ricerche, Roma
Mariano Bresciani	Istituto per il Rilevamento Elettromagnetico dell'Ambiente, Consiglio Nazionale delle Ricerche, Milano
Andrea Lami	Istituto per lo Studio degli Ecosistemi, Consiglio Nazionale delle Ricerche, Pallanza

Metodi di determinazione di cianotossine

Sara Bogialli	Dipartimento di Scienze Chimiche, Università degli Studi di Padova, Padova
Luca Lucentini	Dipartimento di Ambiente e Connessa Prevenzione Primaria, Istituto Superiore di Sanità, Roma
Anna Milandri	Centro Ricerche Marine, Cesenatico
Federica Nigro Di Gregorio	Dipartimento di Ambiente e Connessa Prevenzione Primaria, Istituto Superiore di Sanità, Roma
Valentina Fuscoletti	Dipartimento di Ambiente e Connessa Prevenzione Primaria, Istituto Superiore di Sanità, Roma

Misure di prevenzione alla captazione

Neil Thomas William Ellwood	Dipartimento di Scienze Geologiche, Università di Roma 3, Roma
Pier Paolo Abis	Acquedotto Pugliese, Bari
Lorenza Meucci	Società Metropolitana Acque, Torino
Franca Palumbo	Laboratori Iren Acqua Gas, Genova

Sistemi e procedure di monitoraggio dell'invaso

Nicola Ungaro	ARPA Puglia – Sezione Bari, Bari
Vera Sangiorgi	ARPA Lazio – Sezione Latina, Latina
Ilen Bianco	ARPA Lazio – Sezione Latina, Latina

Trattamenti di acque contaminate da cianobatteri e loro tossine

Enrico Veschetti	Dipartimento di Ambiente e Connessa Prevenzione Primaria, Istituto Superiore di Sanità, Roma
Pier Paolo Abis	Acquedotto Pugliese, Bari
Lorenza Meucci	Società Metropolitana Acque, Torino
Franca Palumbo	Laboratori Iren Acqua Gas, Genova
Emanuele Ferretti	Dipartimento di Ambiente e Connessa Prevenzione Primaria, Istituto Superiore di Sanità, Roma
Sara Bogialli	Dipartimento di Scienze Chimiche, Università degli Studi di Padova, Padova

Sistemi di sorveglianza, allerta e gestione delle emergenze

Massimo Ottaviani*	Dipartimento di Ambiente e Connessa Prevenzione Primaria, Istituto Superiore di Sanità, Roma
Luca Lucentini	Dipartimento di Ambiente e Connessa Prevenzione Primaria, Istituto Superiore di Sanità, Roma
Rossella Colagrossi	Direzione Generale Prevenzione Sanitaria, Ministero della salute, Roma
Maria Mattiacci Delle Salette***	ASL Roma C, Roma
Patrizia Albertano	Dipartimento di Biologia, Università di Roma Tor Vergata, Roma

Informazione e comunicazione sul rischio

Barbara De Mei	Centro Nazionale di Epidemiologia, Sorveglianza e Promozione della Salute, Istituto Superiore di Sanità, Roma
Daniela Mattei	Dipartimento di Ambiente e Connessa Prevenzione Primaria, Istituto Superiore di Sanità, Roma
Maria Mattiacci Delle Salette***	ASL Roma C, Roma
Eva Benelli	Agenzia di Editoria Scientifica Zadig, Roma

Osservatorio epidemiologico e modelli di sorveglianza sindromica

Cinzia Germinario	Dipartimento di Scienze Biomediche ed Oncologia Umana, Università degli Studi di Bari Aldo Moro, Bari
Rosa Prato	Dipartimento di Scienze Mediche e del Lavoro, Università degli Studi di Foggia, Foggia
Silvio Tafuri	Dipartimento di Scienze Biomediche ed Oncologia Umana, Università degli Studi di Bari Aldo Moro, Bari
Domenico Martinelli	Dipartimento di Scienze Mediche e del Lavoro, Università degli Studi di Foggia, Foggia

Editing

Luca Lucentini	Dipartimento di Ambiente e Connessa Prevenzione Primaria, Istituto Superiore di Sanità, Roma
Patrizia Albertano	Dipartimento di Biologia, Università di Roma Tor Vergata, Roma
Franca Palumbo	Laboratori Iren Acqua Gas, Genova
Maria Mattiacci Delle Salette***	ASL Roma C, Roma
Daniela Mattei	Dipartimento di Ambiente e Connessa Prevenzione Primaria, Istituto Superiore di Sanità, Roma
Laura Achene	Dipartimento di Ambiente e Connessa Prevenzione Primaria, Istituto Superiore di Sanità, Roma

Segreteria tecnica

Mattea Chirico	Dipartimento di Ambiente e Connessa Prevenzione Primaria, Istituto Superiore di Sanità, Roma
Federica Nigro Di Gregorio	Dipartimento di Ambiente e Connessa Prevenzione Primaria, Istituto Superiore di Sanità, Roma
Valentina Fuscoletti	Dipartimento di Ambiente e Connessa Prevenzione Primaria, Istituto Superiore di Sanità, Roma
Ilaria Di Giacomo	Dipartimento del Farmaco, Istituto Superiore di Sanità, Roma

* dal 1° luglio 2011 collabora come esperto

** Collabora come membro esperto di AlgaRes srl, c/o Parco Scientifico Università degli Studi di Roma Tor Vergata, Roma

*** dal 1° novembre 2011 collabora come esperto

INDICE

Prefazione	ix
Premessa	xii
Piano dell'opera	
<i>Luca Lucentini, Massimo Ottaviani, Patrizia Albertano</i>	xv

SEZIONE 1

Elementi di valutazione del rischio

1.1. Fattori ambientali che presiedono alla proliferazione di cianobatteri	
<i>Neil Thomas William Ellwood, Aldo Marchetto</i>	3
1.1.1. Intensità della luce subacquea	3
1.1.2. Luce e temperatura	4
1.1.3. Regolazione della profondità di galleggiamento	5
1.1.4. Nutrienti	6
Bibliografia	9
1.2. Specie tossiche	
<i>Emanuela Viaggiu, Giuseppe Morabito, Simonetta Della Libera</i>	11
1.2.1. Introduzione	11
1.2.2. Metaboliti secondari	13
1.2.3. Distribuzione geografica dei cianobatteri tossici nei laghi italiani	14
Bibliografia	20
1.3. Tossine da cianobatteri: proprietà chimiche e tossicità	
<i>Laura Achene</i>	26
1.3.1. Peptidi ciclici.....	26
1.3.1.1. Microcistine.....	26
1.3.1.2. Nodularine.....	30
1.3.1.3. Cilindrospermopsina	31
1.3.2. Alcaloidi	33
1.3.2.1. Anatossine	33
1.3.3. Altre tossine.....	33
1.3.3.1. Lingbiatossine	33
1.3.3.2. Aplisiatossina, debromoaplisiatossina.....	34
Bibliografia	34
1.4. Fenomeni tossici e impatto sulle acque per consumo umano in Italia	
<i>Simonetta Della Libera, Emanuela Viaggiu</i>	37
Bibliografia	44

SEZIONE 2

Normativa e valori di riferimento

2.1. Normativa nazionale	
<i>Lucia Bonadonna, Paola Bottoni</i>	49
2.1.1. Normativa sulle acque potabili	50
2.1.1.1. Decreto legislativo 31/2001.....	50
2.1.1.2. Decreto legislativo 152/2006.....	51
2.1.1.3. Decreto ministeriale 56/2009	51
2.1.1.4. Decreto ministeriale 260/2010	54

2.1.2. Normativa sulle acque di balneazione	54
2.1.2.1. Decreto legislativo 116/2008.....	54
2.1.3. Frequenze di monitoraggio.....	55
2.1.4. Conclusioni.....	55
Bibliografia	56
Allegato.....	58
2.2. Valori di riferimento internazionali	
<i>Emanuele Ferretti, Lucia Bonadonna</i>	61
Bibliografia	63
2.3. Valori di riferimento nazionali	
<i>Laura Achene, Massimo Ottaviani, Luca Lucentini</i>	64
2.3.1. Base decisionale	64
2.3.2. Approccio e criteri di valutazione.....	65
2.3.3. Valori di riferimento nazionali per le cianotossine.....	66
Bibliografia	67

SEZIONE 3

Metodi di sorveglianza e controllo

3.1. Identificazione, conteggio e quantificazione di cianobatteri tossici	
<i>Roberta Congestri, Domenico D'Alelio, Emanuela Viaggiu</i>	71
3.1.1. Tassonomia dei cianobatteri nello scenario del controllo delle acque	71
3.1.1.1. Problemi e prospettive dell'integrazione tra approcci tradizionali e molecolari.....	71
3.1.1.2. Il caso di alcune popolazioni italiane del genere <i>Planktothrix</i>	73
3.1.2. Metodi di identificazione e quantificazione di cianobatteri tossici	74
3.1.2.1. Identificazione al microscopio ottico	74
3.1.2.2. Identificazione e quantificazione al microscopio	75
3.1.2.3. Identificazione e quantificazione con metodi genetici.....	75
3.1.2.4. PCR convenzionale	76
3.1.2.5. Cluster genici di cianotossine come marker	76
3.1.2.6. Quantitative <i>real-time</i> PCR	77
Bibliografia	77
3.2. Metodi fluorimetrici <i>in situ</i>, pigmenti algali marcatori e <i>remote sensing</i>	
<i>Giuseppe Morabito, Mariano Bresciani, Andrea Lami</i>	81
3.2.1. Considerazioni generali	81
3.2.1.1. Fluorimetria <i>in situ</i>	81
3.2.2. Telerilevamento per la determinazione dei cianobatteri	83
3.2.2.1. Identificazione dei cianobatteri attraverso l'analisi dei pigmenti marcatori separati con HPLC	85
3.2.2.2. Stima delle concentrazioni limite di clorofilla-a per crescenti livelli di allerta	86
Bibliografia	87
3.3. Metodi di screening e conferma per la determinazione di cianotossine	
<i>Sara Bogialli, Luca Lucentini</i>	90
3.3.1. Campionamento per la ricerca di tossine algali	90
3.3.2. Metodi di screening.....	91
3.3.2.1. Saggi biologici <i>in vivo</i>	91
3.3.2.2. Metodi immunologici.....	91
3.3.2.3. Metodi biochimici	92
3.3.3. Metodi di conferma per la determinazione di cianotossine	92
3.3.3.1. Preparazione del campione per la determinazione di cianotossine	93
3.3.4. Conclusioni.....	96
Bibliografia	97
Allegato.....	101

SEZIONE 4

Misure di mitigazione del rischio

4.1. Misure di prevenzione: controlli alla captazione e sui nutrienti	
<i>Neil Thomas William Ellwood, Pier Paolo Abis, Lorenza Meucci, Franca Palumbo</i>	105
4.1.1. Aspetti generali	105
4.1.2. Sorgenti di nutrienti, eutrofizzazione e gestione	106
4.1.3. Modifiche idrodinamiche	108
4.1.4. Biocontrollo e biomanipolazione	108
4.1.5. Attività di monitoraggio	109
4.1.6. Controllo dei bloom algali	109
4.1.7. Procedure fisiche	110
4.1.8. Procedure chimiche	111
4.1.9. Conclusioni	111
Bibliografia	112
4.2. Trattamenti per la rimozione di cianobatteri e loro metaboliti	
<i>Enrico Veschetti, Pier Paolo Abis, Lorenza Meucci, Franca Palumbo</i>	116
4.2.1. Introduzione	116
4.2.2. Rimozione dei cianobatteri	117
4.2.2.1. Preossidazione	117
4.2.2.2. Microstaccatura	117
4.2.2.3. Filtrazione lenta	117
4.2.2.4. Trattamenti chimico-fisici convenzionali	118
4.2.2.5. Filtrazione su membrana	118
4.2.3. Rimozione delle cianotossine	119
4.2.3.1. Trattamenti chimico-fisici	120
4.2.3.2. Trattamenti chimici	121
4.2.3.3. Trattamenti biologici	123
Bibliografia	123
4.3. Prodotti di degradazione delle cianotossine	
<i>Sara Bogialli, Emanuele Ferretti</i>	125
4.3.1. Microcistine	126
4.3.2. Cilindrospermopsina	126
4.3.3. Anatossina	127
Bibliografia	127

APPENDICE A

Metodo analitico LC/MS/MS per la determinazione di microcistine in acque grezze e trattate da destinare a consumo umano

<i>Sara Bogialli, Luca Lucentini, Anna Milandri, Federica Nigro Di Gregorio, Valentina Fuscoletti</i>	129
---	-----

APPENDICE B

Metodi per la determinazione delle alghe

<i>Emanuela Viaggiu, Simonetta Della Libera, Roberta Congestri, Giuseppe Morabito</i>	143
---	-----

ACRONIMI

ADDA	<i>3-Amino-9-methoxy-2,6,8-trimethyl-10-phenyl-4,6-DecaDienoic Acid</i>
ALF	<i>Alert Level Framework</i>
API	<i>Atmospheric Pressure Ionization</i>
ATP	<i>Adenosine Triphosphate</i>
ANA-a	Anatossina-a
BMAA	<i>Beta-Methylamino-L-Alanine</i>
CCM	Centro Nazionale per la prevenzione e il Controllo delle Malattie
CID	<i>Collision Induced Dissociation</i>
CIMF	<i>Cyanobacterial Incident Management Framework</i>
CMA	Concentrazione Massima Ammissibile
CV	Coefficiente di Variazione
CYN	<i>Cylindrospermopsin</i>
d.i.	diametro interno
DAD	<i>Diode Array Detector</i>
DOC	<i>Dissolved Organic Carbon</i>
DP	<i>Declustering Potential</i>
DPI	Dispositivi di Protezione Individuali
DRP	<i>Dissolved Reactive Phosphorus</i>
DS	Deviazione Standard
EDTA	<i>EthyleneDiamineTetraacetic Acid</i>
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
EP	<i>Entrance Potential</i>
FEP	<i>Fluorinated Ethylene Propylene</i>
FLD	<i>Fluorescence Detector</i>
FP	<i>Focusing Potential</i>
FRP	<i>Filtred Reactive Phosphorus</i>
GAC	<i>Granular Activated Carbon</i>
GC	<i>Gas Cromatography</i>
GPS	<i>Global Positioning System</i>
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
HRMS	<i>High Resolution Mass Spectrometry</i>
IARC	<i>International Agency for Research on Cancer</i>
LC	<i>Liquid Chromatography</i>
LLE	<i>Liquid/Liquid Extraction</i>
LOD	<i>Limit of Detection</i> (limite di rivelabilità)
LPS	Lipopolisaccaridi
MC	Microcistine
MRM	<i>Multiple Reaction Monitoring</i>
MS	<i>Mass Spectrometry</i>
NOAEL	<i>No Observed Adverse Effect Level</i>
NOD	Nodularina
NOM	<i>Natural Organic Matter</i>
NRPS	<i>Non-Ribosomal Peptide Synthetase</i>
NTU	<i>Nephelometric Turbidity Unit</i>
PAC	<i>Powdered Activated Carbon</i>
PAR	<i>Photosynthetically Active Radiation</i>
PKS	<i>Polyketide Synthase</i>
POC	<i>Particulate Organic Carbon</i>
PTFE	Politetrafluoroetilene
Q-TOF	Quadrupole Time Of Flight

RF	<i>Response Factor</i>
RP	<i>Reactive Phosphorus</i>
SPE	<i>Solid Phase Extraction</i>
SRP	<i>Soluble Reactive Phosphorus</i>
TC	<i>Total Carbon</i>
TDI	<i>Tolerable Daily Intake</i>
TEF	<i>Toxicity Equivalent Factor</i>
TIC	<i>Total Inorganic Carbon</i>
TIS	<i>Turbo Ion Spray</i>
TLC	<i>Thin Layer Chromatography</i>
TOC	<i>Total Organic Carbon</i>
TP	<i>Total Phosphorus</i>
t_r	<i>tempo di ritenzione</i>
UPLC	<i>Ultra Performance Liquid Chromatography</i>
UV	<i>Ultraviolet Light</i>
VOC	<i>Volatile Organic Compound</i>
WHO	<i>World Health Organization</i>
WSP	<i>Water Safety Plan</i>

PREFAZIONE

La disponibilità di risorse idriche determina da sempre la possibilità di sviluppo di ogni civiltà e la qualità dell'acqua per il consumo umano presiede allo stato di salute della popolazione.

Il progresso nelle conoscenze sulle interrelazioni tra acqua e salute umana e, parallelamente, l'evoluzione culturale ed etica in materia di protezione ambientale ed equilibrio dei biosistemi, inquadrata in un obiettivo scenario economico e sociale, sono confluite, sul piano normativo, nell'attuale, coerente, *aquis* comunitario – fedelmente trasposto nella legislazione nazionale – in cui le problematiche sanitarie correlate agli utilizzi delle risorse idriche sono affrontate contestualmente a quelle più propriamente ambientali, attinenti la tutela integrale delle acque, a prescindere dalla loro origine e natura. I due obiettivi congiunti della legislazione europea in materia, per quanto articolata e complessa questa possa apparire, riguardano, infatti, da un lato il conseguimento di livelli di qualità delle acque che non producano impatti o rischi inaccettabili per la salute umana e per l'ambiente e, dall'altro, la garanzia di un utilizzo delle risorse idriche che risulti sostenibile nel lungo periodo.

Collocata in questo contesto la tutela e la sorveglianza della qualità delle acque destinate al consumo umano rappresenta una misura imprescindibile di prevenzione primaria nei confronti di malattie a carattere acuto, principalmente indotte da contaminanti microbiologici, e di patologie cronico-degenerative, riconducibili in generale a sostanze chimiche. Basti pensare, a riprova, che una semplice pratica come la disinfezione delle acque ha essenzialmente debellato molte malattie a carattere epidemico che hanno afflitto per millenni l'umanità, determinando effetti benefici sulla salute della popolazione di importanza analoga, se non addirittura superiore, a quella ottenuta con le terapie antibiotiche.

Le proliferazioni di cianobatteri in risorse idriche utilizzate per il consumo umano, la cui portata sta assumendo carattere di notevole rilevanza in Italia negli anni recenti, interessando la quasi totalità delle Regioni, rappresentano una fattispecie particolarmente rappresentativa nel contesto delle problematiche ambientali con potenziale impatto sulla salute. Alterazioni indotte, direttamente o indirettamente, dall'attività antropica in corpi idrici superficiali presiedono, infatti, ad una proliferazione abnorme di organismi normali costituenti del biota acquatico, in grado di originare metaboliti indesiderati o tossici (cianotossine), di compromettere la qualità delle acque e di causare un significativo rischio sanitario – che richiede una adeguata gestione – per la filiera idrica di produzione delle acque potabili.

Il Centro nazionale per la prevenzione e il Controllo delle Malattie (CCM), nelle sue funzioni di organismo di coordinamento tra il Ministero della Salute e le Regioni per le attività di sorveglianza, prevenzione e risposta tempestiva alle emergenze, ha dedicato una particolare attenzione al rischio da cianobatteri nelle risorse idriche con diverse destinazioni d'uso.

In questo contesto, sono stati prodotti due volumi coordinati sulla valutazione e gestione del rischio da cianobatteri in acque da destinare e destinate al consumo di cui fanno parte le linee guida per la prevenzione, il controllo e la mitigazione di fenomeni tossici a carico dei sistemi idrici. Questa pubblicazione si inserisce nell'ambito di un progetto CCM affidato al Reparto di Igiene delle Acque Interne del Dipartimento di Ambiente e Prevenzione Primaria dell'Istituto Superiore di Sanità (ISS), di concerto con il Dipartimento della Prevenzione del Ministero della Salute e in collaborazione con specialisti impegnati nella ricerca Universitaria sulla tematica, esperti del Servizio Sanitario Nazionale, Agenzie ambientali ed enti di ricerca sui corpi idrici, di primaria rilevanza nazionale, perseguendo un approccio metodologico interdisciplinare finalizzato alla tutela della salute umana e dell'ambiente.

L'elaborazione dei volumi e i successivi aggiornamenti pianificati richiedono un notevole impegno intellettuale e di tempo. Un ringraziamento sentito va pertanto a tutti gli esperti del *Gruppo di lavoro per la gestione del rischio da cianobatteri in acque destinate al consumo umano* e alle loro strutture di appartenenza per la particolare disponibilità e l'elevata competenza dimostrata nel corso dei lavori.

Gratitudine è altresì espressa agli altri numerosi colleghi che, a livello nazionale e internazionale, mediante un assiduo e qualificato confronto, hanno contribuito al miglioramento degli elaborati, così come agli utilizzatori dei volumi che vorranno trasmettere valutazioni critiche e suggerimenti per migliorare le informazioni, al fine di garantire azioni più efficaci a tutela della salute umana.

Fabrizio Oleari
*Direttore del Dipartimento
della Prevenzione e della Comunicazione
Ministero della Salute*

PREMESSA

La missione del Dipartimento di Ambiente e Connessa Prevenzione Primaria dell'Istituto Superiore di Sanità consiste nel valutare, sulla base delle evidenze scientifiche disponibili, l'impatto dei rischi ambientali sull'insorgenza e sviluppo delle malattie, in un'accezione pienamente consapevole del ruolo dei fattori socio-economici e culturali nel complesso della gestione della materia ambientale. Ciò nella provata convinzione che il progresso nelle acquisizioni scientifiche e una adeguata applicazione delle conoscenze siano il principale supporto nella prevenzione e gestione delle emergenze e, più in generale, per azioni politiche e normative appropriate, secondo logiche di costo-efficacia volte a garantire la piena sostenibilità ambientale e un elevato grado di protezione della salute.

Tale impegno – collocato in un contesto di attuale crisi economica che potrebbe avere tra gli effetti una limitazione delle risorse destinate alla protezione e sorveglianza ambientale nel suo complesso – deve oggi privilegiare gli aspetti più emergenti e critici nella prevenzione dei rischi sanitari di natura ambientale e garantire il governo più che mai razionale ed efficiente delle forze in campo. Tenendo conto, nel contempo, che nuovi fattori di pressione stanno negli anni recenti modificando lo scenario globale delle relazioni ambiente-salute, e i cambiamenti climatici rischiano di compromettere, in misura ancora tutt'altro che definita, prerequisiti fondamentali per il benessere dell'uomo quali la qualità delle acque e dell'aria e la produzione primaria.

In questo quadro, viene considerato di prioritaria importanza supportare a livello tecnico-scientifico il controllo integrato delle risorse idriche con una valutazione e gestione dei rischi che, riconoscendo le diverse interconnessioni tra caratteristiche delle acque e specifici utilizzi delle risorse, definisca l'impatto delle attività umane sulla qualità delle acque e, di riflesso, le potenziali ricadute degli usi della risorsa sulla salute umana.

Riferendosi alle relazioni salute-acqua, in questi ultimi anni, le problematiche legate allo sviluppo di cianobatteri nei corpi idrici, e il conseguente potenziale impatto sulla salute della popolazione attraverso l'utilizzo delle acque, stanno coinvolgendo molteplici risorse Dipartimentali con risultati senz'altro rilevanti in termini di progressi nella ricerca, sul piano nazionale e internazionale, e di supporto istituzionale alle Autorità Sanitarie e alle Agenzie Ambientali. Le tematiche afferenti al rischio da cianobatteri coinvolgono, infatti, con una considerevole ricorrenza, diversi Reparti che, in funzione delle specifiche esperienze e competenze, e con un elevato grado di collaborazione intra e interdipartimentale, contribuiscono a sostenere settori cruciali dal punto di vista sanitario, ambientale, sociale ed economico connessi all'utilizzo umano delle risorse idriche.

Più specificamente, nell'attuale struttura, il Reparto di Igiene delle acque interne, che ha curato l'elaborazione delle linee guida e del volume di approfondimenti coordinato, è principalmente impegnato nel supporto alla valutazione e gestione del rischio correlato alla presenza di cianobatteri e loro tossine nelle acque destinabili al consumo umano, con specifica attenzione alle metodologie analitiche, criteri di intervento, modalità di trattamento di potabilizzazione ed eventuali limitazioni d'uso e ricadute sanitarie. Gli aspetti inerenti la valutazione e gestione del rischio cianobatteri in relazione ad altri utilizzi delle acque, quali quelli ricreazionali, e l'elaborazione di adeguate strategie e metodologie di intervento in tale ambito, costituiscono la principale area di interesse del Reparto di Qualità degli ambienti acquatici e delle acque di balneazione, mentre l'impatto dei cianobatteri sulle produzioni della pesca e dell'acquacoltura e, più in generale, sul biota acquatico, è uno dei settori di attività condotte in materia da parte degli esperti del Reparto di Qualità ambientale e itticoltura.

In questa direzione la strutturazione di un gruppo di lavoro composto da molteplici Enti di primaria rilevanza nel campo della ricerca e del controllo e l'elaborazione dei due volumi sulla valutazione e gestione dei rischi da cianobatteri nelle acque per consumo umano, può fornire un significativo contributo del Dipartimento a supporto di decisioni complesse su fenomeni con impatto rilevante sulla qualità della filiera idro-potabile e la sicurezza al consumo delle acque e con risvolti importanti sul piano ambientale e sociale.

Loredana Musmeci
*Direttore del Dipartimento di Ambiente
e Connessa Prevenzione Primaria
Istituto Superiore di Sanità*

PIANO DELL'OPERA

Luca Lucentini (a), Massimo Ottaviani (a), Patrizia Albertano (b)

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

(b) Dipartimento di Biologia, Università degli Studi di Roma Tor Vergata, Roma

A livello internazionale, innumerevoli lavori di ricerca in questi ultimi anni hanno riguardato i cianobatteri, in relazione ai fattori ambientali che presiedono alla loro crescita e tossigenesi, sistematica, associazione con altri componenti del biota, attività biologica e tossicità dei metaboliti, rimozione delle cellule batteriche o disattivazione delle tossine nelle acque, vie di esposizione, metodiche analitiche e criteri di vigilanza sulle risorse idriche. Sono anche disponibili trattati omni-comprensivi sulla tematica, primo tra tutti e ancora oggi costante riferimento il rapporto elaborato dalla *World Health Organization* (WHO) (1) e rassegne specificamente indirizzate alla valutazione del rischio cianotossine utili per la definizioni di adeguate azioni normative sulla problematica (1-4). Numerose sono anche le linee guida elaborate, più o meno estensivamente, per fornire soluzioni di gestione del rischio correlate agli utilizzi ricreazionali o potabili delle acque (1, 5-9).

Sul piano nazionale, recenti pubblicazioni, molte in questa stessa serie *Rapporti ISTISAN*, hanno approfondito gli aspetti legati alla diffusione dei fenomeni e alla valutazione del rischio (10-13) e trattato specificamente delle metodiche analitiche da utilizzare in sorveglianza (10-16), contribuendo significativamente ad approfondire il livello di conoscenza sia per i ricercatori che per gli operatori della vigilanza sanitaria e ambientale.

In ambienti d'acqua dolce il contributo dei cianobatteri all'ecosistema è estremamente importante sia in termini di elevata diversità sia come quantità di biomassa fotoautotrofa che sostiene la produzione di sostanza organica, ossigeno e composti azotati e partecipa al ricircolo di nutrienti lungo la colonna d'acqua. Forme planctoniche e bentoniche di cianobatteri unicellulari, coloniali e filamentosi caratterizzano tutti i tipi di habitat includendo sorgenti, fiumi e acque con diversi gradi di trofia e distrofia. Tra questi, laghi e invasi artificiali sono i più frequentemente interessati da proliferazioni stagionali di alcune specie planctoniche a rapida crescita, che determinano la comparsa di fioriture visibili anche in superficie a causa della tendenza ad affiorare in condizioni di basso grado di rimescolamento della colonna d'acqua.

La comparsa circa 2,7 miliardi di anni fa della fotosintesi ossigenica sulla Terra a opera dei cianobatteri, ha contribuito alla formazione di una atmosfera che ha reso possibile, nel corso di molti milioni di anni l'evoluzione di tutte le forme eucariote presenti sul pianeta e, in modo particolare, dei vegetali che proprio dai cianobatteri hanno ereditato la struttura dei cloroplasti e dei fotosistemi I e II. Oltre alla grande importanza dal punto di vista evolutivo, i cianobatteri rivestono un grande interesse perché, unici tra i procarioti, liberano ossigeno, introducono nuovo carbonio nell'ecosistema tramite la fotosintesi e alcuni di essi possono differenziare cellule che svolgono funzioni specifiche. Molte specie sono, infatti, capaci di utilizzare, con strategie diverse, l'azoto molecolare, abbondante nell'atmosfera, apportando così anche nuovo azoto nell'ambiente acquatico. La grande versatilità metabolica consente ai cianobatteri di essere adattati a condizioni molto diverse e di acclimatarsi a notevoli variazioni ambientali tollerando molti tipi di stress (17). Tale versatilità si riflette anche nella produzione di un gran numero di composti dannosi: peptidi tossici, Beta-Methylamino-L-Alanine (BMAA) (18) e lipopolisaccaridi di parete ad attività endotossica prodotti dai cianobatteri durante le fasi di maggior sviluppo dei bloom (19). Questi problemi emergenti devono essere tenuti nel debito conto e, nel prossimo futuro, affrontati con approcci sempre aggiornati e che considerino la

possibile introduzione di nuove specie tossiche, aliene e invasive, non ancora note per i nostri bacini, come già segnalato in centro Europa a seguito della comparsa di *Cylindrospermopsis raciborskii* e *Planktothrix rubescens* (20). I fenomeni di riscaldamento globale e cambiamenti climatici stanno influenzando sulla composizione e abbondanza delle popolazioni di cianobatteri con la prospettiva di un aumento del rischio per l'utilizzo delle acque dolci e dei problemi di contaminazione della zona costiera (21, 22).

Si deve però sottolineare, che nonostante gli impatti negativi legati ai metaboliti secondari di natura tossica, i cianobatteri hanno attualmente assunto un ruolo di rilievo non solo nell'ecologia degli ambienti acquatici ma anche come sorgente di numerose molecole per una varietà di applicazioni biotecnologiche (23), non ultime le cianobactine (24), nuovi eptapeptidi ciclici non tossici e a elevata attività antitossica, che possono prevenire i fenomeni di apoptosi cellulare causati dalle microcistine (25).

L'esperienza sulle emergenze idro-potabili da cianobatteri a livello nazionale evidenzia, tuttavia, come la prevenzione degli eventi e delle loro ricadute, le misure attuate nel breve e lungo periodo, i criteri decisionali adottati, le metodologie, i trattamenti delle acque, la comunicazione tra i diversi enti preposti alla sorveglianza e gestione delle risorse idriche e della filiera idro-potabile, l'informazione ai consumatori, risultino aspetti tutt'altro che armonizzati e, in molti casi, non ottimali in termini di efficienza e utilizzo delle risorse.

Le molteplici richieste di supporto all'ISS per rischi da cianobatteri nei sistemi di gestione idrica e le necessità di indicazioni guida direttamente espresse da parte di autorità sanitarie e ambientali a livello centrale e periferico sulla possibile contaminazione delle acque da cianotossine, indicano la necessità di disporre di un riferimento nazionale globale, sul piano decisionale, tecnico-gestionale e operativo, per la prevenzione e il controllo dei rischi di contaminazione massiva di cianobatteri in acque da destinare al consumo umano.

Per rispondere a tale esigenza il CCM ha intrapreso una serie di azioni, tra le quali, in primo luogo, la costituzione del *Gruppo nazionale gestione del rischio cianobatteri in acque per consumo umano*. Quest'ultimo nasce come struttura multidisciplinare, dinamica e aperta a supporto degli organi decisionali in materia sanitaria e ambientale, e dei diversi gruppi di interesse che ruotano intorno alla sicurezza delle acque potabili e tutela dei consumatori. Il gruppo comprende specialisti che da molti anni sul territorio nazionale si impegnano nella gestione e sorveglianza sul piano tecnico-scientifico e funzionale della filiera idro-potabile, esperti impegnati nella valutazione di criteri e metodi di mitigazione dei rischi correlati al consumo di acque o impegnati sul piano sanitario nella sorveglianza epidemiologica, ricercatori e autorità di controllo coinvolti in attività di studio sulla biologia, tassonomia, sviluppo e produzione tossica di cianobatteri, esperti in comunicazione dei rischi sotto il profilo sanitario e ambientale, membri del Servizio Sanitario Nazionale incaricati di predisporre atti legislativi e di indirizzo sulla qualità delle acque.

Come primo risultato delle attività del Gruppo di lavoro viene proposto il presente volume che riporta lo stato dell'arte sulle conoscenze di supporto alla valutazione dei rischi e un secondo volume coordinato, a carattere prettamente operativo, che contiene indicazioni sulla gestione dei fenomeni, con la prima edizione delle linee guida nazionali per la gestione del rischio cianobatteri in acque per consumo umano.

La strategia di intervento per la gestione dei rischi da cianobatteri nelle acque destinate a consumo umano, elaborata e condivisa nel gruppo di lavoro, parte da un processo di revisione sistematica della letteratura e dal confronto di opinioni di esperti per produrre un'analisi esaustiva e aggiornata delle conoscenze relative al rischio da cianobatteri nelle acque destinate al consumo. Su tali basi possono essere definiti strumenti operativi e pragmatici, quali linee guida, per la gestione dei rischi nell'intera filiera di produzione e distribuzione delle acque e

approfonditi, infine, gli elementi critici nella gestione di possibili emergenze, rispetto alla comunicazione dei rischi e alla sorveglianza epidemiologica (Figura 1).

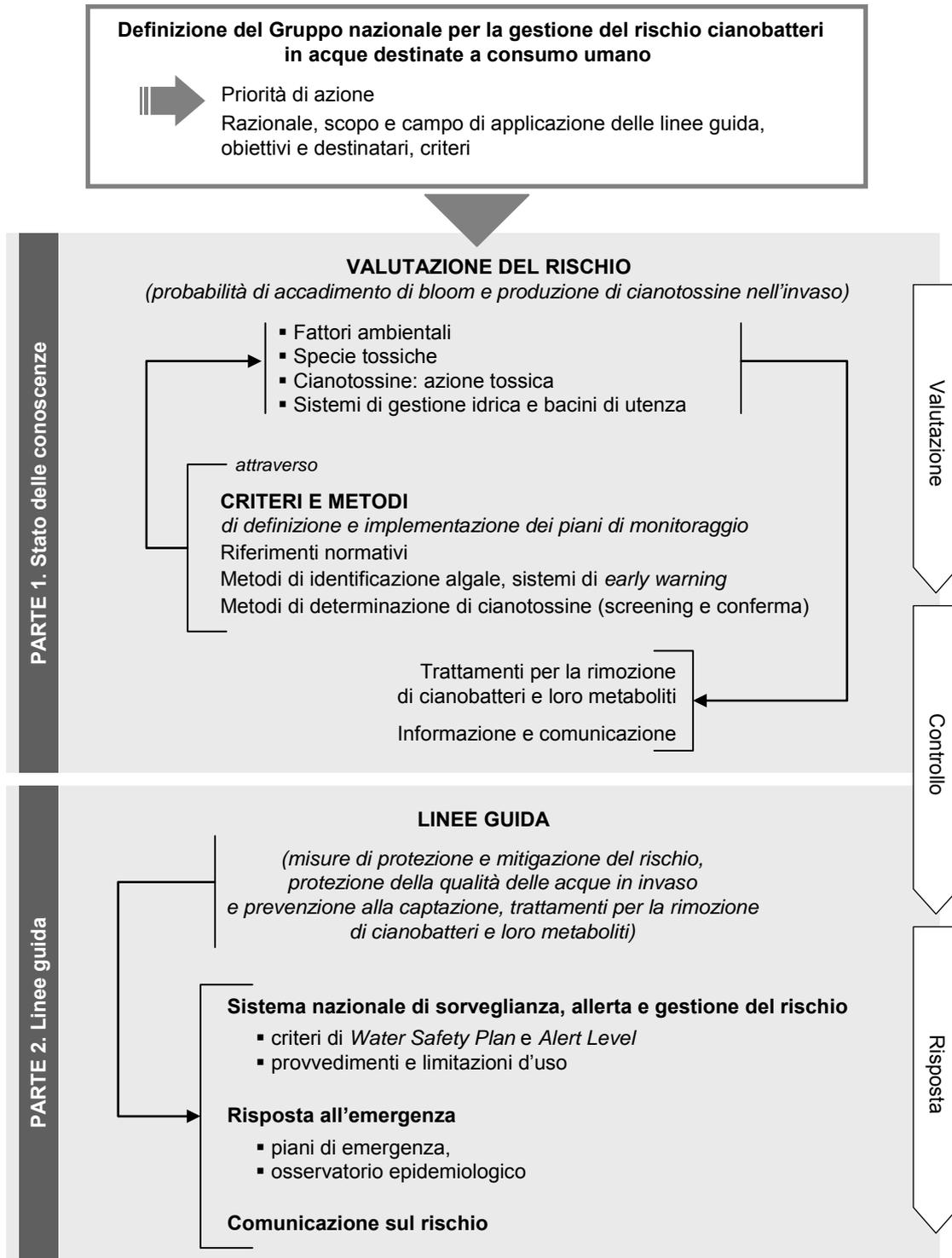


Figura 1. Pianificazione degli interventi per la gestione dei rischi da cianobatteri nelle acque destinate a consumo umano e progettazione dell'opera

Tale approccio è stato trasposto nei due volumi coordinati in materia di cianobatteri in acque destinate a consumo umano.

Il volume *Cianobatteri in acque destinate a consumo umano. Stato delle conoscenze per la valutazione del rischio* vuole essere prodromico e funzionale alle linee guida, nel presentare il quadro delle conoscenze e l'assetto normativo e definire i valori di riferimento stabiliti in Italia per le cianotossine nelle acque destinate a consumo umano. Sono a tal fine anche descritti gli strumenti necessari all'implementazione di piani di monitoraggio per la valutazione del rischio e la definizione della probabilità di accadimento e la stima del potenziale impatto di fenomeni di contaminazioni massive di cianobatteri nell'invaso. In Appendice al volume sono infine riportati il metodo analitico di conferma per la determinazione delle cianotossine (Appendice A) e i metodi per la determinazione delle alghe in acque da destinare e destinate al consumo umano (Appendice B).

Il volume *Cianobatteri in acque destinate a consumo umano. Linee guida per la gestione del rischio* vuole rappresentare una trasposizione sintetica delle conoscenze dal settore della ricerca e dello sviluppo tecnologico, approfondite nel primo volume, alla pratica acquedottistica e alla vigilanza ambientale e sanitaria di *routine*. Le linee guida consistono di istruzioni operative e raccomandazioni gestionali rivolte ai sistemi idrici per migliorare la qualità della risposta alle problematiche dei cianobatteri in un contesto di ottimizzazione degli interventi a protezione della salute e per la razionalizzazione dell'utilizzo delle risorse. È presentata la strutturazione e implementazione di un sistema basato sull'approccio *Alert Level Framework* (ALF) e sui principi dei *Water Safety Plan* (WSP) per la gestione del rischio esteso all'intera filiera idropotabile dal controllo dell'invaso ai punti di utenza. Specifica trattazione trovano altresì le strategie di risposta alle emergenze, e le misure di mitigazione del rischio (comprendenti prevenzione e trattamenti di rimozione di cianobatteri e tossine) e dei piani di emergenza. Sono, infine, riportate le informazioni, i criteri e le metodologie necessarie alla implementazione di un sistema di sorveglianza sindromica (osservatorio epidemiologico), i principi e gli strumenti per garantire una adeguata informazione e comunicazione tra le parti interessate e i consumatori.

A completamento dei volumi è riportato un glossario dei termini usati, al fine di agevolare la lettura e promuovere la diffusione delle conoscenze anche alle utenze meno specializzate.

L'attuale disciplina sulla qualità delle acque destinate al consumo umano si fonda su un patrimonio di conoscenze ed esperienze acquisito da più di un secolo di impegno continuativo da parte delle autorità sanitarie centrali, regionali e locali, degli enti nazionali e territoriali preposti al controllo ambientale, con la fattiva collaborazione delle autorità d'ambito e dei gestori dei servizi idrici, condiviso in sede comunitaria tra Paesi più o meno diversi per problematiche ed esperienze. Il risultato tangibile è il regime attuale di controlli sulle risorse idriche e sulle filiere di potabilizzazione fino ai punti di utenza, inclusi gli approvvigionamenti per la produzione alimentare, che garantisce la sicurezza delle acque al consumo con un'elevato grado di tutela per la salute pubblica.

L'assetto dei controlli esterni (da parte delle Autorità Sanitarie Locali con la collaborazione dei laboratori delle Autorità Regionali per la Protezione dell'Ambiente) e interni (da parte dei gestori idrici), coordinato dalle autorità Regionali e, a livello nazionale dal Ministero della Salute di concerto con l'Istituto Superiore di Sanità, come disegnato dal DL.vo 31/2001 e s.m.i., recepimento nazionale della Direttiva 98/83/CE, contempla annualmente alcuni milioni di controlli su parametri chimici e microbiologici aventi impatto sulla salute e sulle caratteristiche organolettiche delle acque, nonché su altri fattori di rischio identificati sulla base di valutazioni a livello territoriale.

I criteri e le metodologie di prevenzione e sorveglianza si confrontano e aggiornano costantemente sulla base delle esperienze maturate a livello nazionale e della costante

collaborazione sul piano regolatorio e tecnico-scientifico con la Commissione Europea, la WHO, e le autorità sanitarie e ambientali di altri stati membri.

In questo contesto, nell'ultimo decennio e al pari di quanto avviene in altri Paesi, sono state rilevate, con ricorrenza crescente in termini di frequenza e portata dei fenomeni, criticità correlate allo sviluppo di cianobatteri produttori di metaboliti con impatto sulle caratteristiche organolettiche o di sostanze tossiche per i mammiferi, in invasi naturali e artificiali utilizzati per produrre acque destinate al consumo umano.

Il potenziale impatto sulla salute correlato alla presenza di cianotossine nelle acque e la mancanza di armonizzazione nella gestione dei fenomeni di proliferazione di cianobatteri nelle risorse idriche utilizzate per la produzione di acque potabili ha causato numerose emergenze idriche nel territorio nazionale, provocando, in molti casi, l'adozione di limitazioni degli utilizzi delle acque e procurando diversi gradi di allarme negli enti territoriali e nelle popolazioni interessate.

L'esperienza maturata dimostra che nella gestione di un'emergenza generata dallo sviluppo incontrollato di cianobatteri con potenziali effetti tossici in un corpo idrico, interviene, in un lasso di tempo spesso molto breve, un complesso di pressanti fattori che può rendere problematico il processo decisionale e la gestione dei rischi. In primo luogo, gli elementi necessari per la valutazione, soprattutto per quel che concerne definizione delle specie algali presenti e livelli di tossina, possono risultare insufficienti a causa di difficoltà tecniche di implementazione delle metodiche per inesperienza da parte degli operatori o indisponibilità di strumentazioni adeguate. Inoltre, i gruppi di interesse collegati all'utilizzo del corpo idrico possono essere molteplici e richiedere azioni diverse, spesso contrastanti, funzionali alle proprie specifiche utilità. Ad esempio, alcuni portatori di interessi (nell'accezione del termine stakeholder) afferenti ad impianti idroelettrici, a servizi di trasporto o ad attività ricreative, potrebbero richiedere misure finalizzate comunque al mantenimento di un livello del bacino sufficientemente elevato; altri privilegiare le attività finalizzate a garantire la qualità delle acque, essendo interessati agli utilizzi delle stesse per consumo umano e fini ricreative; altri ancora potrebbero, nel contempo, esigere che sia garantita la disponibilità di acque in buona quantità per fini agricoli o utilizzi industriali o, nel caso di associazioni finalizzate alla tutela ambientale, potrebbe essere pretesa con carattere di priorità la conservazione delle caratteristiche naturali del corpo idrico o, per contro, una drastica bonifica della risorsa. Nello stesso ambito può generarsi un dissidio sulle cause del fenomeno, ricondotte spesso al settore agricolo o industriale, cui si attribuisce un prelievo insostenibile e l'eutrofizzazione delle acque per rilascio di nutrienti o sostanze chimiche, o agli enti preposti alla tutela e gestione della risorsa, ritenuti colpevoli di inadeguate opere di prevenzione e di risposta.

Facile desumere, pertanto, come sia frequente il contrasto sulle misure da adottare in fase di emergenza e post-emergenza. Ancor più se queste misure implicano limitazioni d'uso della risorsa idrica a danno di una o un'altra categoria, in un contesto che vede anche, in molti casi, una notevole sensibilizzazione dell'opinione pubblica e dei mass-media (spesso accentuata dall'evidenza di colorazioni vistose del corpo idrico o presenza di schiume) e una elevata percezione dei rischi, con esiti di pressione sulle autorità decisionali o di contestazione delle misure di gestione dei rischi, spesso già dalla prima implementazione. È infine da non sottovalutare che, soprattutto nella fase di emergenza, si trovano ad agire molteplici autorità con competenze diverse in materia sanitaria o ambientale e sono proposti vari criteri e approcci, in taluni casi discordanti, sia per la valutazione che per la gestione dei fenomeni.

In un quadro di tale complessità, che si compone spesso nell'arco di pochi giorni a seguito di un bloom di cianobatteri, è evidente che il successo del processo decisionale, sia per la gestione dell'emergenza che del post-emergenza, può essere assicurato unicamente da un'adeguata conoscenza della materia e dalla strutturazione appropriata di misure di prevenzione e

preparazione all'emergenza da parte di tutti gli operatori della filiera idro-potabile, delle strutture di controllo e dei consumatori, adeguatamente informati. La giustezza di tale processo vale a garantire un elevato grado di protezione della salute dei consumatori, contenendo il più possibile le limitazioni d'uso della risorsa e la confidenza e fiducia degli utenti del servizio idrico.

In questa direzione sono state concepiti ed elaborati i due volumi contenenti le linee guida e la documentazione a supporto. La realizzazione dei volumi è il risultato dell'apporto coordinato di conoscenze nel settore sanitario e ambientale, e della condivisione di diverse esperienze nel controllo analitico biologico e chimico delle acque, nella valutazione, mitigazione e gestione dei rischi nella filiera delle acque destinate al consumo umano.

Scopo, campo di applicazione e utilizzo

Il volume *Cianobatteri in acque destinate a consumo umano. Stato delle conoscenze per la valutazione del rischio* rappresenta un compendio di informazioni frutto della revisione sistematica della letteratura e delle opinioni del *panel* di esperti del Gruppo di lavoro, e riporta indicazioni, strumenti e procedure necessarie alla prevenzione e sorveglianza di fenomeni complessi correlati alla proliferazione di cianobatteri in un corpo idrico. Sono specificamente considerate le disposizioni normative in essere e presentati gli elementi fondamentali per la valutazione del rischio e l'analisi della potenziale vulnerabilità dei corpi idrici e degli impianti, a partire dai fattori ambientali che presiedono allo sviluppo e produzione di tossine. Trattazione specifica viene rivolta alla definizione tuttora controversa di "specie tossiche" e agli approfondimenti sull'attività biologica e la tossicità delle diverse tossine, al fine di definire, nello stesso volume, i valori di riferimento nazionali per le cianotossine nel quadro normativo del DL.vo 31/2001 e s.m.i.

Obiettivo del volume *Cianobatteri in acque destinate a consumo umano. Linee guida per la gestione del rischio* è trasporre sinteticamente sul piano operativo lo stato delle conoscenze rispetto all'impatto dei cianobatteri sulla salute umana mediante il consumo delle acque, e considera gli aspetti essenziali della prevenzione e gestione delle emergenze correlate.

Data la finalità principalmente applicativa delle linee guida, importanza particolare viene dedicata alle metodologie di campionamento e identificazione dei cianobatteri e, inoltre, ai metodi utilizzati in fase di screening e conferma per la determinazione di cianotossine nella filiera di produzione e distribuzione delle acque. Una sezione del documento è quindi focalizzata sulle misure di mitigazione del rischio, sia in fase di prevenzione alla captazione che di trattamento per la rimozione delle cellule e dei metaboliti. Sono definiti e descritti i sistemi di sorveglianza, allerta e gestione dell'emergenza, con riferimento ai più attuali criteri di sicurezza applicabili alla filiera idro-potabile e, parallelamente, i principi e le modalità comunicative da adottare per una corretta informazione e comunicazione del rischio. Sul piano delle strategie di risposta all'emergenza, sono elaborati e proposti criteri e metodologie per la strutturazione di un sistema di sorveglianza epidemiologica di carattere sindromico da istituire in seguito ad allerta sanitaria.

Finalizzate principalmente alla prevenzione dei rischi correlati all'esposizione da cianotossine per consumo delle acque mediante un approccio olistico nella filiera idro-potabile, le linee guida sono state concepite nella consapevolezza che la riduzione della ricorrenza e dell'impatto dei fenomeni nel lungo periodo è unicamente perseguibile mediante adeguate strategie di controllo delle variabili ambientali che presiedono allo sviluppo dei cianobatteri nei corpi idrici e, ove possibile, di risanamento delle condizioni di equilibrio dei biosistemi di corpi idrici compromessi. Aspetti, questi ultimi, che tuttavia non rientrano nello specifico campo di applicazione delle linee guida e vengono trattati per lo più indirettamente nel documento.

Le linee guida si rivolgono principalmente alle autorità sanitarie e ambientali che a livello centrale, regionale e territoriale sono preposte alla tutela della salute e alla salvaguardia ambientale e sono coinvolte nella prevenzione e gestione di rischi correlati a proliferazione in corpi idrici superficiali, o in acque da questi derivati, di cianobatteri potenzialmente tossici o con potenziale impatto sulle caratteristiche organolettiche delle acque destinate a consumo umano. Nel contesto di tali fenomeni, le linee guida costituiscono, inoltre, uno strumento utile per i gestori del servizio idrico, per gli operatori degli impianti di trattamento e distribuzione delle acque, nonché per i consumatori o i gruppi di interesse intenzionati ad approfondire la tematica. I contenuti delle linee guida possono inoltre costituire un utile supporto decisionale per altri settori coinvolti nella gestione e controllo della risorsa idrica, così come possono fornire elementi di conoscenza per ricercatori e studiosi interessati alla tutela delle acque, alla loro valorizzazione o allo studio delle profonde e complesse interrelazioni tra acque e salute.

Lo stato delle conoscenze sui fenomeni che presiedono alla proliferazione dei cianobatteri nei corpi idrici, la produzione di cianotossine, il trasferimento di queste all'uomo attraverso la filiera di produzione delle acque e il consumo umano e l'impatto delle tossine sulla salute umana, è in costante evoluzione. Con questa consapevolezza, le linee guida e il coordinato volume sulla valutazione del rischio intendono fornire strumenti cognitivi e operativi adeguati e aggiornati per gestire in sicurezza le diverse circostanze in cui approvvigionamenti idrici da destinare al consumo umano siano interessati da presenza di cianobatteri in condizioni tali da costituire un rischio per i potenziali utilizzatori delle acque, sia in ambito domestico che nella produzione alimentare. Il gruppo di lavoro è, tuttavia, pienamente consapevole del carattere provvisorio di questa prima edizione e, nell'impegno di una costante revisione, alla luce dei progressi delle conoscenze tecnico-scientifiche in materia, è grato a quei ricercatori e operatori che, utilizzando e valutando criticamente l'elaborato, forniranno un contributo al miglioramento delle successive edizioni.

Il contenuto dell'opera è stato condiviso in ambito ENDWaRe (*European Network of Drinking Waters Regulators*) - Paris Meeting 19-20 maggio 2011.

Bibliografia

1. Chorus I, Bartram J (Ed.). *Toxic cyanobacteria in water*. London: E & FN Spon; 1999.
2. Burch MD. Effective doses, guidelines & regulations. In: Hudnell HK (Ed.). *Cyanobacterial Harmful Algal Blooms: State of the Science and Research Needs* New York: Springer; 2008. p. 831-53.
3. Donohue J, Orme-Zavaleta J, Burch M, Dietrich D, Hawkins B, Lloyd T, Munns W, Steevens J, Steffensen D, Stone D, Tango P. Risk Assessment Workgroup report. In: Hudnell HK (Ed.). *Cyanobacterial Harmful Algal Blooms: State of the Science and Research Needs* New York: Springer; 2008. p.759-829.
4. Falconer IR, Humpage AR. Health risk assessment of cyanobacterial (blue-green algal) toxins in drinking water. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 2005;2(1):43-50.
5. Newcombe G, House J, Ho L, Baker P Burch M. *Management Strategies for Cyanobacteria (Blue - Green Algae) and their Toxins: A Guide for Water Utilities*. WQRA/CRC for Water Quality and Treatment Research Report 74; 2009. Disponibile all'indirizzo http://www.wqra.com.au/WQRA_publications.htm; ultima consultazione 18/02/2011.
6. NHMRC/NRMMC. *Australian drinking water guidelines*. National Health and Medical Research Council/Natural Resource Management Ministerial Council, Canberra. Fact Sheet 17a; 2004. Disponibile all'indirizzo: <http://www.nhmrc.gov.au/publications/synopses/eh19syn.htm>; ultima consultazione 18/02/2011.
7. World Health Organization. *Guidelines for safe recreational water environment*. Volume 1. Coastal and fresh waters. Geneva: WHO; 2003.

8. World Health Organization. *Guidelines for drinking-water quality. 3rd Edition. Incorporating the first and second addenda volume 1. Recommendations*. Geneva: WHO; 2008.
9. World Health Organization. *Guidelines for drinking-water quality. 4th edition*. Geneva: WHO; 2011.
10. 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).
11. Bruno M, Serenelli F, Germozzi 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).
12. 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).
13. 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).
14. Bonadonna L, Ottaviani M (Ed.). *Metodi analitici di riferimento per le acque destinate al consumo umano ai sensi del DL.vo 31/2001. Metodi microbiologici*. Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2007. (Rapporti ISTISAN 07/05).
15. Bruno M, Gallo P, Ferranti P, Messineo V, Melchiorre S. *Contaminazione da tossine algali in fauna ittica italiana. Metodi di rilevazione e analisi*. Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2010. (Rapporti ISTISAN10/23).
16. Ottaviani M, Bonadonna L (Ed.). *Metodi analitici di riferimento per le acque destinate al consumo umano ai sensi del DL.vo 31/2001. Metodi chimici*. Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2007. (Rapporti ISTISAN 07/31).
17. Stal LJ. Cyanobacteria: diversity and versatility, clues to life in extreme environments. In: Seckbach J (Ed.). *Algae and cyanobacteria in extreme environment*. Dordrecht: Springer; 2007. p. 661-80.
18. Jonasson S, Eriksson J, Berntzon L, Spáčil Z, Ilag LL, Ronnevi L-O, Rasmussen U, Bergman B. Transfer of a cyanobacterial neurotoxin within a temperate aquatic ecosystem suggests pathways for human exposure. *PNAS* 2010, 107:9252-7.
19. Bernardová K, Babica P, Maršálek B, Bláha L. Isolation and endotoxin activities of lipopolysaccharides from cyanobacterial cultures and complex water blooms and comparison with the effects of heterotrophic bacteria and green algae. *Journal of Applied Toxicology* 2008;28:72-7.
20. Kastovsky J, Hauer T, Komárek J, Skácelová O. The list of cyanobacterial species of the Czech Republic to the end of 2009. *Fottea* 2010;10:235-49.
21. Paerl HW, Hall NS, Calandrino ES. Controlling harmful cyanobacterial blooms in a world experiencing anthropogenic and climatic-induced change. *Science of the Total Environment* 2011;409:1739-45.
22. Miller MA, Kudela RM, Mekebi A, Crane D, Oates SC, et al. Evidence for a novel marine Harmful Algal Bloom: cyanotoxin (microcystin) transfer from land to sea otters. *PLoS ONE* 2010;5(9): e12576. doi:10.1371/journal.pone.0012576.
23. Ducat DC, Way JC, Silver PA. Engineering cyanobacteria to generate high-value products. *Trends in Biotechnology* 2011;29:95-103.
24. Sivonen K, Leikoski N, Fewer DP, Jokela J. Cyanobactins-ribosomal cyclic peptides produced by cyanobacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2010;86:1213-25.
25. Jokela J, Herfindal L, Wahlsten M, Permi P, Selheim F, Vasconcelos V, Døskeland SO, Sivonen K. Novel cyanobacterial nostocyclopeptide is a potent antitoxin against microcystins. *ChemBiochem* 2010;11:1594-9.

SEZIONE 1
Elementi di valutazione del rischio

1.1. FATTORI AMBIENTALI CHE PRESIDONO ALLA PROLIFERAZIONE DI CIANOBATTERI

Neil Thomas William Ellwood (a), Aldo Marchetto (b)

(a) Dipartimento di Scienze Geologiche, Università degli Studi Roma Tre, Roma

(b) Istituto per lo Studio degli Ecosistemi, Consiglio Nazionale delle Ricerche, Pallanza

I cianobatteri sono procarioti fotosintetici in grado di sintetizzare, oltre alla clorofilla-a, alcuni pigmenti accessori, come le ficobiline (alloficocianina, ficocianina e ficoeritrina) e carotenoidi (come β -carotene, echinenone, cantaxantina, myxoxanthofilla, zeaxantina e oscillaxantina). Questi pigmenti accessori raccolgono efficacemente la luce a lunghezze d'onda raramente utilizzate da altre specie di fitoplancton, dando ai cianobatteri un vantaggio competitivo e una maggiore capacità di colonizzare ambienti diversi. Le proprietà ecofisiologiche specifiche dei diversi cianobatteri sono molto diverse e consentono loro di occupare nicchie ecologiche differenti negli ecosistemi acquatici. I cianobatteri possono quindi essere raggruppati per le loro strategie ecologiche. La comprensione della loro risposta ai fattori ambientali è quindi fondamentale per la definizione degli obiettivi di gestione dei corpi idrici.

Tuttavia vi è generalmente un'interazione tra gli effetti dei diversi fattori ambientali sulla crescita dei cianobatteri ed è quindi difficile separare gli effetti dei singoli fattori. Per una corretta gestione dei corpi idrici, è comunque indispensabile comprendere come questi fattori (l'intensità luminosa, nutrienti e l'idrologia del bacino) regolino la loro crescita. È noto che i cianobatteri preferiscono temperature relativamente elevate dell'acqua e intensità luminose elevate (1, 2). Tuttavia vi sono alcune specie, tra cui importanti produttori di tossine, che rappresentano un'eccezione a questa generalizzazione (3-5). Per questi motivi, qualsiasi tentativo di sviluppare delle strategie di gestione efficaci deve comprendere la conoscenza della composizione tassonomica specifica del sito ed elementi di ecologia delle specie interessate. La figura 1 esemplifica la notevole diversità di condizioni ambientali che possono causare le fioriture di cianobatteri.

1.1.1. Intensità della luce subacquea

L'intensità luminosa disponibile varia in quantità e qualità con la profondità. Diminuisce in modo esponenziale a causa dell'assorbimento e della dispersione dovuta alle particelle e a composti colorati. In particolare, la rimozione selettiva di alcune lunghezze d'onda provoca cambiamenti nella distribuzione spettrale della luce disponibile (6). L'acqua limpida assorbe la luce alle lunghezze d'onda della luce rossa, mentre i composti organici dissolti e le particelle assorbono fortemente alle lunghezze d'onda della luce blu.

Anche il fitoplancton modifica la distribuzione spettrale della luce: le alghe verdi assorbono poco nelle lunghezze d'onda dell'arancione e del giallo, che sono invece assorbite dalle ficobiline. Questo costituisce un vantaggio competitivo per i cianobatteri. Questo vantaggio non è ricambiato, dal momento che i cianobatteri assorbono la luce in un ampio intervallo di lunghezze d'onda comprese quelle utilizzate dalle clorofille.

1.1.2. Luce e temperatura

Gli effetti ecologici della temperatura e della luce sono essenzialmente inseparabili a causa delle interrelazioni tra il metabolismo e la saturazione della luce (7). L'intensità della luce influisce sul tasso di fotosintesi e quindi sulla crescita di cianobatteri. La risposta alla luce è specie-specifica e i cianobatteri mostrano una notevole capacità di adattamento alle mutevoli intensità della luce. In genere, il valore di saturazione luminosa dell'intensità della fotosintesi aumenta con la temperatura dell'acqua. Fino al valore di saturazione, la fotosintesi è limitata dalle reazioni fotochimiche che sono relativamente indipendenti dalla temperatura, se non a temperature molto basse (8). Raggiunto il valore di saturazione luminosa, la fotosintesi è limitata da reazioni enzimatiche biochimiche che sono regolate dalla temperatura (9). Detto questo, i cianobatteri sono noti per avere un'ampia capacità di adattamento alla luce e alla temperatura, che permette loro di occupare una vasta gamma di ambienti. Ad esempio, *Cylindrospermopsis raciborskii* ha dimostrato di poter crescere in un grande intervallo di temperature (da 20 a 35°C) e di intensità luminosa (30-400 $\mu\text{mol fotoni m}^{-2} \text{ s}^{-1}$; 10), anche se i tassi di crescita massima si verificano a circa 30°C e 80 $\mu\text{mol fotoni m}^{-2} \text{ s}^{-1}$.

I cianobatteri necessitano di poca energia per mantenere la funzione e la struttura delle cellule (11, 12). Questo fatto può rappresentare un vantaggio competitivo per i cianobatteri sulle altre alghe, in funzione delle condizioni di luce in un dato corpo idrico (11), che a loro volta dipendono dalla quantità di biomassa sospesa e dalle condizioni di miscelazione del lago. Convenzionalmente, lo strato eufotico, cioè lo strato in cui si può verificare la fotosintesi, si estende dalla superficie fino alla profondità dove può essere ancora rilevato l'1% dell'intensità luminosa misurata alla superficie (Z_{eu}). Lo strato eufotico può essere più o meno profondo rispetto allo strato di mescolamento (Z_{m}), cioè lo strato d'acqua con un profilo di temperatura lineare che si trova al di sopra della zona sottile di rapida diminuzione della temperatura dell'acqua (metalimnio o termocline). Molte specie di alghe e di cianobatteri planctonici hanno pochi, o deboli, mezzi di movimento attivo e passivo e sono trascinati nella circolazione dell'acqua all'interno dello strato di mescolamento. Pertanto, esse possono essere fotosinteticamente attive solo quando la turbolenza delle acque li mantiene nello strato eufotico.

Nelle acque eutrofiche, la biomassa di fitoplancton è spesso molto alta e provoca una marcata torbidità. In tali situazioni, lo strato eufotico è spesso meno profondo dello strato di mescolamento, cioè il rapporto $Z_{\text{eu}}/Z_{\text{m}}$ è minore di uno. In queste condizioni, il fitoplancton trascorre parte del giorno al buio. In queste condizioni sono favorite le specie che possono regolare la loro profondità di galleggiamento, come alcuni cianobatteri problematici, tra cui *Microcystis* spp., *Aphanizomenon* spp. o *Anabaena* spp. Il rapporto $Z_{\text{eu}}/Z_{\text{m}}$ risulta quindi essere un parametro ragionevole e facile da misurare per descrivere le condizioni di luce incontrate dagli organismi planctonici (Tabella 1).

La profondità della zona eufotica (Z_{eu}) è normalmente considerata pari a 2,5 volte la profondità di scomparsa del disco di Secchi (13). Questa formula è comunemente accettata, ma non universalmente valida. Infatti sono possibili deviazioni significative nel rapporto tra la profondità di scomparsa del disco di Secchi e lo spessore della zona eufotica. Perciò è preferibile stimare la profondità della zona eufotica attraverso un profilo di intensità luminosa ottenuta con l'utilizzo di un radiometro PAR, che misura la radiazione fotosinteticamente attiva. Questa procedura è anche consigliata dal Protocollo per il Campionamento di Fitoplancton in Ambiente Lacustre (14).

Tabella 1. Previsione del tipo di potenziale fioritura di cianobatteri in funzione del rapporto tra la profondità dello strato eufotico e di quello di mescolamento

Rapporto tra Z_{eu} e Z_m	Condizioni di luce e di rimescolamento	Tipo di cianobatteri che potrebbero causare potenziali fioriture
$Z_{eu} > Z_m$	La luce penetra in profondità, anche al di là dello strato di mescolamento	Sviluppo di popolazioni di specie filamentose a livello del metalimnio
$Z_{eu} \cong Z_m$	Il corpo idrico è stratificato ma ben mescolato, e vi è una modesta penetrazione della luce, che raggiunge la profondità di mescolamento	Distribuzione uniforme di cellule, normalmente cellule solitarie o filamenti
$Z_{eu} < Z_m$	Penetrazione della luce a profondità molto limitate	Aumento delle specie che possono regolare la profondità di galleggiamento, o che sono adattate a bassi livelli di luce, e che hanno bassi consumi metabolici. Se l'intensità del rimescolamento delle acque di riduce improvvisamente, le cellule possono accumularsi in superficie, causando delle fioriture. La crescita algale è limitata dall'aumento del tempo trascorso in acque con intensità luminosa insufficiente.

Esistono evidenze sperimentali che indicano come le alte temperature favoriscano i cianobatteri, ma questo può essere il risultato della stratificazione indotta dalla temperatura e dei cambiamenti nel tipo di miscelamento, che può influenzare la crescita delle specie con vacuoli gassosi. La crescita dei cianobatteri può avvenire anche a bassa temperatura, ma la crescita potenziale è significativamente maggiore a temperature superiori a circa 15°C, mentre i tassi di crescita massimi sono raggiunti dalla maggior parte dei cianobatteri a temperature superiori a 25°C (2). È stato suggerito che questi valori ottimali di temperatura siano più alti rispetto a quelli delle alghe verdi e delle diatomee (7). Tuttavia, la maggior parte degli studi di campagna su cui si basano queste ipotesi sono stati realizzati in corpi idrici caldi e in condizioni di stratificazione termica, dove potrebbe essere proprio la stratificazione, più che la temperatura, a rappresentare il fattore determinante nella regolazione della crescita dei cianobatteri (6).

La misura della temperatura delle acque e della trasparenza attraverso la valutazione della profondità di scomparsa del disco di Secchi, rientra tra i parametri di base per la caratterizzazione dei laghi e degli invasi significativi, previsti dal DL.vo 152/1999, che richiedeva almeno una misura al momento della massima circolazione e della massima stratificazione estiva. Il Decreto ministeriale 56/2009 ha mantenuto tale obbligo, ma con una frequenza bimestrale (limitatamente al periodo di acque libere per i laghi la cui superficie può gelare in inverno), ripetuta ad ogni ciclo di monitoraggio, sia operativo che di sorveglianza.

1.1.3. Regolazione della profondità di galleggiamento

Alcuni cianobatteri sono in grado di controllare la loro posizione verticale nella colonna d'acqua mediante il controllo della loro galleggibilità attraverso la formazione, la compressione e l'espansione di vescicole gassose. Questa attività è regolata da variazioni di densità delle cellule, causate a loro volta dall'accumulo e dalla perdita di carboidrati cellulari

(15). Una galleggibilità negativa è causata da un'esposizione ad alte intensità di luce che porta ad un aumento della fotosintesi, all'accumulo di carboidrati cellulari e quindi ad un aumento della densità delle cellule e al collasso delle vescicole gassose. La velocità di affondamento dipende anche dalle dimensioni della cellula o delle colonie. Una spinta positiva è invece causata da condizioni di scarsa luminosità, che portano ad un aumento della respirazione, al consumo dei carboidrati cellulari e quindi ad un'espansione delle vescicole gassose. Posizioni di galleggibilità neutra rappresentano normalmente condizioni in cui l'intensità della luce e le concentrazioni dei nutrienti sono ottimali per la crescita. Questa posizione può essere mantenuta attivamente grazie al controllo del numero di vescicole gassose prodotte (16).

La capacità di regolare la profondità di galleggiamento può rappresentare un vantaggio significativo rispetto alle altre alghe fitoplanctoniche soprattutto in laghi stratificati in cui la turbolenza è bassa e le cellule pesanti tendono ad affondare. Questo meccanismo funziona bene solo quando il corpo idrico non è troppo turbolento ed è sufficientemente profondo. Una conseguenza importante di questo meccanismo di regolazione della profondità di galleggiamento è che le colonie di cianobatteri possono risalire alla superficie durante la notte, quando l'intensità luminosa non è sufficiente alla fotosintesi, formando patine molto evidenti, visibili al mattino quando il lago è calmo.

1.1.4. Nutrienti

Le fioriture di cianobatteri avvengono spesso in laghi eutrofici, e quindi si presume che i cianobatteri richiedano concentrazioni elevate di fosforo (P) e di azoto (N). Alte concentrazioni di fosforo possono indirettamente sostenere la crescita dei cianobatteri, aumentando la quantità di biomassa che le risorse di un ecosistema possono sostenere. Tuttavia, fioriture di cianobatteri avvengono anche a basse concentrazioni di fosforo disciolto (17).

Inoltre vi è una seria difficoltà a decifrare quali frazioni di fosforo e di azoto siano state misurate nei diversi studi presenti in letteratura, che rende difficile comprendere le condizioni ambientali a cui si sono verificate le fioriture. Normalmente viene preferita la misura del P totale (TP) per caratterizzare lo stato trofico di un lago. Una causa di confusione può derivare dalla misura del P reattivo anziché del P totale. Il fosforo reattivo si può trovare abbreviato come FRP (fosforo reattivo filtrato), SRP (fosforo solubile reattivo), DRP (fosforo reattivo disciolto) o RP (fosforo reattivo). Fino agli anni '60 si considerava che il fosforo reattivo rappresentasse il fosforo in forma inorganica, come ortofosfato. Tuttavia esso comprende, oltre all'ortofosfato, anche altre forme che reagiscono però con i composti utilizzati per l'analisi (18). Vi sono ancora problemi aperti sul significato del RP, la cui composizione varia probabilmente da lago a lago (19), ma è opinione comune che le forme di fosforo misurate come RP possano essere metabolizzate velocemente dagli organismi, tanto che le concentrazioni misurate possono essere vicino allo zero o sotto il limite di rivelabilità, anche in presenza di una fioritura. Perciò il RP viene considerato una misura del fosforo immediatamente disponibile, mentre il TP misura la quantità di fosforo presente in un determinato corpo idrico, sia in soluzione che all'interno del plancton.

Diversi studi hanno anche mostrato che molti organismi possono utilizzare frazioni organiche nutrienti (20), dando ulteriore supporto all'utilizzo del TP per caratterizzare lo stato trofico di un lago e per determinare le condizioni prevalenti durante le fioriture. Tuttavia anche per quanto riguarda la misura del TP, occorre tener presente che si ottengono valori diversi a seconda della tecnica analitica utilizzata. La maggior parte degli studi utilizza una tecnica analitica che comprende una fase di ossidazione, che trasforma gran parte del fosforo presente nel campione in RP, e una successiva determinazione spettrofotometrica del RP. Pertanto

diverse tecniche di ossidazione, o l'applicazione di metodiche strumentali differenti, possono portare a trovare valori di TP differenti (21).

La confusione sul significato metabolico del P può aumentare ulteriormente perché i cianobatteri hanno una notevole capacità di accumulare fosforo (per lo più come polifosfati), e la quantità accumulata può essere sufficiente per eseguire ancora diverse divisioni cellulari anche quando il P diventa il fattore limitante (22). Una previsione della probabilità di presenza di fioriture può essere ricavata sulla base di modelli. Ad esempio il classico modello di Vollenweider (1968) (23) in cui i valori di TP sono correlati con le concentrazioni di clorofilla-a. Concentrazioni di TP da 10 a 25 $\mu\text{g/L}$ rappresentano un rischio moderato di sostenere la crescita di cianobatteri, mentre per livelli inferiori a 10 $\mu\text{g/L}$ vi è un basso rischio di crescita cianobatterica, e per livelli superiori a 25 $\mu\text{g/L}$ esiste un elevato potenziale di crescita.

L'azoto è una componente principale nella costruzione delle vescicole di gas, e quindi una condizione in cui l'azoto rappresenti il fattore limitante interesserà la capacità di galleggiamento e la crescita delle specie che non possono fissare l'azoto atmosferico, fino a portare alla loro sostituzione con altre specie di fitoplancton (22). L'utilizzo dell'azoto da parte delle alghe avviene più facilmente per l'ammoniaca (NH_4) rispetto al nitrato (NO_3), mentre l'azoto gassoso può essere utilizzato solo da specie azoto-fissatrici (24). La fissazione di azoto atmosferico avverrà solo se le altre forme di azoto non sono abbondanti. È opinione comune che una limitazione da azoto favorisca le specie che producono eterocisti capaci di fissare l'azoto atmosferico.

Anche le concentrazioni di fosforo totale e delle diverse forme dell'azoto rientrano tra i parametri di base della caratterizzazione dei laghi e degli invasi significativi, sia secondo il DL.vo 152/1999 che secondo il DM 56/2009. Le informazioni raccolte in base a tali decreti sono sufficienti per la valutazione di un possibile rischio di sviluppo dei cianobatteri.

Esiste un'ampia letteratura sull'influenza che il rapporto tra N e P può esercitare sul tipo di organismi che si possono trovare in un lago e la possibilità che singole specie o intere comunità siano limitate dall'azoto o dal fosforo è ancora dibattuta (25). Tuttavia gran parte della letteratura concorda con l'esistenza di una correlazione tra il rapporto TN/TP e la tendenza dei cianobatteri a prevalere sugli altri gruppi di fitoplancton (26). Molti cianobatteri sono in grado di fissare l'azoto, e quindi di mantenere elevati tassi di crescita in ambienti a basso contenuto di azoto inorganico. Le capacità competitiva relativa e la proporzione di cianobatteri in una comunità di fitoplancton epilimnetico possono essere quindi previste dal rapporto TN/TP; i cianobatteri azotofissatori sono rari a $\text{TN/TP} > 29$ (26).

Uno studio fondamentale (27) ha suggerito che, nel caso del fitoplancton marino, un rapporto atomico tra N e P superiore a 16/1 (il "rapporto di Redfield") indica una limitazione del fosforo nei casi in cui l'azoto è disponibile. In ambienti d'acqua dolce, forse a causa della maggiore variabilità, il rapporto di soglia che indica la limitazione da N o da P è variabile (25, 28). Sono stati fatti alcuni tentativi per combinare i rapporti N/P e le condizioni di mescolamento dei laghi per prevedere possibili fioriture di cianobatteri. Sulla base di un insieme di 435 laghi negli Stati Uniti (29), alcuni ricercatori hanno calcolato la probabilità di una fioritura causata da una di quattro specie di cianobatteri, a partire dal rapporto tra le concentrazioni di N e di P e dal rapporto (M) tra la profondità teorica di mescolamento e la profondità media del lago (Tabella 2). Più basso è il valore di M, maggiore è la stabilità termica del lago con uno strato di mescolamento molto meno profondo rispetto alla profondità media del lago. Un valore crescente di M indica un aumento della profondità di mescolamento rispetto alla profondità complessiva. Tuttavia, questi modelli molto generali vanno usati con molta attenzione, soprattutto quando si vogliono estrapolare i risultati in altre aree geografiche, in quanto i risultati possono essere influenzati dalle condizioni climatiche, dalla profondità reale, dal ciclo termico stagionale, e dalle interazioni biologiche.

Tabella 2. Probabilità percentuale di presenza di fioriture di 4 specie di cianobatteri in diverse condizioni di mescolamento (M = rapporto tra profondità teorica di mescolamento e profondità media) e rapporto TN/TP in estate

Specie	M → 0-1		M → 1-2		M → 2-3		M → 3-4		M → >4	
	%	TN/TP	%	TN/TP	%	TN/TP	%	TN/TP	%	TN/TP
<i>Anabaena</i>	31	<20	24	<10	26	<10	35	<10	38	<10
<i>Aphanizomenon</i>	67	<10	49	<10	30	<10	40	<10	14	<10
<i>Microcystis</i>	45	>50	50	>50	21	<10	0		0	
<i>Planktothrix</i>	15	<20	40	<20	50	>50	100	<40	36	<10

Nel Lago di Albano, in provincia di Roma, che ospita ripetute fioriture di *Planktothrix rubescens* tra la fine dell'inverno e la primavera e, in misura minore, di *Aphanizomenon ovalisporum* in estate, le previsioni del modello sopra riportato indicano la possibile formazione di una fioritura di *Aphanizomenon ovalisporum*, ma non di quelle di *Planktothrix rubescens*. Quest'ultima forma popolazioni metalimnetiche molto particolari (normalmente alla profondità tipica di 4-5 m, ma fino a 10-25 m nel Lago di Albano) e tende a fiorire a fine inverno o all'inizio della primavera nel periodo di acque tranquille che segue un episodio di intenso mescolamento (5). Va notato infine, che questo semplice modello è relativamente semplificato e non tiene conto del ciclo stagionale né dell'effetto di altre variabili, ma fornisce delle previsioni indicative abbastanza rapide sulla base di pochi dati.



Figura 1. Dall'alto a sinistra in senso orario: *Planktothrix rubescens*, Lago Albano, marzo 2007; *Planktothrix rubescens*, Lago della Fiastra, dicembre 2001; *Anabaena lemmermanni*, Lago Maggiore: agosto 2005; specie non identificata, uno stagno a Trapani, Piazza Vittorio Veneto, luglio 2009

Bibliografia

1. Paerl HW, Bland PT, Bowles ND, Haibach ME. Adaption to high intensity, low wavelength light among surface blooms of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. *Applied and Environmental Microbiology* 1985;49(5):1046-1052.
2. Robarts RD, Zohary T. Temperature effects on photosynthetic capacity, respiration, and growth rates of bloom-forming cyanobacteria. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research* 1987;21(3):391-399.
3. Reynolds CS. Phytoplankton periodicity: interactions of form, function and environmental variability. *Freshwater Biology* 1984; 14(2):111-142.
4. Walsby AE, Ng G, Dunn C, Davis PA. Comparison of the depth where *Planktothrix rubescens* stratifies and the depth where the daily insolation supports its neutral buoyancy. *New Phytologist* 2003;162(1):133-145.
5. Ellwood NTW, Albertano PA, Galvez R, Mosello R, Funicello R. Water chemistry and trophic evaluation of Lake Albano (Central Italy): a 4 year water monitoring study. *Journal of Limnology* 2009;68(2):288-303.
6. Oliver RL, Ganf GG. Freshwater Blooms. In: Whitton BA, Potts M (Ed.). *The Ecology of Cyanobacteria*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers; 2001. p 149-194.
7. Wetzel RG. *Limnology. Lake and River Ecosystems*. San Diego: Academic Press; 2001.
8. Wilhelm C. The biochemistry and physiology of light harvesting processes in chlorophyll *b*- and *c*- containing algae. *Plant Physiology and Biochemistry* 1990;28:293-306.
9. Davison IR. Environmental effect of algal photosynthesis: Temperature. *Journal of Phycology* 1991;27(1):2-8.
10. Briand JF, Lebourlanger C, Humbert JF, Bernard C, Dufour P. *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanobacteria) invasion at mid-latitudes: selection, wide physiological tolerance, or global warming? *Journal of Phycology* 2004;40(2):231–238.
11. Mur LR, Gons HJ, van Liere L. Competition of the green alga *Scenedesmus* and the blue-green alga *Oscillatoria* in light limited environments. *FEMS Microbiology Letters* 1977;1(6):335-338.
12. Van Liere L, Mur LR, Gibson CE, Herdman M. Growth and physiology of *Oscillatoria agardhii* and some related species, a survey. *Dev. Hydrobiology* 1979;2:67-77.
13. Dokulil MT, Teubner K. Steady state phytoplankton assemblages during thermal stratification in deep alpine lakes. Do they occur? In: Naselli Flores L, Padisák J, Dokulil MT (Ed.). *Developments in Hydrobiology; Phytoplankton and equilibrium concept: The ecology of steady-state assemblages*. Kluwer Academic Publishers; 2003.
14. Sollazzo C, Scanu G, Aste F, Belli M, Balzano S, Bernabei S, Cadoni F, Martone C, Morabito G, Oggioni A, Tartari G, Legnani E, Buraschi E, Buzzi F, Pozzi S, Garibaldi L, Salmaso N, Lugliè A. *Protocollo per il campionamento di fitoplancton in ambiente lacustre*. Roma: Istituto Superiore per la Protezione e la Ricerca Ambientale; 2008.
15. Walsby AE. The gas vesicles of aquatic prokaryotes. In: Stanier RY, Rogers HJ, Ward JB (Ed.). *Relations Between Structure and Functioning in the Prokaryotic Cell*. 28th Symposium of the Society for General Microbiology. Cambridge University Press; 1978.
16. Walsby AE. The properties and buoyancy providing role of gas vacuoles in *Trichodesmium* Ehrenberg. *British Phycological Journal* 1978;13(2):103-16.
17. Mur LR, Skulberg OM, Utkilen H. Cyanobacteria in the environment. In: Chorus I, Bartram J (Ed.). *Toxic cyanobacteria in water: a guide to their public health consequences, monitoring, and management*. London and New York: E&FN Spon; 1999. p. 15-40.

18. Rigler FH. The phosphorus fractions and the turnover time of inorganic phosphorus in different types of lakes. *Limnology and Oceanography* 1964; 9(4):511-8.
19. Nürnberg G, Peters RH. Biological availability of soluble reactive phosphorus in anoxic and oxic freshwaters. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 1984;41(5):757-65.
20. Whitton BA, Al-Shehri AM, Ellwood NTW, Turner BL. Ecological aspects of phosphatase activity in cyanobacteria, eukaryotic algae and bryophytes. In: Turner BL, Frossard E, Baldwin DS (Ed.). *Organic Phosphorus in the Environment*. Wallingford, UK: CAB International; 2005. p. 205-41.
21. Griesbach SJ, Peters RH. The effects of analytical variations on estimates of phosphorus concentration in surface waters. *Lake and Reservoir Management*. 1991;7(1):97-106.
22. Oliver RL, Ganf GG. Freshwater blooms. In: Whitton BA, Potts M (Ed.). *The ecology of cyanobacteria*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers; 2000. pp. 149-194.
23. Vollenweider RA. *Scientific fundamentals of the eutrophication of lakes and flowing waters, with particular reference to nitrogen and phosphorus as factors in eutrophication*. OECD Tech. Rep. 1968;DAS/CSI/68.27, Paris.
24. Tandeau de Marsac N, Houmard J. Adaption of cyanobacteria to environmental stimuli: new step towards molecular mechanisms. *FEMS Microbiology Reviews*. 1993;104(1-2):119-90.
25. Jarvie HP, Whitton BA, Neal C. Nitrogen and phosphorus in east coast British rivers: Speciation, sources and biological significance. *Science of the Total Environment* 1998;210-211:79-109.
26. Smith VH. Low nitrogen to phosphorus ratios favour dominance by blue-green algae in lake phytoplankton. *Science* 1983;221(4611):669-71.
27. Redfield AC, Ketchum BH, Richards FA. The influence of organisms on the composition of sea water. In: Hill MN (Ed.). *The Sea*. New York: Interscience; 1963.
28. Hecky RE, Campbell P, Hendzel LL. The stoichiometry of carbon nitrogen and phosphorus in Particulate matter in lakes and oceans. *Limnology and Oceanography* 1993;38(4):709-724.
29. Harris GP. *Phytoplankton ecology: structure, function and fluctuation*. London: Chapman and Hall; 1986.

1.2. SPECIE TOSSICHE

Emanuela Viaggiu (a), Giuseppe Morabito (b), Simonetta Della Libera (c)

(a) Università degli Studi di Roma Tor Vergata, Dipartimento di Biologia, Roma

(b) Istituto Studio Ecosistemi, Consiglio Nazionale delle Ricerche, Pallanza

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

1.2.1. Introduzione

L'abbondante sviluppo di cianobatteri planctonici potenzialmente tossici (bloom) è un evento comune nelle acque dolci, salmastre e marine e rappresenta un importante aspetto ambientale e sanitario. Dei circa 150 generi noti di cianobatteri, più di 40 comprendono specie responsabili della produzione di cianotossine e proprio in base alla capacità di produrre, questi composti vengono distinti in produttori e non produttori (1). Nel corso degli ultimi decenni, la capacità di sintetizzare tossine è stata confermata anche in cianobatteri di tipo bentonico e di ambiente subaereo (2, 3). Le tossine più comunemente prodotte afferiscono alle classi delle epatotossine (microcistine e nodularine), neurotossine (anatoxina-a, anatoxina-a(S) e saxitossine), citotossine (cilindrospermopsine) e dermatotossine (aplisiatossine e debromoaplisiatossine) (4).

Negli ambienti d'acqua dolce le microcistine sono più frequentemente prodotte da specie appartenenti ai generi *Microcystis*, *Planktothrix* (*Oscillatoria*) e *Dolichospermum* (*Anabaena*) (4). È stata osservata la produzione di microcistina da parte di cianobatteri appartenenti al genere *Nostoc* provenienti da habitat acquatici e subaerei (5, 6) e da forme subaereofitiche dei generi *Hapalosiphon* (7) e *Phormidium* (8). Negli ambienti salmastri come il mar Baltico o laghi salati ed estuari come in Australia e in Nuova Zelanda, *Nodularia spumigena* produce la tossina nodularina (5, 9).

Le neurotossine sono comunemente prodotte da *Dolichospermum* (*Anabaena*) e *Anabaena*, meno frequentemente da *Aphanizomenon*, *Lyngbya* e *Oscillatoria* (4).

Cylindrospermopsis, *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Raphidiopsis* e *Umezakia* producono cilindrospermopsine (10), mentre alcune specie di *Lyngbya*, *Oscillatoria* e *Schizothrix* sono principalmente responsabili nella produzione di dermatotossine (Tabella 1) (4).

I cianobatteri tossici possono essere responsabili della produzione di diversi tipi di tossine e, quindi, è possibile che la stessa specie possa produrre più di un tipo di tossina, come pure è possibile che una determinata specie si trovi a produrre diverse varianti della stessa classe di tossine (11). Questo viene ampiamente descritto per *Microcystis aeruginosa* (12) e per popolazioni di *Planktothrix rubescens* (13-17).

La produzione delle varianti di microcistine può essere correlata alla composizione delle popolazioni di cianobatteri e determinata dalla presenza di ceppi diversi, produttori e non produttori. Per poter discriminare le forme di *Planktothrix rubescens* attive nella produzione delle microcistine vengono condotti studi di tipo molecolare sui genotipi contenenti i geni *mcy* responsabili della via biosintetica delle microcistine (18).

In base alle ultime indagini di tipo molecolare, da un punto di vista evolutivo, il genere *Anabaena* è risultato essere eterogeneo. I morfotipi planctonici le cui cellule sono caratterizzate dalla presenza di vescicole gassose devono essere separati dai morfotipi bentonici che formano biofilm. Pertanto in accordo con la nomenclatura di tipo botanico proposta da Komárek i morfotipi planctonici sono stati raggruppati nel genere *Dolichospermum* (25).

Tabella 1. Classi e caratteristiche generali delle cianotossine e specie responsabili della loro produzione

Tossine	Struttura	Generi	Specie
Epatotossine			
Microcistine	Eptapeptidi ciclici	<i>Dolichospermum (Anabaena)</i> <i>Anabaenopsis</i> <i>Aphanizomenon</i> , <i>Aphanocapsa Hapalosiphon</i> <i>Limnothrix Microcystis</i> <i>Nostoc</i> <i>Planktothrix</i> <i>Oscillatoria</i>	<i>D. circinale</i> <i>D. flos-aquae</i> <i>D. lemmermannii</i> <i>D. viguieri</i> <i>Anab. milleri</i> <i>Aph. ovalisporum</i> <i>Aphanoc. cumulus</i> <i>H. hibernicus</i> <i>L. redekeii</i> <i>M. aeruginosa</i> <i>M. flos-aquae</i> <i>M. viridis</i> <i>M. wesenbergii</i> <i>M. botrys</i> <i>P. agardhii</i> , <i>P. rubescens</i> , <i>O. tenuis</i>
Nodularine	Pentapeptidi ciclici	<i>Nodularia</i>	<i>N. spumigena</i>
Neurotossine			
Anatossina-a	Alcaloidi tropano connessi	<i>Dolichospermum (Anabaena)</i> <i>Aphanizomenon</i> <i>Cylindrospermum Oscillatoria</i> <i>Planktothrix</i> <i>Phormidium Raphidiopsis</i>	<i>D. circinale</i> <i>D. flos-aquae</i> <i>D. planctonicum</i> <i>D. spiroides</i> <i>P. rubescens</i> <i>P. formosa</i> <i>Pho. formosum</i> <i>R. mediterranea</i>
Anatossina-a(s)	Guanidine metil fosfato estere	<i>Dolichospermum</i>	<i>D. flos-aquae</i> , <i>D. lemmermannii</i>
Saxitossine	Alcaloidi carbammati	<i>Dolichospermum Anabaena</i> <i>Aphanizomenon</i> <i>Cylindrospermopsis Lyngbya</i> <i>Planktothrix</i>	<i>D. circinale</i> , <i>D. lemmermannii</i> <i>D. spiroides</i> <i>A. perturbata var. tumida</i> <i>Aph. isatschenkoi</i> , <i>Aph. flos-aquae</i> , <i>C. raciborskii</i> <i>L. wollei</i> <i>Planktothrix sp. FP1</i>
Dermatotossine (irritanti) e citotossine			
Cilindrospermopsine	Alcaloidi guanidinici	<i>Anabaena</i> <i>Aphanizomenon</i> <i>Cylindrospermopsis</i> <i>Raphidiopsis, Umezakia</i>	<i>A. bergii</i> <i>A. lapponica</i> <i>Aph. ovalisporum</i> <i>Aph. flos-aquae</i> , <i>L. wollei</i> <i>C. raciborskii</i> <i>R. curvata</i> <i>U. natans</i>
Lingbiatossina-a	Alcaloide	<i>Lyngbya</i> <i>Oscillatoria Schizotrix</i>	<i>L. majuscula</i>
Aplisiatossina e debromoaplisiatossine	Alcaloide	<i>Lyngbya</i> <i>Oscillatoria Schizotrix</i>	<i>O. nigroviridis</i> <i>S. calcicola</i>
Endotossine irritanti			
Tossine lipopolisaccaridiche	Lipopolisaccaridi	Parte dei cianobatteri	

* Riferimenti bibliografici: 1, 2, 19-24

1.2.2. Metaboliti secondari

I cianobatteri sono tra i più promettenti microrganismi per la ricerca di nuovi composti bioattivi. Tali composti sono rappresentati da un insieme di piccoli peptidi ciclici o lineari con un'elevata variabilità strutturale grazie alla possibilità di utilizzare vie biosintetiche sia ribosomiali sia non ribosomiali (26). Negli ultimi due decenni sono stati isolati e caratterizzati un elevato numero di questi metaboliti secondari ottenuti da cianobatteri provenienti da campioni naturali e da ceppi isolati in coltura. A oggi sono noti, più di 600 peptidi o metaboliti peptidici isolati per lo più da specie appartenenti agli ordini Oscillatoriales e Nostocales, seguiti da Chroococcales e Stigonematales, mentre sono ancora poco noti i metaboliti prodotti dalle Pleurocapsales (27). Questi numeri sono, peraltro, determinati dalla disponibilità di ceppi e dalla possibilità di analisi di biomasse provenienti da ambienti naturali e non riflettono appieno l'effettiva potenzialità e capacità di questi organismi di produrre metaboliti secondari. Per esempio, le specie di *Lyngbya* (Oscillatoriales) e *Microcystis* (Chroococcales) sono facilmente reperibili e manipolabili in termini di crescita e di abbondanza tanto che è possibile ottenere quantità sufficienti per la determinazione di tali metaboliti secondari, mentre *Pleurocapsa* richiede tempi lunghi e interventi laboriosi per l'estrazione degli stessi composti.

La maggior parte dei metaboliti secondari prodotti dai cianobatteri sono oligopeptidi o posseggono substrutture peptidiche e sono sintetizzati, in maggioranza, attraverso una via biosintetica completamente non-ribosomiale (NRPS, *Non-Ribosomal Peptide Synthetase*) o parzialmente non ribosomiale (NRPS/PKS, *polyketide synthase*).

In Tabella 2 si riporta l'elenco delle varie classi di metaboliti secondari con i loro relativi sinonimi e i vari generi coinvolti nella produzione di questi composti. Sono state determinate più di 200 varianti e a queste si devono aggiungere una serie di peptidi di nuova generazione della classe delle cianobactine (27).

Tabella 2. Principali classi di metaboliti secondari prodotti dai cianobatteri

Classi	Sinonimi	Origine	Varianti
Aeruginosine	microcina, spumigina	<i>Microcystis</i> , <i>Nodularia</i> , <i>Planktothrix</i>	27
Microginine	cianostatina, oscillaginina, nostoginina	<i>Microcystis</i> , <i>Nostoc</i> , <i>Planktothrix</i>	38
Anabaenopeptine	oscillamide, acido ferintoico, cheramamide, chonbamide, mozamide, nodulapeptina, plectamide, schizopeptina	<i>Anabaena</i> , <i>Aphanizomenon</i> , <i>Microcystis</i> , <i>Nodularia</i> , <i>Planktothrix</i> , <i>Plectonema</i> , <i>Schizothrix</i>	32
Cianopeptoline	aeruginopeptina, anabaenopeptilide, dolostatina, hofmannolina, microcistilide, micropeptina, nostociclina, nostopeptina, oscillapeptilide, oscillapeptina, planctopeptina, sciptolina, somamide, simplostatina, tasipeptina	<i>Anabaena</i> , <i>Lyngbya</i> , <i>Microcystis</i> , <i>Planktothrix</i> , <i>Scytonema</i> , <i>Symploca</i>	82
Microviridine		<i>Microcystis</i> , <i>Nostoc</i> , <i>Planktothrix</i> ,	10
Ciclamidi	aaniasciclamide, bistratamide, dendroamide, microciclamide, nostociclamide, obianamide, raociclamide, tenueciclamide, ulongamide, westiellamide	<i>Lyngbya</i> , <i>Microcystis</i> , <i>Nostoc</i> , <i>Oscillatoria</i> , <i>Stigonema</i> , <i>Westelliopsis</i>	21

Attualmente si descrivono più di cento cianobactine riscontrate in cianobatteri che possono vivere in forma libera o trovarsi in associazione simbiotica con alcune specie di ascidie (26). La via biosintetica dei geni coinvolti nella produzione delle cianobactine è stata descritta in specie appartenenti a generi *Anabaena*, *Lyngbya*, *Microcystis*, *Nostoc*, *Prochloron*, e *Trichodesmium* (26-30). Proprio per conoscere e comprendere meglio la via biosintetica delle cianobactine è stato condotto, di recente, uno studio di tipo molecolare su uno dei geni responsabili della formazione delle cianobactine e ciò ha riguardato l'impiego di 132 ceppi provenienti da ambienti salmastri e d'acqua dolce tra cui forme filamentose come *Planktothrix*, forme filamentose eterocistiche come *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Nodularia* e forme coloniali come *Microcystis* and *Snowella* (31).

1.2.3. Distribuzione geografica dei cianobatteri tossici nei laghi italiani

L'eccessiva fertilizzazione dei bacini idrici ha portato allo sviluppo massiccio di alcuni organismi, quali cianobatteri e alghe, che nella fase massima della loro crescita causano le fioriture algali o *algal bloom* (32). La componente algale che incide maggiormente sulla frequenza di queste fioriture in acque dolci è costituita dai cianobatteri, tra cui le diverse specie produttrici di cianotossine rappresentano un serio pericolo, sia per l'uomo sia per gli animali (33, 34). Dal 1970, in diverse parti del mondo, è stato osservato un costante aumento nella frequenza delle fioriture algali dovute spesso anche a specie produttrici di tossine, ascrivibile sia alla maggiore attenzione del mondo scientifico per questo tipo di problema, sia per l'aumentata frequenza di episodi di intossicazione di animali, uomo incluso (33).

In Italia, fioriture imputabili allo sviluppo di specie tossiche di cianobatteri stanno causando problemi sia da un punto di vista ecologico sia sanitario; tali eventi determinatisi sia in laghi naturali che in invasi artificiali, sono stati messi in relazione al generale aumento dello stato trofico dei vari bacini (35-38).

A oggi, in letteratura, si riportano episodi dovuti alla presenza e allo sviluppo di fioriture di cianobatteri tossici che hanno interessato in totale 61 laghi e invasi artificiali italiani. Nei laghi dell'Italia settentrionale è stata riscontrata la presenza di *Planktothrix rubescens* (Figura 1).

Studi approfonditi sulla comunità fitoplanctonica dei laghi profondi subalpini Como, Garda, Iseo, Lugano e Maggiore hanno permesso di ottenere serie molto lunghe di dati chimico-fisici e biologici evidenziando uno stato di degrado della qualità dell'acqua dovuta a un graduale processo di eutrofizzazione di questi ambienti. Inoltre, nella maggior parte dei laghi dell'Italia settentrionale sono state osservate, associate a *P. rubescens* o in successione, specie appartenenti ai generi *Anabaena*, *Aphanizomenon* e *Microcystis* (Figura 2) (39, 40).

Un aspetto peculiare delle fioriture cianobatteriche nei laghi profondi subalpini è dovuto al fatto che questi fenomeni si manifestano anche in ambienti con un basso livello trofico, come il Lago Maggiore e il Lago di Garda, tanto da meritarsi la definizione di *oligotrophic bloom* (41). Peraltro, non si può escludere che, all'evoluzione recente del fenomeno nei grandi laghi subalpini abbiano contribuito condizioni meteo-climatiche, che hanno favorito un eccezionale rifornimento di nutrienti allo strato trofogenico (42-44).

Per quanto riguarda i piccoli laghi dell'areale subalpino, quelli nei quali è più frequente lo sviluppo di fioriture cianobatteriche sono i più compromessi dal punto di vista dell'evoluzione trofica: esempio emblematico sono i piccoli laghi lombardi della fascia pedemontana, come Alserio, Pusiano, Varese.

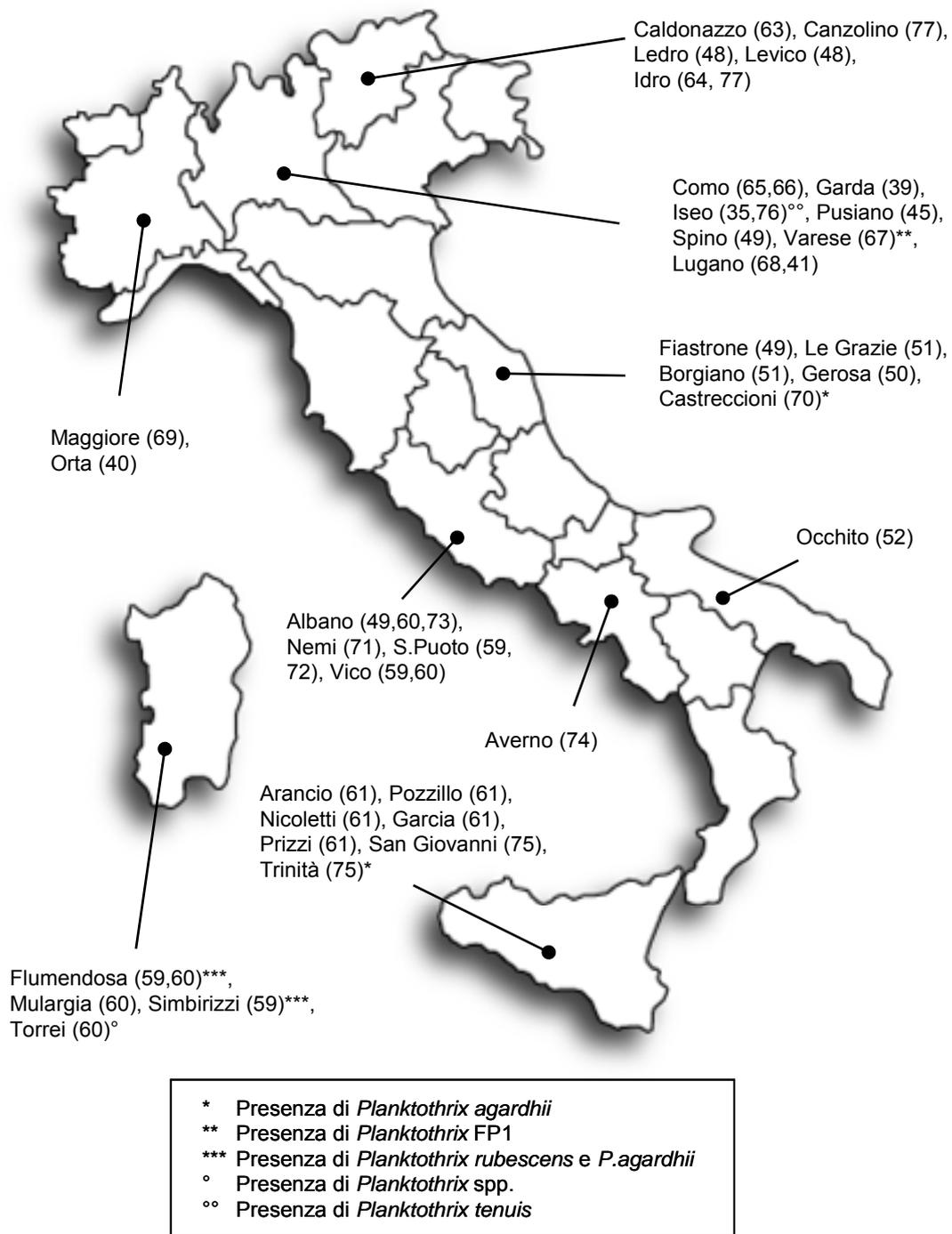


Figura 1. Distribuzione di fioriture di *Planktothrix rubescens* nei laghi e invasi italiani tra il 1992 e il 2009 (i numeri tra parentesi fanno riferiemnto alla bibliografia)



Figura 2. Presenza o fioriture di specie di cianobatteri appartenenti ai generi *Dolichospermum*, *Aphanizomenon*, *Cylindrospermopsis* e *Microcystis* nei laghi e invasi italiani (1992-2010) (i numeri tra parentesi fanno riferimento alla bibliografia)

In questi bacini sono frequenti le segnalazioni di fioriture di *Planktothrix rubescens* (Lago di Pusiano) (45); *Microcystis* spp. e *Anabaena* spp. (Lago di Varese) (46); *Aphanizomenon flos-aquae* (Lago Alserio) (47). Anche per alcuni laghi del Trentino la specie più diffusa è *P. rubescens* ma si riporta anche la presenza di *Aphanizomenon flos-aquae* e di *Microcystis aeruginosa* (12, 48).

Nell'Italia centrale e meridionale la specie *P. rubescens* si è sviluppata abbondantemente nei laghi di origine vulcanica sia laziali (Albano, Vico e Nemi) sia campani (Lago di Averno). Altri casi di fioriture sono state riscontrati nei laghi Fiastrone, delle Grazie, Borgiano, Gerosa (49-51) e nel Lago Occhito in Puglia (52).

Nell'Italia centrale le sole segnalazioni sulla presenza di *Cylindrospermopsis raciborskii* (91) riguardano il Lago Trasimeno in Umbria (53) e il Lago Albano nel Lazio (54). La presenza abbondante di cianobatteri nei laghi laziali è nota da tempo e già nel 1953 si riportava un episodio di fioritura eccezionale di *Aphanizomenon* nel Lago Albano, fatto confermato negli anni '80 da studi morfometrici su popolazioni di *Aphanizomenon ovalisporum* Forti per lo stesso bacino e di *Anabaena bergii* Ostefeld var. minor Kisselev per il Lago di Nemi (55). In anni più recenti, studi sulle condizioni trofiche e sulle comunità fitoplanctoniche del Lago Albano hanno evidenziato condizioni critiche delle acque con una tendenza verso uno stato di meso-eutrofia e una ridotta biodiversità accoppiata invece a uno sviluppo di diverse specie di cianobatteri, tra cui *Planktothrix* e *Anabaena* spp., che rappresentavano fino al 47-65% del fitoplancton totale (56-58). La presenza di specie di cianobatteri responsabili di fioriture o potenziali produttori di tossine è stata anche riportata per il Lago di Nemi (55) e per il Lago di S. Puoto (59). Inoltre, la presenza di *Microcystis aeruginosa* è segnalata in altri laghi dell'Italia centrale: Massaciuccoli in Toscana, Trasimeno in Umbria, Liscione in Molise e Polverina nelle Marche dove è stato possibile riscontrare anche la tossicità per la microcistina RR (60).

Nonostante i laghi e gli invasi localizzati nelle parti più semiaride della penisola italiana, rappresentino la più importante sorgente idrica per le varie attività umane, la presenza e le fioriture di cianobatteri tossici nelle zone meridionali sono ancora scarsamente segnalate e non sono al momento valutabili nella loro reale diffusione. Ciò nonostante, nell'Italia insulare sono state descritte fioriture di *P. rubescens*: in Sicilia nei laghi Arancio, Pozzillo, Nicoletti, Garcia, Prizzi (61) e in Sardegna nei laghi Simbrizzi, Flumendosa, Mulargia e Torrei (59, 60). Inoltre, *M. aeruginosa* e *Dolichospermum flos-aquae* (62) sono state riportate come ricorrenti nella maggior parte dei 27 laghi e invasi siciliani, in cui la formazione di fioriture di cianobatteri dal 1979 è stata favorita da fenomeni di crescente eutrofizzazione (61), mentre in Sardegna i 36 bacini interessati da presenza e/o fioriture cianobatteri sono numerosi e da tempo monitorati (Tabella 3).

Tabella 3. Cianobatteri descritti in letteratura dal 1992 al 2010 (sono incluse specie di cianobatteri che non sempre erano presenti in concomitanza con specie ritenute tossiche)

Lago	Specie
Trentino-Alto Adige	
Idro	<i>Microcystis</i> sp. ¹
Caldonazzo	<i>Anabaena princeps</i> ² , <i>Aphanizomenon</i> sp. ³
Terlago	<i>Microcystis</i> sp. ² , <i>Oscillatoria</i> sp. ²
Lombardia	
Iseo	<i>Aphanotece clathrata</i> ⁴ , <i>Chroococcus limneticus</i> ⁴ , <i>Planktolyngbya limnetica</i> ⁴ , <i>Gomphosphaeria lacustris</i> ⁴ , <i>Aphanocapsa/Aphanothece</i> ⁵ , <i>Leptolyngbyoideae</i> ⁵ , <i>Snowella</i> spp. ⁵ , <i>Pseudoanabaena limnetica</i> ⁶ , <i>Microcystis stagnalis</i> ⁷ , <i>Aphanothece clathrata</i> ⁷ , <i>Chroococcus minimus</i> ⁷ , <i>Chroococcus minutus</i> ⁷ , <i>Anabaena catenula</i> ⁷
Garda	<i>Planktolyngbya limnetica</i> ⁸ , <i>Aphanocapsa/Aphanothece</i> ⁵ , <i>Limnotrichoideae</i> ⁵ , <i>Leptolyngbyoideae</i> ^{5*} , <i>Snowella</i> cf. <i>aracnoidea</i> ⁹ , <i>Limnothrix</i> sp. ⁷
Como	<i>Planktolyngbya limnetica</i> ¹⁰ , <i>Chroococcus</i> sp. ¹⁰ , <i>Aphanocapsa/Aphanothece</i> ⁵ , <i>Pseudoanabaena limnetica</i> ⁶ , <i>Limnotrichoideae</i> ⁵ , <i>Limnothrix</i> sp. ⁷ , <i>Aphanothece clathrata</i> ⁷ , <i>Aphanothece nidulans</i> ⁷ , <i>Gomphosphaeria lacustris</i> ⁵ , <i>Leptolyngbyoideae</i> ⁹
Pusiano	<i>Aphanothece clathrata</i> ¹¹ , <i>Merismopedia tenuissima</i> ¹¹ , <i>Pseudoanabaena</i> sp. ¹¹
Lugano	<i>Aphanocapsa/Aphanothece</i> ⁵ , <i>Pseudoanabaena limnetica</i> ⁶ , <i>Limnotrichoideae</i> ⁵ , <i>Leptolyngbyoideae</i> ⁵ , <i>Gomphosphaeria lacustris</i> ⁵ , <i>Lyngbya limnetica</i> ⁷ , <i>Limnothrix</i> sp. ⁷

segue

continua

Lago	Specie
Piemonte	
Maggiore	<i>Aphanocapsa</i> / <i>Aphanothece</i> ⁵ , <i>Limnotrichoideae</i> ⁵ , <i>Limnotrix</i> sp. ⁷ , <i>Leptolyngbyoideae</i> ⁵ , <i>Gomphosphaeria lacustris</i> ⁵ , <i>Pseudoanabaena limnetica</i> ⁶
Marche	
Castreccioni	<i>Aphanocapsa delicatissima</i> ¹² , <i>Aphanocapsa incerta</i> ¹² , <i>Aphanocapsa planctonica</i> ¹² , <i>Chroococcus limneticus</i> ¹² , <i>Merismopedia glauca</i> ¹² , <i>Oscillatoria limosa</i> ¹² , <i>Rhabdogloea smithii</i> ¹² , <i>Spirulina gigantea</i> ¹²
Lazio	
Nemi	<i>Pseudoanabaena limnetica</i> ¹³ , <i>Merismopedia trolleri</i> ¹³
Bolsena	<i>Snowella-like</i> ¹⁴ , <i>Microcystis</i> sp. ¹⁴
Albano	<i>Anabaena</i> sp. ¹⁴
Molise	
Liscione	<i>Pseudoanabaena mucicola</i> ¹⁵ , <i>Aphanocapsa</i> spp. ¹⁵ , <i>Anabaena</i> spp. ¹⁵ , <i>Aphanothece</i> spp. ¹⁵
Sicilia	
Arancio	<i>Dolichospermum smithii</i> ¹⁶ , <i>Anabaena solitaria</i> f. <i>planctonica</i> ¹⁷ , <i>Microcystis panniformis</i> ¹⁸ , <i>Gomphosphaeria năgeliana</i> ¹⁹ , <i>Pseudoanabaena</i> sp. ¹⁹ , <i>Sphaerospermopsis aphanizomenoides</i> ¹⁷ , <i>Dolichospermum crassum</i> ¹⁷ , <i>Anabaena</i> spp. ¹⁷ , <i>Coelosphaerium kuetzingianum</i> ¹⁷ , <i>Raphidiopsis mediterranea</i> ¹⁷ , <i>Woronichinia naegeliana</i> ¹⁷
Disueri	Oscillatoriales ¹⁷ , Chroococcales ¹⁷
Pozzillo	<i>Anabaena nodularioides</i> ¹⁷ , <i>Microcystis</i> sp. ¹⁷ , Oscillatoriales ¹⁷
Prizzi	<i>Anabaenopsis elenkinii</i> f. <i>circularis</i> ¹⁷
Rosamarina	<i>Aphanizomenon</i> sp. ¹⁷ , <i>Planktothrix</i> sp. ¹⁷ , <i>Merismopedia</i> spp. ¹⁷
Villarosa	<i>Microcystis</i> sp. ¹⁷ , Chroococcales ¹⁷
Piana degli Albanesi	<i>Anabaena solitaria</i> f. <i>planctonica</i> ¹⁷ , <i>Dolichospermum crassum</i> ¹⁷ ,
Gammauta	<i>Dolichospermum smithii</i> ¹⁶ , <i>Dolichospermum crassum</i> ¹⁷ , Chroococcales ¹⁷
Rubino	<i>Planktothrix</i> sp. ¹⁷ , <i>Anabaena</i> spp. ¹⁷ , Oscillatoriales ¹⁷
Soprano	<i>Anabaenopsis elenkinii</i> ¹⁷ , <i>Aphanotece</i> sp. ¹⁷ , <i>Oscillatoria</i> spp. ¹⁷ , <i>Phormidium</i> sp. ¹⁷ , Oscillatoriales ¹⁷
Gorgo	<i>Anabaena</i> sp. ¹⁷ , <i>Anabaenopsis elenkinii</i> f. <i>circularis</i> ¹⁷ , Oscillatoriales ¹⁷
San Giovanni	<i>Microcystis</i> spp. ¹⁷ , <i>Anabaena</i> spp. ¹⁷ , <i>Anabaenopsis elenkinii</i> f. <i>circularis</i> ¹⁷ , Oscillatoriales ¹⁷
Castello	<i>Planktothrix</i> sp. ¹⁷
Trinità	<i>Anabaena</i> spp. ¹⁷ , <i>Coelosphaerium kuetzingianum</i> ¹⁷ , Oscillatoriales ¹⁷
Scansano	<i>Dolichospermum spiroides</i> ¹⁷ , Oscillatoriales ¹⁷ , <i>Anabaena</i> spp. ¹⁷ , <i>Microcystis</i> spp. ¹⁷
Guadalami	<i>Dolichospermum smithii</i> ¹⁷ , <i>Dolichospermum crassum</i> ¹⁷ , <i>Planktothrix</i> sp. ¹⁷ , Chroococcales ¹⁷ , Oscillatoriales ¹⁷
Biviere di Cesarò	<i>Oscillatoria</i> spp. ¹⁷
Santa Rosalia	<i>Anabaena</i> spp. ¹⁷ , Oscillatoriales ¹⁷
Olivo	<i>Anabaena nodularioides</i> ¹⁷
Cimia	<i>Merismopedia</i> spp. ¹⁷
Vasca Ogliastro	<i>Anabaena</i> spp. ¹⁷ , <i>Microcystis</i> spp. ¹⁷
Biviere di Gela	<i>Microcystis</i> spp. ¹⁷ , <i>Lyngbya</i> spp. ¹⁷
Ogliastro	<i>Oscillatoria</i> spp. ¹⁷
Pergusa	<i>Oscillatoria</i> spp. ¹⁷ , <i>Spirulina</i> sp. ¹⁷ , Chroococcales ¹⁷
Comunelli	<i>Lyngbya</i> spp. ¹⁷ , <i>Phormidium</i> sp. ¹⁷

segue

continua

Lago	Specie
Sardegna	
Flumendosa	<i>Oscillatoria mougetii</i> ²⁰ , <i>Oscillatoria</i> spp. ²¹ ; <i>Gomphospaeria aponina</i> ²¹ ; <i>Aphanothece</i> spp. ²¹
Simbirizzi	<i>Anabaena</i> sp. ¹⁵
Mulargia	<i>Anabaena</i> spp. ¹⁵ , <i>Oscillatoria mougetii</i> ²⁰ , <i>Oscillatoria</i> spp. ²¹
Gusana	<i>Aphanocapsa</i> spp. ¹⁵ , <i>Lyngbya</i> sp. ¹⁵
Liscia	<i>Gomphospaeria aponina</i> ²¹
Monteleone	<i>Anabaena</i> sp. ¹⁵ , <i>Microcystis</i> sp. ¹⁵ , <i>Aphanocapsa</i> spp. ¹⁵ , <i>Aphanizomenon</i> spp. ¹⁵
Cucchinadorza	<i>Lyngbya</i> sp. ¹⁵ , <i>Anabaena</i> sp. ²¹ , <i>Aphanocapsa</i> sp. ¹⁵
Torrei	<i>Aphanizomenon</i> spp. ¹⁵ , <i>Lyngbya</i> sp. ¹⁵
Bidighinzu	<i>Aphanocapsa</i> sp. ²¹
Posada	<i>Anabaena</i> spp. ¹⁵ , <i>Aphanocapsa</i> sp. ¹⁵ , <i>Pseudoanabaena mucicola</i> ¹⁵ ; <i>Lyngbya</i> sp. ¹⁵ , <i>Microcystis</i> spp. ¹⁵ , <i>Gomphospaeria aponina</i> ²¹ ; <i>Oscillatoria</i> spp. ²¹
Govassai	<i>Merismopedia</i> sp. ¹⁵ , <i>Aphanocapsa</i> sp. ¹⁵ , <i>Aphanothece</i> spp. ²¹
Cedrino	<i>Microcystis</i> spp. ¹⁵
Benzone	<i>Lyngbya</i> sp. ¹⁵ , <i>Aphanocapsa</i> sp. ¹⁵ , <i>Oscillatoria</i> spp. ²¹
Pattada	<i>Aphanizomenon</i> spp. ¹⁵ , <i>Woronichinia</i> spp. ¹⁵ , <i>Anabaena</i> spp. ¹⁵ , <i>Gomphospaeria</i> spp. ²¹ ; <i>Aphanocapsa</i> sp. ²¹ , <i>Oscillatoria</i> spp. ²¹
Cuga	<i>Pseudoanabaena mucicola</i> ²¹
Omodeo	<i>Merismopedia punctata</i> ²¹ , <i>Aphanothece</i> spp. ²¹
Monteleone Roccadoria	<i>Pseudoanabaena mucicola</i> ²¹ , <i>Aphanocapsa</i> sp. ²¹ , <i>Gomphospaeria aponina</i> ²¹
Bunnari alto	<i>Merismopedia punctata</i> ²¹ , <i>Aphanocapsa</i> sp. ²¹
Casteldoria	<i>Anabaena</i> spp. ²¹
Santa Lucia	<i>Aphanothece</i> spp. ²¹ , <i>Oscillatoria</i> spp. ²¹ , <i>Gomphospaeria aponina</i> ²¹
Monte Pranu	<i>Oscillatoria</i> spp. ²¹
Coghinas	<i>Aphanocapsa</i> sp. ²¹
Cixerri	<i>Oscillatoria</i> spp. ²¹ , <i>Pseudoanabaena mucicola</i> ²¹
Is Barroccus	<i>Aphanothece</i> spp. ²¹ , <i>Aphanocapsa</i> sp. ²¹
Surigheddu	<i>Oscillatoria</i> spp. ²¹
Monteponi	<i>Aphanocapsa</i> sp. ²¹
Medau Zirimilis	<i>Oscillatoria</i> spp. ²¹
Sos Canales	<i>Anabaena</i> spp. ²¹
Bau Pressiu	<i>Aphanothece</i> spp. ²¹
Barzolu	<i>Anabaena</i> spp. ²¹
Corongiu	<i>Aphanocapsa</i> sp. ²¹
Leni	<i>Aphanocapsa</i> sp. ²¹

Referenze: 1 (90); 2 (48); 3 (63); 4 (35); 5 (68); 6 (41); 7 (76); 8 (78); 9 (79); 10 (65); 11 (45); 12 (70); 13 (71); 14 (72); 15 (60); 16 (88); 17 (75); 18 (61); 19 (84); 20 (59); 21 (87);

* Le Leptolyngbyoideae sono principalmente rappresentate da *Planktolyngbya* limnetica (90).

In sintesi, in Italia sono disponibili dati sulla presenza di specie tossiche di cianobatteri solo per 61 laghi tra i circa 500 distribuiti sul territorio (tralasciando i corpi lacustri minori) in 13 regioni su 20 (Tabella 3).

Mancano completamente dati sul resto dei laghi e invasi.

Bibliografia

1. Van Apeldoorn ME, van Egmond HP, Speijers GJA, Bakker GJI. Toxins of cyanobacteria. *Molecular Nutritional Food Research* 2007;51(1):7-60.
2. Bláha L, Babica P, Maršálek B. Toxins produced in cyanobacterial water blooms – toxicity and risks. *Interdisciplinary Toxicology* 2009;2(2):36-41.
3. Surakka A, Sihvonen LM, Lehtimäki JM, Wahlsten M, Vuorela P, Sivonen K. Benthic cyanobacteria from the Baltic Sea contain cytotoxic *Anabaena*, *Nodularia*, and *Nostoc* strains and an apoptosis-inducing *Phormidium* strain. *Environmental Toxicology* 2005;20(3):285-92.
4. 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.
5. Sivonen K. Emerging high throughput analyses of cyanobacterial toxins and toxic cyanobacteria. In: Hudnell HK (Ed.). *Cyanobacterial harmful algal blooms: state of the science and research needs*. New York: Springer; 2008. p. 539-57.
6. Oksanen I, Jokela J, Fewer DP, Wahlsten M, Rikkinen J, Sivonen K. Discovery of rare and highly toxic microcystins from lichen-associated cyanobacterium *Nostoc* sp. strain IO-102-I. *Applied and Environmental Microbiology* 2004;70(10):5756-63.
7. Michèle RP. Further pterocellins from the New Zealand marine bryozoans *Pterocella vesiculosa*. *Journal of Natural Product* 2008;71(1):134-6.
8. Izaguirre G, Neilan BA. Benthic *Phormidium* species that produces microcystin-LR, isolated from three reservoirs in Southern California. *Sixth International Conference on Toxic Cyanobacteria Abstract book*, 2004.
9. 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. *Environmental Toxicology Water Quality* 1997;12:273-82.
10. Fergusson KM, Saint CP. Multiplex PCR assay for *Cylindrospermopsis raciborskii* and cylindrospermopsin-producing cyanobacteria. *Environmental Toxicology* 2003;18(2):120-5.
11. Mbedi S, Welker M, Fastner J, Wiedner C. Variability of the microcystin synthetase gene cluster in the genus *Planktothrix* (Oscillatoriales, Cyanobacteria). *FEMS Microbiology Letters* 2005;245(2): 299-306.
12. Kützing FT. *Tabulae phycologicae; oder, Abbildungen der Tange*. Nordhausen: Gedruckt auf kosten des Verfassers; 1846. Vol. 1, fasc. 1, pls 1-10. p. 1-8.
13. Gomont M. Monographie des Oscillariées (Nostocacées homocystées). *Annales des Sciences Naturelles, Botanique, Series 7* 1892;16:91-264.
14. Anagnostidis K, Komárek J. Modern approach to the classification system of cyanophytes. 3. Oscillatoriales. *Archiv für Hydrobiologie* 1988;80:327-472.
15. 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. *Applied and Environmental Microbiology* 2003;69(2):787-95.
16. Kurmayer R, Christiansen G, Fastner J, Börner T. Abundance of active and inactive microcystin genotypes in populations of the toxic cyanobacterium *Planktothrix* spp. *Environmental Microbiology* 2004;6(8):831-41.
17. Briand JF, Jacquet S, Flinois C, Avois-Jacquet C, Maissonette C, Leberre B, Humbert JF. Variations in the microcystin production of *Planktothrix rubescens* (Cyanobacteria) assessed from a four-year survey of Lac du Bourget (France) and from laboratory experiments. *Microbial Ecology* 2005;50: 418-28.

18. Christiansen G, Rainer Kurmayer R, Liu Q, Börner T. Transposons inactivate biosynthesis of the nonribosomal peptide microcystin in naturally occurring *Planktothrix* spp. *Applied and Environmental Microbiology* 2006;72(1):117-23.
19. Zurawell RW, Chen H, Burke JM, Prepas EE. Hepatotoxic cyanobacteria: a review of the biological importance of microcystins in freshwater environments. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B: Critical Reviews* 2004;8(1):1-37.
20. Viaggiu E, Melchiorre S, Volpi F, Di Corcia A, Mancini R, Garibaldi L, Crichigno G, Bruno M. Anatoxin-a toxin in the cyanobacterium *Planktothrix rubescens* from a fishing pond in northern Italy. *Environmental Toxicology* 2004;19(3):191-7.
21. Guzzella L, Ghislanzoni L, Pozzoni F, Cerasino L, Salmaso N. Determinazione di tossine algali (Microcistine e nodularine) nelle acque superficiali. *Notiziario dei metodi analitici* 2010;1:17-31.
22. Stüken A, Jakobsen KS. The cylindrospermopsin gene cluster of *Aphanizomenon* sp. strain 10E6: organization and recombination. *Microbiology* 2010;156(8):2438-51.
23. Pomati F, Moffitt MC, Cavaliere R, Neilan BN. Evidence for differences in the metabolism of saxitoxin and C1+2 toxins in the freshwater cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* T3. *Biochimica et Biophysica Acta* 2004;1674(1):60-7.
24. Žegura B, Štraser A, Filipič M. Genotoxicity and potential carcinogenicity of cyanobacterial toxins – a review. *Mutation Research* 2011;727(1-2):16-41.
25. Wacklin P, Hoffmann L, Komárek J. Nomenclatural validation of the genetically revised cyanobacterial genus *Dolichospermum* (Ralfs ex Bornet et Flahault) comb. nova. *Fottea* 2009;9(1):59-64.
26. Sivonen K, Leikoski N, Fewer DP, Jokela J. Cyanobactins—ribosomal cyclic peptides produced by cyanobacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology* 2010;86(5):1213-25.
27. Welker M, von Döhren H. Cyanobacterial peptides – Nature’s own combinatorial biosynthesis. *FEMS Microbiology Reviews* 2006;30(4):530-63.
28. Sudek S, Haygood MG, Youssef DTA, Schmidt EW. Structure of trichamide, a cyclic peptide from the bloom-forming cyanobacterium *Trichodesmium erythraeum*, predicted from the genome sequence. *Applied and Environmental Microbiology* 2006;72(6):4382-7.
29. Ziemert N, Ishida K, Quillardet P, Bouchier C, Hertweck C, Tandeau de Marsac N, Dittmann E. Microcyclamide biosynthesis in two strains of *Microcystis aeruginosa*: from structure to genes and vice versa. *Applied and Environmental Microbiology* 2008;74(6):1791-7.
30. Leikoski N, Fewer DP, Jokela J, Wahlsten M, Rouhiainen L, Sivonen K. Highly diverse cyanobactins in strains of the genus *Anabaena*. *Applied and Environmental Microbiology* 2010;76(3):701-9.
31. Leikoski N, Fewer DP, Sivonen K. Widespread occurrence and lateral transfer of the cyanobactin biosynthesis gene cluster in cyanobacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 2009;75(3):853-7.
32. Istvánovics V, Somlyódy L. Factors influencing lake recovery from eutrophication – the case of basin I of lake Balaton. *Water Research* 2001;35(3):729-35.
33. Chorus I, Bartram J (Ed.). *Toxic cyanobacteria in water: a guide to their public health consequences, monitoring, and management*. London and New York: E & F.N. Spon; 1999.
34. Van den Hoek C, Mann DG, Jahns HM. *Algae an introduction to phycology*. U.K.: Cambridge University Press; 1995.
35. Garibaldi L, Anzani A, Marieni A, Leoni B, Mosello R. Studies on the phytoplankton of the deep subalpine Lake Iseo. *Journal of Limnology* 2003;62(2):177-89.

36. Garibaldi L, Brizzio MC, Galanti G, Varallo A, Mosello R. Idrochimica e fitoplancton del Lago d'Idro. In: Mosello R, Giussani G. (Ed.). *Documenta Istituto Italiano Idrobiologia Volume 61*, 1997. p.153-72.
37. Carollo A, Libera V. Geographical and characteristics of the main Italian lakes. *Memorie Istituto Italiano Idrobiologia* 1992;50:29-35.
38. Cordella P, Salmaso N. Studies on some reservoirs and lakes in North-East Italy. *Memorie Istituto Italiano Idrobiologia* 1992;50:259-71.
39. Salmaso N. Factors affecting the seasonality and distribution of cyanobacteria and chlorophytes: a case study from the large lakes south of the Alps, with special reference to Lake Garda. *Hydrobiologia* 2000;438(1-3):43-63.
40. Morabito G. Six years' (1992-1997) evolution of phytoplankton communities after recovery by liming in Lake Orta, northern Italy. *Lakes and Reservoirs: Research and Management* 2001;6(4):305-12.
41. Salmaso N, Morabito G, Buzzi F, Garibaldi L, Simona M, Mosello R. Phytoplankton as an indicator of the water quality of the deep lakes south of the Alps. *Hydrobiologia* 2006;563(1):167-87.
42. Mosello R, Ambrosetti W, Arisci S, Bettinetti R, Buzzi F, Calderoni A, Carrara E, de Bernardi R, Galassi S, Garibaldi L, Leoni B, Manca M, Marchetto A, Morabito G, Oggioni A, Pagnotta R, Ricci D, Rogora M, Salmaso N, Simona M, Tartari G, Veronesi M, Volta P. Evoluzione recente della qualità delle acque dei laghi profondi sudalpini (Maggiore, Lugano, Como, Iseo e Garda) in risposta alle pressioni antropiche e alle variazioni climatiche. *Biologia Ambientale* 2010;24(1):167-77.
43. Bertoni R, Callieri C, Caravati E, Corno G, Contesini M, Morabito G, Panzani P, Giardino C. Cambiamenti climatici e fioriture di cianobatteri potenzialmente tossici nel Lago Maggiore. In: Carli B, Cavarretta G, Colacino M, Fuzzi S (Ed.). *Clima e cambiamenti climatici: le attività di ricerca del CNR*. Roma: Consiglio Nazionale delle Ricerche; 2007. p. 613-6.
44. Morabito G. Variazioni climatiche interannuali e dinamica stagionale del fitoplancton nel Lago Maggiore. In: Carli B, Cavarretta G, Colacino M, Fuzzi S (Ed.). *Clima e cambiamenti climatici: le attività di ricerca del CNR*. Roma: Consiglio Nazionale delle Ricerche; 2007. p. 617-20.
45. Legnani E, Copetti D, Oggioni A, Tartari G, Palombo MT, Morabito G. *Planktothrix rubescens*' seasonal dynamics and vertical distribution in Lake Pusiano (North Italy). *Journal of Limnology* 2005;64(1):61-73.
46. Premazzi G, Cardoso AC, Rodari E, Austoni M, Chiaudani G. Hypolimnetic withdrawal coupled with oxygenation as lake restoration measures: the successful case of Lake Varese (Italy). *Limnetica* 2005;24(1-2):123-32.
47. Leoni B, Morabito G, Rogora M, Pollastro D, Mosello R, Arisci S, Forasacco E, Garibaldi L. Response of planktonic communities to calcium hydroxide addition in a hardwater eutrophic lake: results from a mesocosm experiment. *Limnology* 2007;8(2):121-30.
48. Flaim G, Pinamonti V. I cianobatteri nei laghi trentini. In: Funari E (Ed.). *Aspetti sanitari della problematica dei cianobatteri nelle acque superficiali italiane. Workshop. Atti*. Roma, 16-17 dicembre 1999. Roma: 2000 (ISTISAN 00/30). p. 111-6.
49. Viaggiu E, Calvanella S, Melchiorre S, Bruno M, Albertano P. Toxic blooms of *Planktothrix rubescens* (Cyanobacteria/Phormidiaceae) in three water bodies in Italy. *Archiv für Hydrobiologie, Algological Studies* 2003;109:569-77.
50. Manganelli M, Scardala S, Stefanelli M, Vichi S, Mattei D, Bogianni S, Ceccarelli P, Corradetti E, Petrucci I, Gemma S, Testai E, Funari E. Health risk evaluation associated to *Planktothrix rubescens*: An integrated approach to design tailored monitoring programs for human exposure to cyanotoxins. *Water Research* 2010;44(5):1297-306.

51. Bruno M, Serenelli F, Germozzi 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 ISTISAN09/21).
52. Ferretti E, Lucentini L, Ottaviani M, Bogialli S, Veschetti E, Giovanna R, Ledalardo C, Cannarozzi De Grazia M, Ungaro N, Rosaria Petruzzelli R, Tartari G, Guzzella L, Mingazzini M, Copetti D, Abis P, Fiori G, De Leo A. Exceptional bloom of cyanobacterium *Planktothrix rubescens* and microcystin production in an Italian drinking water basin. *The 8th International Conference on Toxic Cyanobacteria (ICTC8)*. Istanbul, 29 agosto-4 settembre 2010. p. 117.
53. Manti G, Mattei D, Messineo V, Bogialli S, Sechi N, Casiddu P, Luglié A, Di Brizio M, Bruno M. First report of *Cylindrospermopsis raciborskii* in Italy. *Harmful Algal News* 2005;28:8-9.
54. 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. *Environmental Science Technology* 2006 40(9):2917-23.
55. Bazzichelli PG, Abdelahad N. Morphometric and statistic characterization of two *Aphanizomenon* populations of the group *Aphanizomenon ovalisporum* Forti from the lakes of Nemi and Albano (Italy). *Archiv für Hydrobiologie Algological Studies* 1994;73:1-21.
56. Chondrogianni C, Ariztegui D, Guilizzoni P, Lami A. Lakes Albano and Nemi (central Italy): an overview. *Memorie Istituto Italiano Idrobiologia* 1996;55:17-22.
57. Lai A, Giordano P, Barbini R, Fantoni R, Ribrezzo S, Palucci A. Bio-optical investigation on the Albano lake. In: *Proceedings of EARSeL-Sig-Workshop LIDAR*, Dresden (Germany), June 16-17, 2000. p. 185-95.
58. Margaritora FG, Bazzanti M, Ferrara O, Mastrantuono L, Seminara M., Vagaggini D. Classification of the ecological status of volcanic lakes in Central Italy. *Journal of Limnology* 2003;62(1):49-59.
59. Bruno M, Gucci P M B, 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.
60. Messineo V, Bogialli S, Melchiorre S, Sechi N, Luglié A, Casiddu P, Mariani MA, Padedda BM, Di Corcia A, Mazza R, Carloni E, Bruno M. Cyanobacterial toxins in Italian freshwaters. *Limnologica* 2009;39(2):95-106.
61. Naselli Flores L, Barone R, Chorus I, Kurmayer R. Toxic cyanobacterial blooms in reservoirs under a semiarid mediterranean climate: the magnification of a problem. *Environmental Toxicology* 2007;22(4):399-404.
62. Waklin P, Hoffman L, Komárek J. Nomenclatural validation of the genetically revised cyanobacterial genus *Dolichospermum* (Ralfs ex Bornet et Flahault) comb. nova. *Fottea* 2009;9(1):59-64.
63. Costarao S, Pozzi S, Monauni C, Pellegrini G, Defrancesco C. Valutazione della qualità ecologica dei laghi dell'ecoregione alpina con l'indice fitoplanctonico PTIot: prime applicazioni su tre laghi naturali e su un lago altamente modificato (Provincia di Trento). In: *Atti del Convegno Valutazione degli ambienti. Stato dell'arte a 10 anni dalla pubblicazione della WFD lacustri*. Milano 24-25 marzo 2010.
64. D'Alelio D, Gandolfi A, Boscaini A, Flaim G, Tolotti M, Salmaso N. *Planktothrix* populations in subalpine lakes: selection for strains with strong gas vesicles as a function of lake depth, morphometry and circulation. *Freshwater Biology* 2011;56(8):1481-93.
65. Bettinetti R, Morabito G, Provini A. Phytoplankton assemblage structure and dynamics as indicator of the recent trophic and biological evolution of the western basin of Lake Como (N. Italy). *Hydrobiologia* 2000;435(1-3):177-90.
66. Buzzi F. Phytoplankton assemblages in two sub-basins of Lake Como. *Journal of Limnology* 2002;61(2):117-28.

67. Pomati F, Sacchi S, Rossetti C, Giovannardi S. The freshwater cyanobacterium *Planktothrix* sp. FP1: molecular identification and detection of paralytic shellfish poisoning toxins. *Journal of Phycology* 2000;36(3):553-62.
68. Salmaso N, Morabito G, Mosello R, Garibaldi L, Simona M, Buzzi F, Ruggiu D. A synoptic study of phytoplankton in the deep lakes south of the Alps (lakes Garda, Iseo, Como, Lugano and Maggiore). *Journal of Limnology* 2003;62(2):207-27.
69. Morabito G, Ruggiu D, Panzani P. Recent dynamics (1995-1999) of the phytoplankton assemblages in Lago Maggiore as a basic tool for defining association patterns in the Italian deep lakes. *Journal of Limnology* 2002;61(1):129-45.
70. Bartolelli K, Cocchioni M, Dell'Uomo A, Scuri S. Hydrobiological study of a reservoir in the central Apennines (Italy). *Annales de limnologie, International journal of limnology* 2005;41(2):127-39.
71. Margaritora FG, Fumanti B, Alfinito S, Tartari G, Vagaggini D, Seminara M, Cavacini P, Vuillermo E, Rosati M. Trophic condition of the volcanic Lake Nemi (Central Italy): environmental factors and planktonic communities in a changing environment. *Journal of Limnology* 2005;64(2):119-28.
72. Viaggiu E, Russo T, Bianco I, Cortese M, Zaottini E, Albertano P. Modelling fluctuation of the toxic cyanobacterium *Planktothrix rubescens* in the Lake San Puoto (Central Italy) using self-organizing maps. In: Morabito G, Bianchi CN (Ed.). *Atti del XVII Congresso dell'Associazione Italiana di Oceanologia e Limnologia 19(2)*. Napoli, 3-7 luglio 2006. CNR, Pallanza; 2008. p. 499-503.
73. Messineo V, Melchiorre S, Di Corcia A, Gallo P, Bruno M. Seasonal succession of *Cylindrospermopsis raciborskii* and *Aphanizomenon ovalisporum* blooms with cylindrospermopsin occurrence in the volcanic lake Albano, Central Italy. *Environmental Toxicology* 2010;25(1):18-27.
74. Ferranti P, Fabbrocino S, Nasi A, Caira S, Bruno M, Serpe L, Gallo P. Liquid chromatography coupled to quadruple time-of-flight tandem mass spectrometry for microcystin analysis in freshwaters: method performances and characterisation of a novel variant of microcystin-RR. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 2009;23(9):1328-36.
75. 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. 93-100.
76. Garibaldi L, Buzzi F, Morabito G, Salmaso 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.
77. Italia, Relazione sullo stato delle acque di balneazione, Parte IV. Disponibile all'indirizzo: http://leg13.camera.it/_dati/leg13/lavori/documentiparlamentari/indiceetesti/ciii/005/pdfel.htm; ultima consultazione 11/11/11.
78. Salmaso N. Ecological patterns of phytoplankton assemblages in Lake Garda: seasonal, spatial and historical features. *Journal of Limnology* 2002;61(2):95-115
79. Salmaso N. Fioriture di cianobatteri nei laghi profondi dell'Italia settentrionale. 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. 30-48.
80. Salmaso N. Effects of climatic fluctuations and vertical mixing on the interannual trophic variability of Lake Garda, Italy. *Limnology and Oceanography* 2005;50(2):553-65.

81. Ravera O, Scotto S. A sampler-incubator for studying zooplankton grazing and phytoplankton production. *Journal of Limnology* 1999;58(1):49-57.
82. Gallo P, Ferranti P, Fabbrocino S, Serpe L, Bruno M, Cerullo MG. Determination of cylindrospermopsin in freshwater using ion trap, MALDI-TOF and Q-ToF mass spectrometry detectors. *18th International Mass Spectrometry Conference*. Bremen (Germany), 30 agosto-4 settembre 2009.
83. Naselli Flores L, Barone R. Water-level fluctuations in Mediterranean reservoirs: setting a dewatering threshold as a management tool to improve water quality. *Hydrobiologia* 2005;548:85-99.
84. Naselli Flores L, Barone R. Phytoplankton dynamics in two reservoirs with different trophic state (Lake Rosamarina and Lake Arancio, Sicily, Italy). *Hydrobiologica* 1998;369/370:163-78.
85. Dati dell'Università di Tor Vergata nell'ambito dell'Accordo di collaborazione tra Istituto Superiore di Sanità e Comune di Caprarola (VT) "Gestione del rischio correlato alla presenza di cianobatteri nella filiera idrica delle acque destinate al consumo umano captate dal lago di Vico. 2010-11.
86. Bruno M, Barbini DA, Pierdominici E, Serse AP, Ioppolo A. Anatoxin-a and a previously unknown toxin in *Anabaena planctonica* from blooms found in lake Mulargia (Italy). *Toxicon* 1994;32(3):369-73.
87. 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.
88. Naselli Flores L, Barone R. Phytoplankton dynamics and structure: a comparative analysis in natural and man-made water bodies of different trophic state. *Hydrobiologia* 2000;438(1-3):65-74.
89. 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.
90. Komárková-Legnerová, J, Cronberg, G. New and recombined filamentous Cyanophytes from lakes in South Scania, Sweden. *Algological Studies* 1992;67:21-32.
91. Seenayya G, Subba Raju N. On the ecology and systematic of the alga known as *Anabaenopsis raciborskii*. In: Diskachary TV (Ed.). *First International Symposium and Taxonomy and Biology of blue-green algae*. Madras, India; 1972. p. 52-7.

1.3. TOSSINE DA CIANOBATTERI: PROPRIETÀ CHIMICHE E TOSSICITÀ

Laura Achene

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

Le cianotossine sono un gruppo formato da tossine naturali diverse sia dal punto di vista chimico che tossicologico, responsabili di fenomeni di avvelenamento sia acuto che cronico negli animali e nell'uomo.

Le principali comprendono: le epatotossine (microcistine, MC; e nodularine, NOD), le neurotossine (anatoxina-a, omoanatoxina-a, anatoxina-a(s), saxitossine, BMAA), le citotossine quali la cilindrospermopsina, tossine gastrointestinali e con effetti cutanei acuti quali aplisiatossina, debromoapsiatossina e lingbiatossina prodotte da cianobatteri di origine marina e le endotossine lipopolisaccaridiche (LPS), potenzialmente irritanti (1, 2).

Generalmente le tossine maggiormente riscontrate appartengono alla famiglia delle MC e delle NOD.

1.3.1. Peptidi ciclici

1.3.1.1. Microcistine

Struttura chimica e proprietà

Le MC sono eptapeptidi monociclici a basso peso molecolare, costituiti da un carboidrato di bloccaggio, sette residui aminoacidici e una metilammina. Gli eptapeptidi si diversificano tra loro mediante due L-aminoacidi variabili (L-R1 e L-R2) (Figura 1).

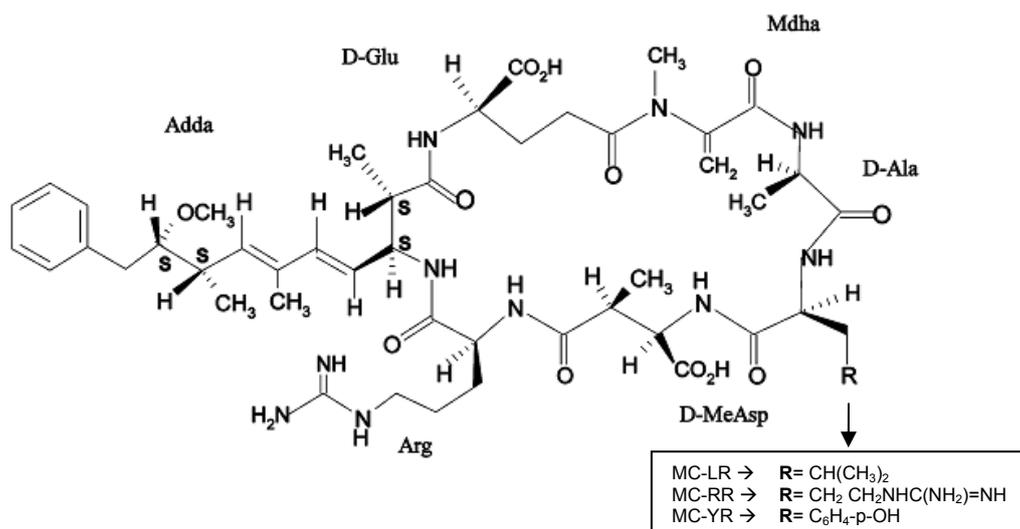


Figura 1. Struttura chimica delle microcistine più comuni

Finora sono state isolate in tutto il mondo più di 80 varianti diverse dalla prima tossina identificata, la MC-LR (2).

Le MC sono solubili in acqua, metanolo ed etanolo, insolubili in acetone, etere, cloroformio e benzene; esse sono resistenti all'idrolisi chimica e all'ossidazione a valori di pH neutri. Una rapida idrolisi chimica può avvenire solo in condizioni controllate di laboratorio quali ad es. in presenza di HCl 6M ad alta temperatura; sono ossidate invece dall'ozono e da altri agenti ossidanti forti.

Le MC sono molto stabili alla luce solare, mentre la luce UV ai valori di assorbimento massimo della MC-LR e della MC-RR le degrada rapidamente (3).

Tossicità

Meccanismo di azione

La MC-LR e la maggior parte dei suoi congeneri sono fortemente idrosolubili e generalmente non in grado di attraversare le membrane cellulari dei vertebrati e necessitano, pertanto, di una proteina trasportatrice adenosina-trifosfato dipendente (ATP).

Attraverso l'ileo grazie al sistema di trasporto degli anioni organici la MC-LR raggiunge il fegato (3); qui, all'interno degli epatociti, svolge la sua attività come potente inibitore delle fosfatasi 1 e 2A.

Tale inibizione, alle alte dosi, porta ad una iperfosforilazione delle proteine del citoscheletro e rottura finale dell'ultrastruttura epatica. Il fegato si rigonfia raddoppiando il suo volume a causa di una cospicua emorragia intraepatica centro lobulare, preceduta dal rigonfiamento degli epatociti e dalla rottura dei sinusoidi epatici.

Alle dosi più basse si ha induzione della proliferazione cellulare e ipertrofia epatica.

Alcune sostanze chimiche sono state usate in via sperimentale su animali da laboratorio per prevenire l'epatotossicità delle MC. Queste comprendono la ciclosporina A, la rifampicina e la silimarina. La loro efficacia è massima quando sono somministrate prima o contemporaneamente alla tossina (4). Altri organi che possono accumulare quantità significative della tossina sono l'intestino e i reni.

Alcuni autori giapponesi (5) hanno determinato la tossicità di 21 varianti di MC e della NOD sulla base della loro capacità di inibizione della fosfatasi 2A (IC_{50} : = *Inhibitory Concentration* 50%).

I risultati indicano che la MC-LR è l'inibitore più potente della fosfatasi 2A. Sulla base di questi valori di inibizione gli autori hanno calcolato un fattore di conversione per calcolare le concentrazioni di MC e di NOD come equivalenti di MC-LR, come riportato in Tabella 1, applicando la seguente formula:

$$\text{Fattore di conversione} = IC_{50} \text{ MC-LR} / IC_{50} \text{ MC}_{\text{considerata}}$$

Alcuni studi pubblicati suggeriscono che le MC potrebbero agire come promotori tumorali, agenti che non causano tumori, ma stimolano la proliferazione delle cellule cancerogene.

Nel giugno del 2006, la IARC (*International Agency for Research on Cancer*) ha riunito un gruppo di esperti per valutare la tossicità della MC-LR e della NOD (6, 7). La commissione concluse che non vi erano adeguate evidenze negli animali di laboratorio della cancerogenicità della MC-LR.

Tabella 1. Fattori di conversione e valori di IC50 per le 21 varianti di microcistine e della nodularina

Tossina	IC₅₀ (nM)	Fattore di conversione
MC-LR	0,032±0,004	1,000
MC-RR	0,056±0,002	0,571
MC-FR	0,069±0,003	0,464
MC-LF	0,096±0,0019	0,333
[D-Asp ³]MC-HtyR	0,098±0,006	0,327
[D-Asp ³ , (Z)-Dhb ⁷]MC-HtyR	0,110±0,008	0,291
MC-LW	0,114±0,003	0,291
[D-Asp ³ , (E)-Dhb ⁷]MC-HtyR	0,122±0,005	0,262
MC-YR	0,125±0,005	0,256
MC-LA	0,161±0,002	0,199
[D-Asp ³ , (Z)-Dhb ⁷]MC-LR	0,164±0,010	0,195
[Dha ⁷]MC-LR	0,167±0,003	0,192
MC-WR	0,179±0,011	0,179
[D-Asp ³ , (E)-Dhb ⁷]MC-LR	0,201±0,003	0,159
[D-Asp ³ , Dha ⁷]MC-RR	0,220±0,012	0,145
[D-Asp ³ , Dha ⁷]MC-LR	0,254±0,004	0,126
[Dha ⁷]MC-RR	0,293±0,012	0,109
[D-Asp ³]MC-RR	0,300±0,009	0,107
[Dha ⁷]MC-YR	0,379±0,003	0,084
NOD	0,540±0,063	0,059
[6-(Z)-ADDA ⁵]MC-RR	0,126±0,314	0,003

Farmacocinetica

Il fegato risulta essere l'organo bersaglio principale sia per quanto riguarda l'accumulo che l'escrezione delle MC. Negli studi di distribuzione tissutale su animali da laboratorio a seguito di somministrazione intraperitoneale e intravenosa di MC-LR, il 50-70% era ritrovato nel fegato, un altro 7-10% nell'intestino e la rimanente quantità distribuita in tutto il corpo. È probabile che il trasporto possa avvenire anche nel rene, dal momento che questo organo ha anche un sistema di trasporto della bile, simile a quello delle cellule intestinali dei ratti. Le MC sono resistenti all'idrolisi enzimatica e di conseguenza alla degradazione nei tessuti (8); la loro escrezione con la bile avviene come tossine tal quali o a seguito della loro coniugazione (9). Il fegato svolge un ruolo fondamentale nella detossificazione di queste tossine (10). I prodotti di detossificazione sono stati rilevati nelle urine e nelle feci. Sono stati identificati tre prodotti metabolici derivati da reazioni di coniugazione rispettivamente con il glutatione, con la cisteina e con il diene ADDA ossidato (11). A seguito di studi su topi è risultata una eliminazione plasmatica biesponenziale della MC-LR, con emivite di 0,8 e 6,9 minuti (12).

La MC-LR viene escreta rapidamente, il 75% dell'escrezione totale avviene entro 12 ore. Il restante 24% viene escreto dopo 6 giorni, di cui il 9% con le urine e il 15% più lentamente con le feci (13).

Esposizione umana

L'uomo può essere esposto alle tossine per via orale attraverso il consumo di acqua o attraverso l'assunzione di integratori a base di alghe oppure per via cutanea attraverso il contatto con acque contaminate di laghi e fiumi nel corso di attività sportive (4). Una fonte minore di esposizione è l'inalazione attraverso le docce e durante gli sport acquatici (inalazione di spray e goccioline) (2).

Effetti a breve termine

In letteratura sono riportati diversi episodi di intossicazioni acute per consumo di acque contaminate da MC con implicazioni per la salute umana dalla gastroenterite al decesso (14). Il consumo di pesce, in particolare del fegato, proveniente da acque in cui sono presenti fioriture di cianobatteri, può causare la sindrome di Haff consistente in vomito, produzione di urine di colore marrone scuro, dolori muscolari, morte per insufficienza respiratoria (4). L'uomo può essere esposto anche attraverso il consumo di integratori alimentari a base di alghe, potenzialmente pericolosi se contengono alcune specie tossiche di cianobatteri. Molti di questi prodotti contengono *Aphanizomenon flos-aquae*, un'alga verde azzurra che coesiste con *Mycrocystis aeruginosa*, la quale può in tal modo entrare nella composizione di questi prodotti ad uso umano. I Dipartimenti della Salute e dell'Agricoltura dell'Oregon (USA) hanno stabilito un limite di legge di 1 µg/g per la presenza di MC nei prodotti a base di alghe verdi-azzurre e l'obbligo di test atti a rilevare la presenza di tossine algali (15). L'esposizione cutanea, invece, può avvenire durante lo svolgimento di attività ricreative o durante l'uso di docce alimentate con acqua contaminata e può causare produzione di vescicole sulle labbra e reazioni allergiche quali dermatite da contatto, asma, febbre da fieno e congiuntiviti (4).

Effetti a lungo termine

Gli effetti sull'uomo derivanti da esposizione cronica a basse dosi di MC non sono conosciute (1). In Cina sono stati condotti studi al fine di determinare l'importanza delle MC come fattore di rischio nello sviluppo di carcinoma epatocellulare nell'uomo. L'incidenza di questa malattia in Cina è altissima, con una distribuzione geografica variabile. Le fioriture di cianobatteri ad esempio sono molto abbondanti nelle acque superficiali nel sud-est della Cina dove l'incidenza di questa tumore è la più alta di tutto il Paese (10).

Elaborazione del NOAEL e del TDI

Nel 1998 la *World Health Organization* ha elaborato un valore guida provvisorio per la presenza della sola MC-LR nell'acqua destinata al consumo umano (16). Nelle conclusioni era evidenziata l'impossibilità di elaborare valori guida provvisori per le altre MC diverse dalla LR. Tale impossibilità rimane tuttora valida. Il limite stabilito per la MC-LR nelle acque per consumo umano derivava da un NOAEL (*No Observed Adverse Effect Level*), per danni epatici, di 40 µg/kg di peso corporeo ottenuto da uno studio a 13 settimane su topi trattati con acqua di abbeverata contenente MC-LR. Sulla base di questo valore era derivato un TDI (*Tolerable Daily Intake*) di 0,04 µg/kg pc/giorno, usando un fattore di sicurezza di 1000 (100 per le differenze tra specie e intra-specie e 10 per l'esiguità dei dati disponibili). Dal TDI era ottenuto un valore guida (*Guidance Value, GV*) di 1,0 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* 0,80) e un consumo di 2 L di acqua/giorno per una persona di 60 kg di peso (10). Tale valore guida è supportato da uno studio a 44 giorni su suini abbeverati con acqua addizionata con un estratto di *M. aeruginosa* contenente MC-LR.

Nel caso siano presenti oltre alla MC-LR altre MC potrebbe essere necessario utilizzare i *Toxicity Equivalent Factor* (TEF) ed esprimere la tossicità della miscela contenente differenti MC in MC-LR equivalenti. Wolf e Frank (17) hanno calcolato i valori dei TEFs per altre MC sulla base del valore della LD₅₀ (*Lethal Dose 50%*) da studi di tossicità acuta intaperitoneale sul topo. 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 LD₅₀ della MC-LR e della tossina X, secondo l'equazione:

$$TEF_X = LD_{50} \text{ MC-LR} / LD_{50}(X)$$

lo stesso valore della MC-LR era adottato per le MC-LA, -YR e -YM, per le MC (D-asp3(E)-Dhb7)-RR e RR i valori erano rispettivamente 0,2 e 0,1.

1.3.1.2. Nodularine

Struttura chimica e proprietà

Le NOD (Figura 2) sono pentapeptidi monociclici con una struttura simile alle MC, contenenti l'aminoacido ADDA (18): 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. I vari congeneri possono avere tossicità molto diverse tra loro; è stata identificata anche una variante non tossica contenente il 6Z-stereoisomero dell'ADDA. Nella spugna di origine marina *Thenella swinhoei* è stato ritrovato un analogo della NOD chiamato motuporina, il quale presenta al posto della polare L-arginina, l'idrofobica L-valina. La motuporina potrebbe essere di origine cianobatterica dal momento che la spugna che la produce accoglie cianobatteri simbiotici. La NOD è prodotta solamente dalla *Nodularia spumigena*, cianobatterio presente nelle acque salmastre. Saito *et al.* (19) hanno isolato e identificato una nuova NOD, chiamata NOD-Har, la quale presenta al posto dell'arginina l'omoarginina.

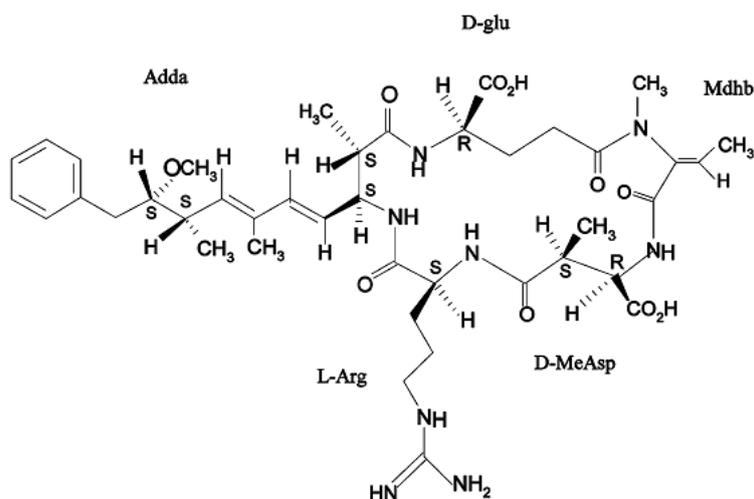


Figura 2. Struttura chimica della nodularina

Tossicità

Il meccanismo di tossicità delle NOD è molto simile a quello delle MC; sono potenti epatotossici. Le tossine entrano immediatamente nel circolo sanguigno attraverso l'ileo trasportati dagli acidi trasportatori della bile che convogliano le tossine attraverso la mucosa. Successivamente, le tossine sono trasportate in maniera preferenziale negli epatociti mediante la bile e infine le tossine inducono cambiamenti nei microfilamenti dell'actina, negli elementi delle cellule del citoscheletro con il risultato di una densa aggregazione di microfilamenti in prossimità del centro della cellula. La perdita del supporto cellulare causa rigonfiamento delle

cellule e rottura delle cellule sinusoidi endoteliali. In qualche caso, la distruzione delle cellule parenchimali e sinusoidi del fegato può causare emorragie letali intraepatiche nel giro di alcune ore o insufficienza epatica nel giro di alcuni giorni (15). Come nel caso delle MC l'attività epatotossica e cancerogena di queste tossine è associata all'inibizione delle fosfatasi 1 e 2 (20, 21). La NOD induce emorragie epatiche nel topo con una LD₅₀ di 50 µg/kg (somministrazione per via intraperitoneale). A dosi più basse può agire come promotore tumorale favorendo la divisione delle cellule epatiche (22).

Effetti sull'uomo

Non si hanno dati sugli effetti tossici sull'uomo della *N. spumigena* (3). Nel 1991 in Australia presso il Lago Alexandrina, alcune persone mostrarono eczema cutaneo dopo contatto con le acque contenenti tossine provenienti principalmente da *Nodularia* e *Microcystis* (23).

Elaborazione del NOAEL e del TDI

Non è stato elaborato un NOAEL per le NOD per mancanza di dati tossicologici idonei. Dal momento che il meccanismo di tossicità della MC-LR e delle NOD è molto simile, il valore guida della MC-LR potrebbe essere utilizzato anche per le NOD.

1.3.1.3. Cilindrospermopsina

Struttura chimica e proprietà

La cilindrospermopsina (CYN) appartiene alla classe degli alcaloidi guanidinici. La molecola è costituita da un gruppo guanidico triciclico combinato con idrossimetil-uracile (Figura 3). Essa è considerata una citotossina, dal momento che produce sia effetti citotossici che nefrotossici, sebbene anche altri organi (timo e polmone) possono essere danneggiati a seguito dell'esposizione alla tossina (1, 2); è considerata anche un potenziale cancerogeno (24). Somministrata per via orale può causare gastroenteriti a causa di lesioni alle pareti dell'intestino, epatiti per danni alle cellule epatiche, disfunzioni nel funzionamento dei reni per danni alle cellule renali ed emorragie per danni ai vasi sanguigni.

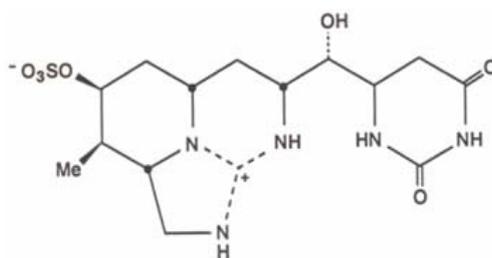


Figura 3. Struttura chimica della cilindrospermopsina

Sono state identificate otto specie di cianobatteri produttori di CYN: *Cylindrospermopsis raciborskii*, *Aphanizomenon ovalisporum* e *Aphanizomenon flos-aquae*, *Umezakia natans*, *Rhaphidiopsis curvata* e *Anabaena bergii*, *Anabaena lapponica*, e *Lygnbya wollei* (25). Tra questi *Cylindrospermopsis raciborskii* è la specie che rappresenta il problema maggiore su scala mondiale (26). La CYN è altamente idrofila; il suo assorbimento intestinale necessita di sistemi di trasporto attivo così come l'ingresso negli epatociti, utilizzando la bile come sistema di

trasporto. A causa delle ridotte dimensioni della molecola, può verificarsi una diffusione passiva, anche se limitata, attraverso la membrana cellulare, come risulta da studi *in vitro* che dimostrano gli effetti citotossici su una linea cellulare senza la presenza della bile come sistema di trasporto (27).

Tossicità

A basse dosi la CYN sopprime la sintesi proteica glutatione-coniugata, probabilmente inibendo la traduzione ribosomiale attraverso il legame ad una proteina associata con il sistema di traduzione eucariotico; ma a maggiori concentrazioni domina un processo più rapidamente tossico, metabolismo-dipendente (28,29); la sua tossicità acuta sembra essere mediata da metaboliti citocromo p 450- generati (30). Essa ha una tossicità acuta ritardata e progressiva. Il danno epatico acuto è localizzato nelle aree centro lobulari, con vacuolizzazione degli epatociti e aumentata pigmentazione dei nuclei e del citoplasma. Le principali azioni tossiche a carico dei reni si manifestano con necrosi e aumento della sezione dei tubuli prossimali e alterazione dei glomeruli. La CYN potrebbe agire anche come interferente endocrino in quanto uno studio ha evidenziato che la tossina potrebbe alterare il rapporto progesterone/estrogeni nelle donne (31). Alcuni studi su animali da laboratorio sono a favore di un possibile effetto genotossico (32) e carcinogenetico (33).

Farmacocinetica

Studi condotti su topi trattati per via intraperitoneale con 0,2 mg/kg di ¹⁴C CYN hanno dimostrato che la maggior parte della radioattività era escreta nel corso delle prime 12 ore (70,9%), principalmente nelle urine (59,6% negli animali che mostravano effetti tossici e 70,5% negli animali privi di effetti tossici). L'accumulo avveniva principalmente nel fegato con picchi del 20,6 % dopo 6 ore, e in misura minore nei reni (34).

Effetti sull'uomo

L'esposizione per via orale con acqua contaminata può causare disturbi gastrointestinali con diarrea sanguinolenta, grave disidratazione con perdita di proteine, elettroliti, glucosio e chetoni con le urine. Tutti i casi di persone esposte alla CYN necessitavano di ricovero ospedaliero, dove ricevevano cure intensive con terapie per endovena.

Elaborazione del NOAEL e del TDI

Sono stati utilizzati due studi per l'elaborazione di un NOAEL/TDI. Il primo studio a 90 giorni su topi abbeverati con acqua contaminata ha prodotto un NOAEL di 150 µg/kg di peso corporeo e sulla base di tale valore è stato calcolato un TDI di 0,3 µg/kg pc/giorno usando un fattore di sicurezza di 500 (10 per la variabilità intraspecie, 10 per quella interspecie e 5 per la durata dell'esposizione inferiore alla durata della vita dell'animale). Dal TDI era ottenuto un GV di 9 µg/L avendo considerato che l'assunzione attraverso l'acqua potabile rappresenti il 100% della assunzione totale e un consumo di 2 L di acqua/giorno per una persona di 60 kg di peso (33).

Il secondo studio è stato condotto su topi trattati per gavaggio per 11 settimane, con un NOAEL di 30 µg/kg di peso corporeo e un TDI di 0,06 µg/kg pc/giorno usando un fattore di sicurezza di 500 (10 per la variabilità intraspecie, 10 per quella interspecie e 5 per la durata dell'esposizione inferiore alla durata della vita dell'animale). Dal TDI era ottenuto un GV di 1,8 µg/L avendo considerato che l'assunzione attraverso l'acqua potabile rappresenti il 100% della assunzione totale e un consumo di 2 L di acqua/giorno per una persona di 60 kg di peso (35). Alcuni autori raccomandano un ulteriore fattore 10 di sicurezza per potenziali effetti genotossici.

1.3.2. Alcaloidi

1.3.2.1. Anatossine

Struttura chimica e proprietà

L'anatossina-a (ANA-a) e l'omoanatossina-a sono alcaloidi a basso peso molecolare ad azione neurotossica. In particolare l'ANA-a è un alcaloide amminico biciclico con peso molecolare di 165 Da, un'ammina secondaria 2-acetyl-9-azabicyclo(4-2-1)non-2-ene) (36). È prodotta da *Anabaena flos-aquae*, *Anabaena* spp. (*flos-aquae-lemmermannii* group), *Anabaena planktonica*, *Oscillatoria*, *Aphanizomenon* e *Cylindrospermum*, è sintetizzata nella cellula a partire dall'amminoacido ornitina attraverso la putrescina con la partecipazione dell'enzima ornitina decarbossilasi. L'ANA-a non è suscettibile ad idrolisi enzimatica da parte della colinesterasi dal momento che non è un estere. L'omoanatossina-a (179 Da) è un analogo dell'ANA-a ed è isolata da un ceppo di *Oscillatoria formosa* (*Phormidium formosum*). Essa ha un gruppo propionilico in posizione C-2 invece del gruppo acetilico presente nell'ANA-a (1, 23). La ANA-a(s) ha una struttura chimica diversa essendo un estere fosforico della N-idrossi guanidina.

Tossicità

Meccanismo di azione

L'ANA-a è un potente agente depolarizzante pre- e postsinaptico. Si lega ai recettori dell'acetilcolina nel sistema nervoso centrale e periferico e nelle giunzioni neuromuscolari, con blocco della trasmissione dell'impulso nervoso. La morte sopraggiunge per paralisi muscolare e asfissia. Gli effetti acuti sembrano rappresentare il rischio principale per la salute umana. L'ANA-a(s) inibisce l'attività dell'acetilcolinesterasi ma solo nel sistema nervoso periferico. A causa del blocco dell'idrolisi l'acetilcolina si accumula con conseguente ipereccitabilità nervosa. Il tipo di azione è simile a quello di molti organofosfati, comunemente usati come pesticidi (2, 37, 38).

Effetti sull'uomo

Non si hanno dati a disposizione sull'uomo, sebbene un recente episodio di morte accidentale di un ragazzo avvenuto negli Stati Uniti sia stato attribuito all'ANA-a a seguito di ingestione di acqua contaminata nel corso di attività ricreative.

Elaborazione del NOAEL e del TDI

I dati sono insufficienti per ottenere un NOAEL o un LOAEL e calcolare un TDI.

1.3.3. Altre tossine

1.3.3.1. Lingbiatossine

La lingbiatossina-a trovata in un ceppo di *Lyngbya majuscola* presente in acque superficiali è stata collegata alla comparsa di dermatiti e gravi infiammazioni orali e gastrointestinali nell'uomo. Inoltre può agire come promotore di tumori cutanei (39).

1.3.3.2. Aplisiatossina, debromoaplisiatossina

I sintomi caratteristici derivanti dall'avvelenamento da queste tossine consistono in disturbi intestinali e grave irritazione della bocca e della gola (39).

Bibliografia

1. Chorus I, Bartram J (Ed.). *Toxic cyanobacteria in water: a guide to their public health consequences, monitoring and management*. London and New York: E & F.N. Spon; 1999.
2. Carmichael WW. Health effects of toxin-producing cyanobacteria: "The CyanoHabs". *Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal* 2001;7(5):1393-407.
3. Hitzfeld BC, Höger SJ, Dietrich DR. Cyanobacterial toxins, removal during drinking water treatment, and human risk assessment, *Environment Health Perspect* 2000;108(Suppl 1):113-22.
4. Rao PV L, Gupta N, Bhaskar ASB, Jayaraj R. Toxins and bioactive compounds from cyanobacteria and their implications on human health. *Journal of Environmental Biology* 2002;23(3):215-24.
5. Ikehara T, Imamura S, Sano T, Nakashima J, Kuniyoshi K, Oshiro N, Yoshimoto M, Yasumoto T. The effect of structural variation in 21 microcystins on their inhibition of PP2A and the effect of replacing cys269 with glycine. *Toxicon* 2009;54(4):539-44.
6. IARC. *Ingested nitrates and nitrites, and cyanobacterial peptide toxins*. Lyon: International Agency for Research on Cancer; 2006.
7. Grosse Y, Baan R, Straif K, Secretan B, El Ghissassi F, Coglianò V. Carcinogenicity of nitrate, nitrite, and cyanobacterial peptide toxins. *The Lancet Oncology* 2006;7(8):628-9.
8. Runnegar MTC, Gerdes RG, Falconer IR. The uptake of the cyanobacterial hepatotoxin microcystin by isolated rat hepatocytes. *Toxicon* 1991;29(1):43-51.
9. Lambert TW, Holmes CFB, Hrudney SE. Microcystin class of toxins: health effects and safety of drinking water supplies. *Environmental Review* 1994;2(2):167-86.
10. Runnegar MTC, Falconer IR. Isolation, characterization, and pathology of the toxins from the blue-green alga *Microcystis aeruginosa*. In: Carmichael WW (Ed.). *The water environment: algal toxins and health*. New York: Plenum Press; 1981. p. 325-42.
11. Falconer IR, Buckley TH, Runnegar MTC. Biological half-life, organ distribution and excretion of 125I-labelled toxic peptide from blue-green alga *Microcystis aeruginosa*. *Australian Journal of Biological Sciences* 1986;39(1):17-21.
12. Brooks WP, Codd GA. Distribution of *Microcystis aeruginosa* peptide toxin and interactions with hepatic microsomes in mice. *Pharmacology and Toxicology Journal* 1987;60(3):187-191.
13. Kondo F, Matsumoto H, Yamada S, Ishikawa N, Ito E, Nagata S, Ueno Y, Suzuki M, Harada KI. Detection and identification of metabolites of microcystins formed *in vivo* in mouse and rat livers. *Chemical Research Toxicology* 1996;9(8):1355-9.
14. DeVries SE, Galey FD, Namikoshi M, Woo JC. Clinical and pathologic findings of blue-green algae (*Microcystis aeruginosa*) intoxication in a dog. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 1993;5(3):403-8.
15. Gilroy DJ, Kauffman KW, Hall RA, Huang X, Chu FS. Assessing potential health risks from microcystin toxins in blue-green algae dietary supplements. *Environmental Health Perspect* 2000;108(5):435-9.
16. World Health Organization. *Guidelines for drinking-water quality 1998, 2nd Ed. Addendum to Volume 2 Health criteria and other supporting information*. Geneva: WHO; 1998. p. 94-110.

17. Wolf HU, Frank C, Toxicity assessment of cyanobacterial toxin mixtures. *Environmental Toxicology* 2002;17(4):395-9.
18. Rinehart KL, Harada K, Namikoshi M, Chen C, Harvis CA. Nodularin, microcystin and the configuration of Adda. *Journal of the American Chemical Society* 1988;110(25):8557-8.
19. Saito K, Konno A, Ishii H, Saito H, Nishida F, Abe T, Chen C. Nodularin- Har, a new nodularin from *Nodularia*. *Journal of Natural Products* 2001;64(1):139-41.
20. Eriksson JE, Meriluoto JA, Kujari HP, Osterlund K, Fagerlund K, Hallbom L. Preliminary characterization of a toxin isolated from the cyanobacterium *Nodularia spumigena*. *Toxicon* 1988;26(2):161-6.
21. Honkanen RE, Dukelow M, Zwiller J, Moore RE, Khatra BS, Boynton AL. Cyanobacterial nodularin is a potent inhibitor of type 1 and type 2A protein phosphatases. *Molecular Pharmacology* 1991;40(4):577-83.
22. Ohta T, Sueoka E, Iida N, Komori A, Suganuma M, Nishiwaki R, Tatematsu M, Kim SJ, Carmichael WW, Fujiki H. Nodularin, a potent inhibitor of protein phosphatases 1 and 2A, is a new environmental carcinogen in male F344 rat liver. *Cancer Research* 1994;54:6402-6.
23. Duy TN, Lam PKS, Shaw G, Connell DW. Toxicology and risk assessment of freshwater cyanobacterial (bluegreen algal) toxins in water. *Reviews of Environmental Contamination & Toxicology* 2000;163:113-86.
24. Humpage AR, Fenech M, Thomas P, Falconer IR. Micronucleus induction and chromosome loss in transformed human white cells indicate clastogenic and aneugenic action of the cyanobacterial toxin, cylindrospermopsin. *Mutation Research* 2000;472(1-2):155-61.
25. Pearson L, Mihali T, Moffitt MK, Kellmann R, Neilan B. On the chemistry, toxicology and genetics of the cyanobacterial toxins, microcystin, nodularin, saxitoxin and cylindrospermopsin. *Marine Drugs* 2010;8(5):1650-80.
26. Neilan BA, Saker ML, Fastner J, Torokne A, Burns BP. Phylogeography of the invasive cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii*. *Molecular Ecology* 2003;12(1):133-40.
27. Chong MWK, Wong BSF, Lam PKS, Shaw GR, Seawright AA. Toxicity and uptake mechanism of cylindrospermopsin and lophytotoxin in primary rat hepatocytes. *Toxicon* 2002;40(2):205-11.
28. Froscio SM, Humpage AR, Burcham PC, Falconer IR. Cell-free protein synthesis inhibition assay for the cyanobacterial toxin cylindrospermopsin. *Environmental Toxicology* 2001;16(5):408-12.
29. Froscio SM, Humpage AR, Wickramasinghe W, Shaw G, Falconer IR. Interaction of the cyanobacterial toxin cylindrospermopsin with the eukaryotic protein synthesis system. *Toxicon* 2008;51(2):191-8.
30. Humpage AR, Fontaine F, Froscio S, Burcham P, Falconer IR. Cylindrospermopsin genotoxicity and cytotoxicity : role of cytochrome P-450 and oxidative stress. *Journal of Toxicology and Environmental Health. Part A*, 2005;68(9):739-53.
31. Young FM, Micklem J, Humpage AR. Effects of blue-green algal toxin cylindrospermopsin (CYN) on human granulosa cells *in vitro*. *Reproductive Toxicology* 2008;25(3):374-380.
32. Rogers EH, Zehr RD, Gage MI, Humpage AR, Falconer IR, Marr M, Chernoff N. The cyanobacterial toxin, cylindrospermopsin, induces fetal toxicity in the mouse after exposure late in gestation. *Toxicon* 2007;49(6):855-64.
33. Falconer IR, Humpage AR. Preliminary evidence for *in vivo* tumour initiation by oral administration of extracts of the blue-green alga *Cylindrospermopsis raciborskii* containing the toxin cylindrospermopsin. *Environmental Toxicology* 2001;16(2):192-195.
34. Briand JF, Jacquet S, Bernard C, Humbert JF. Health hazards for terrestrial vertebrates from toxic cyanobacteria in surface water ecosystems. *Veterinary Research* 2003;34(4):361-77.

35. Griffiths DJ, Saker ML. The palm island mystery disease 20 years on, a review of research on the cyanotoxin cylindrospermopsin. *Environmental Toxicology* 2002;18(2):78-93.
36. USEPA. *Creating a cyanotoxin target list for the unregulated contaminant monitoring rule*. USEPA Technical Service Center, Cincinnati, Ohio, USA, Meeting Summary May 17–18, 2001.
37. Devlin JP, Edwards OE, Gorham PR, Hunter NR, Pike RK, Stavric B. Anatoxin-a, a toxic alkaloid from *Anabaena flos-aquae* NRC-44h. *Canadian Journal of Chemistry* 1977;55(8):1367-71
38. Astrachan NB, Archer BG, Hilberlink DR. Evaluation of the subacute toxicity and teratogenicity of anatoxin-a. *Toxicon* 1980;18(5-6):684-8.
39. Osborne NJT, Webb P, Shaw GR. The toxins of *Lyngbya majuscula* and their human and ecological health effects. *Environmental International* 2001;27(5):381-92.

1.4. FENOMENI TOSSICI E IMPATTO SULLE ACQUE PER CONSUMO UMANO IN ITALIA

Simonetta Della Libera (a), Emanuela Viaggiu (b)

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

(b) Dipartimento di Biologia, Università degli Studi di Roma Tor Vergata, Roma

In Italia vengono segnalati periodicamente fioriture (bloom) di cianobatteri in laghi e in invasi e, nel caso in cui le acque interessate dalle fioriture vengano utilizzate a scopi potabili, si può instaurare un rischio da esposizione cronica alle cianotossine da essi prodotte. Tuttavia, i trattamenti di potabilizzazione impiegati prima dell'utilizzo di tali acque, dovrebbero portare alla riduzione delle cellule algali presenti e quindi delle tossine disciolte rimuovendo efficacemente almeno il 99% della massa cellulare delle alghe (1).

Indipendentemente dalla loro tossicità, cianobatteri e microalghe interferiscono sulla qualità dell'acqua potabile. Negli impianti tradizionali a preclorazione, precipitazione, filtrazione rapida e postclorazione, le difficoltà di rimozione della biomassa algale variano in base alle dimensioni cellulari, il processo di rimozione è meno complesso per diatomee e cloroficee, più articolato per i cianobatteri, soprattutto se filamentosi. Cianobatteri e microalghe e i metaboliti rilasciati interferiscono, quindi, con i sistemi di potabilizzazione incidendo fortemente sui costi di trattamento e sulla loro efficacia. Già l'allungamento dei tempi di potabilizzazione comporta la necessità di adeguamenti impiantistici (es. vasche di maggiori capacità); inoltre gli interventi vanno modulati in funzione della variabilità quali/quantitativa della popolazione algale; occorre effettuare le rigenerazioni e i lavaggi al momento opportuno e calibrare accuratamente gli additivi tenendo conto del fatto che la concentrazione richiesta può variare con il ciclo nictemerale delle alghe nell'acqua grezza. La difficoltà di rimozione di cianobatteri e microalghe, è di natura meccanica, fisica e chimica: meccanica poiché i filamenti e le colonie si frammentano e superano così più facilmente gli sbarramenti costituiti dalle varie sezioni dell'impianto; di natura fisica poiché i gas intracellulari fanno galleggiare le cellule aggregate e di ordine chimico poiché gli esopolimeri che le circondano ostacolano la complessazione e la flocculazione, anche con dosi elevate di additivi (2).

I trattamenti meccanici e fisici sono da preferire a quelli chimici (3). I filtri lenti sono molto più efficienti di quelli rapidi. Alcuni cianobatteri (es. *Planktothrix rubescens*) possono però penetrare la barriera costituita da letti di filtrazione, soprattutto quando le loro concentrazioni nelle acque grezze siano superiore a 100×10^6 cell/L. La microfiltrazione consente una rimozione di circa l'80-90% delle forme filamentose e del 65% di quelle coloniali mucillaginose. Per rimuovere la maggior parte delle microfite la flottazione può essere più efficiente della flocculo-sedimentazione.

I sistemi tradizionali di filtrazione non sono comunque sufficientemente efficienti nel rimuovere la totalità delle tossine algali. Alcuni esperimenti hanno dimostrato che i trattamenti di flocculazione-filtrazione-coagulazione consentono un minimo decremento della concentrazione delle tossine (4). La loro rimozione dagli impianti di trattamento vede come sistema principale, per sicurezza ed efficienza, l'uso dei filtri a carboni attivi, in granuli (*Granular Activated Carbon*, GAC) o in polvere (*Powdered Activated Carbon*, PAC) (5). I primi sono ad elevatissima attività e di facile uso, ma costosi e con necessità di manutenzione periodica per evitare la saturazione. Per ottimizzare l'adsorbimento, inoltre, è necessario un tempo di contatto superiore a 15 min. I filtri in polvere, meno costosi dei primi, devono essere di buona qualità, alta densità di mesopori con diametro da 2 a

50 nm, e micropori inferiori a 2 nm. Oltre ai carboni attivi, altri metodi per l'eliminazione di microcistine (MC) comprendono l'uso di ipoclorito di calcio, permanganato di potassio e cloro acquoso. L'efficienza di questo metodo è strettamente dipendente dal pH, che deve essere inferiore a 8 (6). Anche l'ozonizzazione risulta efficace, mentre le monocloramine, il perossido di idrogeno e la nanofiltrazione sono totalmente inefficaci nell'eliminazione delle tossine (7). La valutazione del rischio sarà basata sempre sul livello della concentrazione totale di tossina, tenendo conto però, che il contributo maggiore sarà espresso dalla componente disciolta. Dopo il rilascio, le MC resistono nell'ambiente in media fino a tre settimane e, per questo motivo, è sconsigliabile l'uso delle acque a fini potabili prima di un mese dalla scomparsa della fioritura (8).

Anche se un processo di potabilizzazione è in grado di rimuovere gran parte delle cellule algali, la somma del contenuto di tossine presenti a livello intra- ed extracellulare è considerato generalmente nell'acqua potabile l'indice più importante nella valutazione del rischio di esposizione a tali tossine. Per le cianotossine, la normativa italiana non prevede, a tutt'oggi, valori di riferimento: qualora si sospetti la presenza di forme tossiche in concentrazioni tali da rappresentare un potenziale pericolo per la salute umana, l'autorità sanitaria competente provvederà all'allestimento del piano di controllo come previsto nel DL.vo 31/2001, art. 8 e relativi allegati per la ricerca dei parametri accessori. L'Organizzazione Mondiale della Sanità (*World Health Organization*, WHO), tuttavia, ha definito dei valori guida per alcune specie tossiche già inserite da molte nazioni nei regolamenti delle proprie legislazioni.

In Italia, il panorama scientifico di settore è povero di dati riguardanti l'azione tossica, sia acuta che cronica, espletata da molte specie di cianobatteri e microalghe.

Nelle acque dolci, le fioriture algali con produzione di tossine, sono generalmente legate alla presenza dei cianobatteri; le prime osservazioni su di esse, risalgono, in Italia, al 1977. Un'imponente fioritura di cianobatteri tossici interessò, nel 1985, due grandi invasi artificiali della Sardegna, il Medio Flumendosa e il Mulargia, costruiti a scopo di approvvigionamento di acqua potabile. In entrambi venne riscontrata la presenza dominante di *Planktothrix rubescens*, *Microcystis aeruginosa*, e *Dolichospermum planctonicum* (ex *Anabaena planctonica*) (9, 10). Oggi, tale fenomeno è documentato anche nel resto della penisola, in regioni quali: Lombardia, Trentino-Alto Adige, Emilia Romagna, Toscana, Lazio, Molise, Sicilia, Calabria e Sardegna (vedi Sez. 1.2) e si verifica con sempre maggiore frequenza anche nelle alte regioni. L'evidente tendenza all'aumento del fenomeno sta ad indicare un generale peggioramento della qualità trofica dei corsi d'acqua italiani.

Nella nostra penisola le specie tossiche di cianobatteri più diffuse sono (11):

- *Anabaena solitaria* f. *planctonica*;
- *Aphanizomenon flos-aquae*;
- *Aphanocapsa* spp.;
- *Cylindrospermopsis raciborskii*;
- *Dolichospermum planctonicum*, *D. flos-aquae*, *D. lemmermannii*, *D. crassum*, *D. smithii*;
- *Lyngbya* sp.;
- *Microcystis aeruginosa*, *M. flos-aquae*, *M. wesenbergii*, *M. panniformis*;
- *Planktothrix rubescens*, *P. agardhii*;
- *Pseudoanabaena* spp.;
- *Woronichinia* spp.

Durante il periodo di fioritura si osserva la prevalenza di una o al massimo di due specie: in Italia per quanto riguarda il genere *Planktothrix* di solito si rileva la specie *P. rubescens*, per *Microcystis* si riscontra generalmente *M. aeruginosa*, ma in alcuni laghi si è notata anche la presenza co-dominante di più specie di cianobatteri (11). In realtà è difficile stabilire una lista di specie a maggiore diffusione perché spesso i dati quantitativi relativi all'abbondanza sono carenti o lacunosi e si riferiscono per lo più a episodi sporadici e non a serie annuali. Tuttavia, nei bloom che hanno interessato gli invasi della Sardegna la specie dominante nel periodo 1990-

1998 è risultata sempre essere *M. aeruginosa* mentre, nel resto dell'Italia, è emersa la prevalenza, come specie dominante, *P. rubescens* seguita poi da *M. aeruginosa* (12).

A causa dei processi di eutrofizzazione, le fioriture di cianobatteri sono aumentate di frequenza e di intensità, anche nelle acque che alimentano gli acquedotti siciliani, dove gli studi condotti negli anni 1994-1997 hanno portato a identificare complessivamente 28 taxa, tra i quali i generi più comuni sono stati *Dolichospermum*, *Microcystis* e *Planktothrix* (13). A causa dei processi di eutrofizzazione che hanno portato ad un aumento dei nutrienti quali azoto e fosforo si è osservato un crescente aumento di alcune specie di cianobatteri in modo particolare *Microcystis*, mentre le alghe verdi, un tempo dominanti, sono state sostituite nella quasi totalità.

Per praticità di lettura gli eventi relativi ai bloom algali tossici rilevati negli ultimi 10 anni sul territorio nazionale sono stati schematizzati nelle tabelle successive (Tabelle 1-5).

Tabella 1. Fioriture di specie di *Microcystis* avvenute in Italia e tipo di tossine identificate

Bacino (rif.)	Specie	Periodo	Bloom (cell/L)	Tipo di tossina*	MC-LR eq (µg/L)	Quantità di tossina
Lombardia						
Como (15, 17)	<i>M. aeruginosa</i>	ott 2006 ago/set 2003	1,1 x10 ⁵			
Piona (20)	<i>M. aeruginosa</i>	ago 2000	1 x10 ⁵	MC	1,3	
Monate (16)	<i>M. aeruginosa</i>		5,46-40,9 x10 ⁵			
Garda (19)	<i>M. aeruginosa</i>	1995/1999	1,74x 10 ⁶			
Trentino						
Caldonazzo (20)	<i>M. aeruginosa</i>	1996/1999				
Marche						
Polverina (11)	<i>M. aeruginosa</i>	ago 1998		MC-LR		50 µg/g ww
Umbria						
Trasimeno (11)	<i>M. aeruginosa</i>	set 2000 set 2004 mag/ott 2005		MC-RR +dmMC-RR		39 µg/g ww
Toscana						
Massacciuccoli (11)	<i>M. aeruginosa</i>	giu/dic 2004		MC-LA MC-YR MC-LR		2,3x10 ⁻³ µg/mL 150 µg/g ww 170 µg/g ww
Molise						
Liscione (11)	<i>M. aeruginosa</i>	1991, 2001		MC-LR		15,7 µg/g dw
Calabria						
Cecita (11)	<i>M. aeruginosa</i>			MC		+
Sicilia						
Arancio (13,14, 18)	<i>M. aeruginosa</i> <i>M. aeruginosa</i> <i>M. wesenbergii</i> <i>Microcystis</i> spp. <i>Microcystis</i> spp.	1990 estate 1993 1993 lug-ott 2001 estate 2003	1,09 x10 ⁸ 1,5 x10 ⁷			
Rosamarina (13)	<i>M. aeruginosa</i>	1993		MC-YR/ LR MC-YR/ LR	2359 40	
Villarosa (14)	<i>Microcystis</i> spp.	1990	1,1 x10 ⁷			
Piana degli Albanesi (14)	<i>M. aeruginosa</i>		1,5 x10 ⁷			
Sardegna						
Liscia (11)	<i>M. aeruginosa</i>	set 1991 set-ott 2003 sett-dic 2004		MC-LR		380 µg/g ww
Monteleone (11)	<i>Microcystis</i> spp.	nov 2004		MC-LW		2,27x10 ⁻³ µg/mL
Cedrina (11)	<i>Microcystis</i> spp.	1998		MC-RR		0,5 µg/g ww

* MC = congenere di microcistina non identificato, MC-LR = microcistina-LR, MC-YR = microcistina-YR, MC-LA = microcistina-LA, MC-LW = microcistina-LW, dmMC-RR = dimetil microcistina-RR), +: presenza di MC

Tabella 2. Fioriture di specie di *Anabaena* e *Dolichospermum* (ex *Anabaena*) avvenute in Italia

Bacino (rif.)	Specie	Periodo	Bloom (cell/L)	Tipo di tossina*	Quantità di tossina (µg/g)
Lombardia					
Monate (16)	<i>Dol. spiroides</i>		4-8x10 ³		
Iseo (17, 22)	<i>Dol. lemmermannii</i>		2-4x10 ²		
	<i>Dol. flos-aquae</i>				
Garda (17, 19)	<i>Dol. lemmermannii</i>	2001	4 x10 ⁵		
	<i>Dol. lemmermannii</i>		2,5 x10 ²		
	<i>Dol. lemmermannii</i>	lug.1996	9,48x10 ⁵		
Sardegna					
Monteleone (10)	<i>Anabaena</i> spp.			MCYST(s) _(ex) CYN	
Mulgaria (10)	<i>Dol. planctonicum</i>	lug.1990		ANA-a dw	100
Sicilia					
Arancio (13, 14)	<i>Dol. f. smithii</i>	ago-set 1991	3,4x10 ⁷		
	<i>A. solitaria planctonicum</i>	1993	3,8x 10 ⁷		
Soprano (14)	<i>Dol. f. smithii</i>				
	<i>Dol. flos-aquae</i>		5,7x10 ⁷		
Rubino (14)	<i>Dol. flos-aquae</i>		2,1x10 ⁷		
Piana degli Albanesi (14)	<i>Dol. crassum</i>		2,8x10 ⁷		
	<i>A. solitaria f. planctonicum</i>		1,3x10 ⁷		
Gammata (14)	<i>Dol. f. smithii</i>		1,0x10 ⁷		

* ANA-a = anatossina-a, CYN= cylindrospermopsina, MCYST(s)_(ex) = microcistine extracellulari

Tabella 3. Fioriture di specie di *Aphanizomenon* avvenute in Italia

Bacino (rif.)	Specie	Periodo	Bloom (cell/L)	Tipo di tossina	Presenza intra/extracell	Quantità di tossina
Trentino						
Caldonazzo (20)	<i>Aph. flos-aquae</i>	estate				
Lombardia						
Lugano (23, 26)	<i>Aph. flos-aquae</i>	1999 2002	14-65 x10 ⁵			
Lazio						
Albano (11, 25, 27)	<i>Aph. flos-aquae</i>			CYN	intracell ww	350,29 µg/g
	<i>Aph. flos-aquae</i>			CYN	extracell ww	0,015 µg/mL
	<i>Aph. flos-aquae</i>			CYN	intracell ww	0,634 µg/g
	<i>Aph. flos-aquae</i>			CYN	extracell ww	3,28x10 ⁻³ µg/g
	<i>Aph. flos-aquae</i>			CYN	intracell ww	4235,29 µg/g
	<i>Aph. flos-aquae</i>			CYN	intracell ww	0,033 µg/g
	<i>Aph. flos-aquae</i>			CYN	extracell ww	1,6 µg/mL
	<i>Aph. flos-aquae</i>			CYN	intracell ww	0,032 µg/g
	<i>Aph. flos-aquae</i>			CYN	extracell ww	2,1 µg/mL
	<i>Aph. ovalisporum</i>	lug. 2008	2,4x10 ³	CYN		2x10 ⁻⁴ µg/mL
<i>Aph. ovalisporum</i>	ott. 2008	113x10 ³	CYN		1,5x10 ⁻³ µg/mL	
Campania						
Averno (24)	<i>Aph. flos-aquae</i> <i>Cylindrospermopsis</i>			CYN		3,34x10 ⁵ µg/g dw
Sicilia						
Rosamarina (14)	<i>Aphanizomenon</i> sp.					

Tabella 4. Fioriture di specie di *Planktothrix* avvenute in Italia

Bacino (rif.)	Specie	Periodo	Bloom (cell/L)	Tipo di tossina	MC-LR eq (µg/L)	Quantità di tossina (µg/g)
Lombardia						
Garda (23)	<i>P. rubescens/agardhii</i>	1995/99	8,874 x10 ⁶			
	<i>Planktothrix</i> sp.	1999	6 x10 ⁸			
	<i>Planktothrix</i> sp.	1999	8-9 x10 ⁸			
Iseo (28, 23)	<i>P. rubescens</i>	apr 1993	1,947x10 ⁷			
		mar 1994	5,535 x10 ⁶			
		giu 1998	4,143 x10 ⁶			
		ott 1998	1,289x10 ⁷			
		mag 1999	2,865x10 ⁶			
		lug 1999	1,29x10 ⁷			
		ott 1999	2,8x10 ⁷			
					5x10 ⁶	MC (schiuma) MC-RR
Como (15)	<i>P. rubescens</i>	sett 1997	3,17x10 ⁷			
		mag 1998	1,035 x10 ⁶			
		nov. 1998	1,647x 10 ⁶			
		apr 1999	1,1 x10 ⁷			
		ago 1999	2,9 x10 ⁷			
Marche						
Gerosa (27, 19)	<i>P. rubescens</i>		>40 x10 ⁶	dmMC-RR MC-RR MC-YR dmMC-LR	1,03-0,007	
		apr 2004	40 x10 ⁶			
		2003	>1 x 10 ⁶			
Fiastrone (30)	<i>P. rubescens/agardhii</i>	sett 2003	1 x 10 ⁸	MC	0,5-3 ppb	
		<i>P. agardhii</i>		MC-RR		32 ww
		gen-feb 2003	2-3 x 10 ⁷			
		giu 2003	5 x 10 ⁶			
		sett. 2003	9 x 10 ⁶			
Borgiano	<i>P. rubescens/agardhii</i>	sett 2003	5 x 10 ⁷			
		nov-dic 2003	1 x 10 ⁸			
		dic 2003	1,3 x 10 ⁷			
		gen-giu 2003	3,2 x 10 ⁶			
Le Grazie (30)	<i>P. rubescens</i>	giu 2003	7 x 10 ⁵			
		gen-apr-nov 2003	1 x 10 ⁶		<0,5 ppb	
Lazio						
Albano (11, 31)	<i>P. rubescens</i>	mag, giu, ott, nov, dic 2004		MC-RR dmMC-RR MC-RR		198,8ww
		gen-mag 2005				80,3 ww
						74 ww
San Puoto (9, 32)	<i>P. rubescens</i>			MC-YR		1160

segue

continua

Bacino (rif.)	Specie	Periodo	Bloom (cell/L)	Tipo di tossina	MC-LR eq (µg/L)	Quantità di tossina (µg/g)
Puglia						
			1,6 x 10 ⁸		5	
				MC _(extracell)	0,5	
				MC _(intracell)	10,1	
				MC _(extra+intra)	10,6	
				MC _(totale)	4,1	
Occhito (32, 33)	<i>P. rubescens</i>			MC _(extracell)	0,6-0,7	
				MC _(intracell)	14,6	
				MC _(extra+intra)	15,2	
				MC _(totale)	5,4	
				MC _(extracell)	0,5	
				MC _(intracell)	13,4	
				MC _(extra+intra)	13,9	
				MC _(totale)	9,2	
Sicilia						
	<i>P. agardhii</i>	1991	1,7 x 10 ⁷			
Arancio (18)	<i>P. rubescens</i>	2003	1,0 x 10 ⁷		1100	
	<i>P. agardhii</i>					
S. Giovanni (14)	<i>P. agardhii</i>	1991	7,9 x 10 ⁷			
Trinità (14)	<i>P. agardhii</i>	1991	1,49 x 10 ⁸			
Pozzillo (18)	<i>P. rubescens</i>		>5010 ⁹	MC-RR MC-LR MC	34000	
Pizzi (18)	<i>P. rubescens</i>			MC-RR	7	
Sardegna						
Simbizzi (9)	<i>P. rubescens</i>	gen 1989	7 x 10 ⁴	MC-RR+dmMC-RR		480 dw
				MC-YR		220
Flumentosa (9,11)	<i>P. rubescens</i>	2003 1993-94	7 x 10 ⁷ 8 x 10 ⁷ 7 x 10 ⁴			
Mulargia (11)	<i>P. agardhii</i>			MC-RR +dmMC-RR MC-YR		

Tabella 5. Fioriture di *Cylindrospermopsis raciborskii* avvenute in Italia

Lago (rif.)	Specie	Periodo	Bloom (cell/L)	Tipo di tossina*	Quantità di tossina
Lazio					
Albano (35, 36)	<i>C. raciborskii</i>	lug 2004	6,1x10 ⁶	CYN _(intr)	0,0915 µg/g ww
		lug 2004	6,0 x10 ⁶	CYN	0,015 µg/mL
				CYN	410-18430 µg/L
Umbria					
Trasimeno (35)	<i>C. raciborskii</i>	sett 2004	9x10 ⁶	CYN	4,6 10 ⁻⁴ µg/mL
Sardegna					
Cedrino (35)	<i>C. raciborskii</i>	ott 2004	81x10 ⁶		

*CYN= Cilindrospermopsina; CYN_(intr)= Cilindrospermopsina intracellulare

Da questa analisi dei dati disponibili in letteratura, sebbene incompleti e frammentati, è emerso che le specie tossiche più comuni appartengono ai generi *Microcystis*, *Planktothrix*, *Aphanizomenon*, *Dolichospermum*, *Anabaena* e *Cylindrospermopsis* (sez. 1.2). Questi dati fanno riferimento a 38 laghi italiani, alcuni dei quali sono stati interessati da bloom tossici ovvero è stato possibile accertare la tossicità e quindi indicare il tipo di molecola presente; mentre per altri laghi erano disponibili soltanto informazioni riguardanti i valori di densità algale e biovolume. In generale, i valori di densità totale riportati nelle tabelle, mostrano grande variabilità; ad esempio, per quanto riguarda specie di *Microcystis* le concentrazioni variano da un minimo di 10^3 cell/L (Lago Monate, Lombardia) a un massimo di 10^8 cell/L (Lago Arancio, Sicilia). La densità delle specie di *Dolichospermum* varia da concentrazioni minime di 10^2 cell/L (Lago di Iseo e Lago di Garda, Lombardia) a concentrazioni massime di 10^7 cell/L (nei laghi della Sicilia). *Planktothrix rubescens* mostra valori minimi di 10^4 cell/L (Lago Simbizzi e Lago Mulargia, Sardegna) e valori massimi pari a 10^9 cell/L (Lago Pozzillo, Sicilia), mentre *Cylindrospermopsis raciborski* ha colonizzato gli invasi di acqua dolce con concentrazioni minime pari a 10^6 cell/L (Lago Albano, Lazio) e massime di 10^7 cell/L (Lago Cedrino, Sardegna). Per quanto riguarda la densità di *Aphanizomenon ovalisporum* e *A. flos-aquae*, in letteratura non ci sono dati disponibili, ma per queste due specie è possibile dedurre esclusivamente il valore del biovolume riportato per alcuni bacini (Sicilia, Lombardia e Trentino-Alto Adige).

I fenomeni di bloom, che hanno interessato i suddetti laghi italiani, si sono manifestati con presenza di MC, cilindrospermospine (CYN) e anatossina-a (ANA-a), prodotte da specifici gruppi di cianobatteri.

Dai dati è emersa una predominanza di MC, e più raramente la presenza di CYN e neurotossine (ANA-a).

Per quanto riguarda le microcistine, la cui tossicità è cumulativa, le varianti riportate sono sei: desmetil-MC-RR, MC-RR, MC-YR, MC-LR, MC-LA, MC-LW (37). Alcuni campioni, come ad esempio quelli degli invasi marchigiani, erano interessati dalla contaminazione di due o tre di queste varianti (vedi Tabella 4). Nel caso di *Microcystis aeruginosa*, le concentrazioni intracellulari di MC più alte sono state rilevate in Umbria, Toscana e Sardegna, come illustrato nella tabella 1, e le varianti predominanti erano MC-LR e MC-YR. Concentrazioni extracellulari di MC-LW e MC-LA sono state rilevate con valori bassi sia nel lago Monteleone in Sardegna che nel Lago di Massacciucoli in Toscana (vedi Tabella 1). Concentrazioni extracellulari di microcistine quali desmetil-MC-RR, MC-RR e MC-YR, dovute alla presenza di *Planktothrix*, sono state rilevate anche negli invasi sardi del Simbizzi e del Flumendosa (Tabella 4).

Il rilevamento delle tossine CYN è legato alla presenza delle specie *Aphanizomenon ovalisporum* e *Cylindrospermopsis raciborskii*, specie piuttosto rare in Italia.

L'ANA-a, prodotta da *Dolichospermum flos-aquae* e *Dol. lemmermanii*, è un potente alcaloide neurotossico. Nel Lago Mulargia in Sardegna si è sviluppato un bloom algale in cui *Dol. flos-aquae* era la specie dominante (vedi Tabella 2) (10).

Da studi internazionali di settore emerge che il contenuto intracellulare delle MC è generalmente più alto della concentrazione delle stesse disciolte nell'ambiente circostante (38, 39). Notevoli quantità di MC, come di altre cianotossine possono tuttavia essere rilasciate a seguito di un decadimento di una fioritura/schiuma o del loro trattamento con algicidi. In genere, questa situazione è circoscritta infatti la concentrazione delle cianotossine disciolte diminuisce rapidamente con i processi di diluizione, adsorbimento ai sedimenti, degradazione, trasporto lungo la catena trofica. Al contrario, tossine di tipo CYN vengono spesso trovate a concentrazioni paragonabili o addirittura più elevate di quelle intracellulari (40). Per quanto riguarda le altre cianotossine non sono disponibili informazioni per quel che riguarda i valori di tossina presente a livello intra ed extracellulare.

In Australia è stato condotto uno studio su *Microcystis aeruginosa* che ha riguardato la misura della quantità di MC-LR prodotta e il calcolo del biovolume. Dai dati raccolti, è stato possibile elaborare, il valore di toxin/quota pari a 0,2 pg per cellula. Pertanto supponendo che le tossine vengano completamente rilasciate in acqua e che si abbia un numero di cellule pari a 6.500 cellule/mL come livello di allerta, si può ottenere un valore teorico di tossicità di 1,3 µg/L, valore questo indicato dalla WHO come riferimento limite nelle acque destinate al consumo umano. Deve quindi essere sottolineato che, al fine di dare indicazioni di valori di toxin/quota per le diverse specie tossiche riportate o descritte in Italia, sono necessari studi completi che riguardino quattro zone geografiche (Nord, Centro, Sud e isole), per un arco temporale almeno di un anno e includendo nel set di dati da misurare anche il numero di cellule di cianobatteri tossici e la tossicità annessa. I dati riportati, fin d'ora, in letteratura sono scarsi e incompleti e non permettono pertanto di elaborare il valore di toxin/quota. Tale parametro potrebbe risultare indispensabile nello screening di valutazione della qualità delle acque ed essere inserito tra i valori indicatori dei livelli di allerta.

Bibliografia

1. Dietrich D, Hoeger S. Guidance values for microcystins in water and cyanobacterial supplement products (blue green algal supplements): a reasonable or misguided approach? *Toxicology and Applied Pharmacology* 2005;203(3):273-89.
2. Gray NF. *Drinking water quality: problems and solutions*. Chichester, London: Wiley; 1996.
3. Keijola S, Himberg K, Esala AL, Sivonen K, Hiis-Virta L. Removal of cyanobacterial toxins in water treatment process: laboratory and pilot-scale experiments. *Toxicity Assessment* 1988;3(5):643-56.
4. Himbeerg K, Keuola AM, HisVirta L, Pyysalo H, Sivonen K. The effect of water treatment process on the removal of hepatotoxins from *Microcystis* and *Oscillatoria* cyanobacteria a laboratory study. *Water Reserch* 1989;23(8):979-84.
5. Donati C, Drikas M, Hayes R. Microcystin-LR adsorption by powered activated carbon. *Water Research* 1994;28(2):1735-42.
6. Hitzfeld BC, Hoger SJ, Dietrich DR. Cyanobacterial toxins: removal during drinking water treatment, and human risk assessment. *Environmental Health Perspectives* 2000;108(Suppl 1):113-22.
7. Rositano J, Nicholson BC, Pieronne P. Destruction of cyanobacterial toxins by ozone. In: *Proceedings of the First Australasian Conference of International Ozone Association*. Sydney (Australia); 1996.
8. Harada K-I, Tsuji K. Persistence and decomposition of hepatotoxic microcystins produced by cyanobacteria in natural environment. *Journal of Toxicology* 1998;17(3):385-403.
9. Bruno M, Gucci PMB, Pierdominici E, Sestili P, Joppolo A, Volterra L. Production of microcystin-like toxins in different freshwater species of *Oscillatoria*. *Toxicon* 1992;32(10):1307-11.
10. Bruno M, Gucci PMB, Pierdominici E, Sestili P, Joppolo A, Volterra L. Anatoxin-a and previously unknown toxin in *Anabaena planctonica* from blooms found in Lake Mulargia (Italy). *Toxicon* 1994;32(3):369-73.
11. Messineo V, Bogialli S, Melchiorre S, Sechi N, Lugliè A, Casiddu P, Mariani MA, Padedda BM, Di Corcia A, Mazza R, Carloni E, Bruno M. Cyanobacterial toxins in Italian freshwaters. *Limnologica* 2009;39(2):95-106.
12. Sechi N, Lugliè A. Limnological studies on man-made lakes in Sardinia (Italy). *Memorie dell'Istituto Italiano di Idrobiologia* 1992;50:365-381.
13. Naselli Flores L, Barone R. Phytoplankton dynamics in two reservoirs with differeny trophic state (Lake Rosamarina and Lake Arancio, Sicily, Italy). *Hydrobiologia* 1998;369/370:163-178.

14. 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*. Roma: Istituto Superiore di Sanità; 16-17 dicembre 1999. (Rapporti ISTISAN 00/30). p. 93-100.
15. Bettinetti R, Morabito G, Provini A. Phytoplankton assemblage structure and dynamics as indicator of the recent trophic and biological evolution of the western basin of Lake Como (N. Italy). *Hydrobiologia* 2000;435(1-3):177-190.
16. Ravera O, Scotto S. A sampler-incubator for studying zooplankton grazing and phytoplankton production. *Journal of Limnology* 1999;58(1):49-57.
17. Salmaso N. Fioriture di cianobatteri nei laghi profondi dell'Italia settentrionale. 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. 30-48.
18. Naselli Flores L, Barone R, Chorus I, Kurmayer R. Toxic cyanobacterial blooms in reservoirs under a semiarid Mediterranean climate: the magnification of a problem. *Environmental Toxicology* 2007;22(4):399-404.
19. Salmaso N. Fattori influenzanti lo sviluppo dei cianobatteri nei laghi profondi. In: Melchiorre S, Viaggiu E, Bruno M. (Ed.). *Le fioriture di alghe tossiche nelle acque dolci*, Workshop, Roma, 17 ottobre 2000: Istituto Superiore di Sanità. (Rapporti ISTISAN 02/09). p. 44-55.
20. Flaim G, Pinamonti V. I cianobatteri nei laghi Trentini. In: Funari E (Ed.). *Aspetti sanitari della problematica dei cianobatteri nelle acque superficiali italiane*. Roma: Istituto Superiore di Sanità; 16-17 dicembre 1999. (Rapporti ISTISAN 00/30). p. 111-6.
21. Garibaldi L, Buzzi F, Morabito G, Salmaso 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.
22. Salmaso N. Factors affecting the seasonality and distribution of cyanobacteria and chlorophytes: a case study from the large lakes south of the Alps, with special reference to Lake Garda. *Hydrobiologia* 2000;438(1-3):43-63.
23. Gallo P, Ferranti P, Fabbrocino S, Serpe L, Bruno M, Cerullo MG. Determination of cylindrospermopsin in freshwater using ion trap, MALDI-TOF and Q-ToF mass spectrometry detectors. *18th International Mass Spectrometry Conference*. Bremen (Germany), 30 Agosto-4 settembre 2009.
24. Bruno M, Gallo P, Ferranti P, Messineo V, Melchiorre S (Ed.). *Contaminazione da tossine algali in fauna ittica italiana: Metodi di rilevazione e analisi*. Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2010. (Rapporti ISTISAN 10/23).
25. Salmaso N, Morabito G, Mosello R, Garibaldi L, Simona M, Buzzi F, Ruggiu D. A synoptic study of phytoplankton in the deep lakes south of the Alps (lakes Garda, Iseo, Como, Lugano and Maggiore). *Journal of Limnology* 2003;62(2):207-227.
26. Manganelli M, Scardala S, Stefanelli M, Vichi S, Mattei D, Bogianni S, Ceccarelli P, Corradetti E, Petrucci I, Gemma S, Testai E, Funari E. Health risk evaluation associated to *Planktothrix rubescens*: An integrated approach to design tailored monitoring programs for human exposure to cyanotoxins. *Water Research* 2010;44(5):1297-306.
27. Garibaldi L, Anzani A, Marieni A, Leoni B, Mosello R. Studies on the phytoplankton of the deep subalpine Lake Iseo. *Journal of Limnology* 2003;62(2):177-89.
28. Margaritora FG, Fumanti B, Alfinito S, Tartari G, Vagaggini D, Seminara M, Cavacini P, Vuillermo E, Rosati M. Trophic condition of the volcanic Lake Nemi (Central Italy): environmental factors and planktonic communities in a changing environment. *Journal of Limnology* 2005;64(5):119-128.

29. 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.
30. Viaggiu E, Calvanella S, Melchiorre S, Bruno M, Albertano P. Toxic blooms of *Planktothrix rubescens* (Cyanobacteria/Phormidiaceae) in three water bodies in Italy. *Archiv für Hydrobiologie, Algological Studies* 2003;109:569-77.
31. Viaggiu E, Russo T, Bianco I, Cortese M, Zaottini E, Albertano P. Modelling fluctuation of the toxic cyanobacterium *Planktothrix rubescens* in the Lake San Puoto (Central Italy) using self-organizing maps. In: Morabito G, Bianchi CN (Ed.). *Atti del XVII Congresso dell'Associazione Italiana di Oceanologia e Limnologia 19*. Napoli, 3-7 luglio 2006. CNR, Pallanza; 2008. p. 499-503.
32. Ferretti E, Lucentini L, Ottaviani M, Bogialli S, Veschetti E, Giovanna R, Ledalsrolo C, Cannarozzi De Grazia M, Ungaro N, Rosaria Petruzzelli R, Tartari G, Guzzella L, Mingazzini M, Copetti D, Abis P, Fiori G, De Leo A. Exceptional blooms of cyanobacterium *Planktothrix rubescens* and microcystin production in an Italian drinking water basin. *The 8th International conference on toxic cyanobacteria (ICTC8)*. Istanbul, 29 agosto- 4 settembre 2010. p. 117.
33. Guzzella L, Ghislanzoni L, Pozzoni F, Cerasino L, Salmaso N. Determinazione di tossine algali (microcistine e nodularine) nelle acque superficiali. *Notiziario dei Metodi Analitici* 2010;1:17-30.
34. Manti G, Mattei D, Messineo V, Melchiorre S, Bogialli S, Sechi N, Casiddu P, Luglié A, Di Brizio M, Bruno M. First report of *Cylindrospermopsis raciborskii* in Italy. *Harmful Algae News* 2005;28:8-9.
35. 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. *Environmental Science & Technology* 2006;40(9):2917-23.
36. Messineo V, Melchiorre S, Di Corcia A, Gallo P, Bruno M. Seasonal succession of *Cylindrospermopsis raciborskii* and *Aphanizomenon ovalisporum* blooms with cylindrospermopsin occurrence in the volcanic lake Albano, Central Italy. *Environmental Toxicology* 2010;25(1):18-27.
37. Van Apeldoorn ME, van Egmond HP, Speijer GJA, Bakker GJI. Toxin of cyanobacteria. *Molecular Nutrition and Food Research* 2007;51(1):7-60.
38. Ibelings BW, Chorus I. Accumulation of cyanobacterial toxins in fresh water "seafood" and its consequences for public health. *Environment Pollution* 2007;150(1):177-192.
39. Rucker 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(6):800-809.

SEZIONE 2
Normativa e valori di riferimento

2.1. NORMATIVA NAZIONALE

Lucia Bonadonna, Paola Bottoni

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

Nell'attuale normativa nazionale ed europea non vengono attualmente indicati valori soglia per definire la qualità delle acque da destinare e destinate al consumo umano per quanto riguarda la densità per volume di cellule algali né valori limite per le tossine da esse derivanti.

Nel 2008, l'Organizzazione Mondiale della Sanità (*World Health Organization*, WHO) ha definito un valore di linea guida provvisorio per l'acqua potabile per la microcistina-LR (MC-LR) (uno dei circa 80 congeneri di microcistina) di 1,0 µg/L totale, da intendersi come tossina disciolta e contenuta all'interno delle cellule algali. Le miscele di congeneri di microcistina sono state considerate come MC-LR equivalenti (1).

Il valore raccomandato dalla WHO per la microcistina (1,0 µg/L totale) rappresenta, ad oggi, un riferimento fondamentale che si applica ai requisiti normativi che prevedono che le acque potabili non debbano contenere sostanze in concentrazioni tali da rappresentare un rischio per la salute umana.

Il valore di linea guida WHO per la microcistina consente di affermare che il consumo giornaliero per l'intero arco di vita di acqua potabile che contiene una concentrazione di 1,0 µg/L di tale sostanza non rappresenta un rischio sanitario apprezzabile.

Per l'anatossina, i dati tossicologici disponibili non sono sufficienti per calcolare una dose giornaliera tollerabile (TDI) per l'acqua potabile da cui estrapolare un valore di linea guida specifico. Tuttavia, in base agli studi disponibili, è stato valutato che il valore guida di 1,0 µg/L possa comunque fornire un margine di sicurezza per il consumo di acqua potabile di circa 3 ordini di grandezza (2).

Per quanto riguarda il monitoraggio, si possono definire i seguenti livelli di intervento, oltre ai normali controlli (2):

- *Livello di vigilanza*: il numero di cellule per mL è compreso tra 500 e 2.000 cellule/mL: si riferisce al momento iniziale in cui viene individuata la fioritura algale; finché non viene superato il livello di 2000 cellule/mL si mantiene il programma di monitoraggio;
- *Livello di azione 1*: il numero di cellule di cianobatteri supera le 2.000 cellule/mL e rimane costante o tende ad aumentare (questo valore deriva dalle indicazioni fornite dalla WHO per la MC-LR per la quale il limite nell'acqua grezza è di 1,0 µg /L).
Se è presente *Microcystis aeruginosa* a concentrazioni superiori a 2.000 cellule/mL oppure sono presenti altre specie che producono tossine a concentrazioni superiori a 15.000 cellule/mL, si attiva la determinazione quantitativa della tossina nell'acqua grezza e si valuta se il trattamento cui l'acqua è sottoposta nell'impianto di potabilizzazione è adeguato.
- *Livello di azione 2*: la concentrazione di cianobatteri supera le 100.000 cellule/mL. Si è in presenza di una ben accertata fioritura algale con la possibilità di formazione di "schiume" sulla superficie del corpo idrico. Le condizioni che definiscono questo livello di azione sono indicative di un incremento significativo del rischio di effetti avversi per la salute derivanti dall'acqua grezza o da quella trattata in un impianto non adeguato così come dall'utilizzo dell'acqua per la balneazione.

A livello internazionale, diversi sono i valori previsti come soglia per i cianobatteri e alcuni esempi sono presentati di seguito.

In Brasile, il controllo delle acque potabili si basa sul monitoraggio dei cianobatteri nelle acque grezze; le analisi delle tossine e i test di tossicità sono previsti al superamento del valore di 10.000 cellule/mL. Per le microcistine, il Brasile ha applicato il valore limite di 1,0 µg/L senza fare distinzioni tra i congeneri.

In Canada è stata stabilita una Concentrazione Massima Ammissibile (CMA) di 1,5 µg/L.

Tra i Paesi europei, né la Germania, né la Finlandia hanno stabilito limiti normativi specifici per le concentrazioni di cianobatteri. In Ungheria, i cianobatteri sono stati inseriti tra i parametri biologici da monitorare, ma non sono stati stabiliti valori soglia per le cianotossine.

In Italia, nell'ambito delle normative del settore acque, i parametri che sono esplicitamente riferibili ai cianobatteri sono di pertinenza del DL.vo 116/2008 relativo alla gestione delle acque di balneazione (3) e del Decreto ministeriale 260/2010 (4), che rappresenta l'ultimo adeguamento della Parte III del DL.vo 152/2006 (Testo Unico, T.U.) specifica per la protezione delle acque superficiali e sotterranee.

Nei successivi paragrafi si analizzano i principali decreti inerenti alla protezione delle acque potabili, delle acque superficiali e a specifica destinazione d'uso, facendo particolare riferimento ai Decreti che implementano o emendano parti significative del T.U., con cenni al Decreto sulle acque di balneazione. Si riportano, inoltre, elementi e concetti che possono contribuire alla individuazione e alla definizione di situazioni critiche legate alla presenza dei cianobatteri e indicazioni utili per l'effettuazione del monitoraggio dei corpi idrici.

2.1.1. Normativa sulle acque potabili

2.1.1.1. Decreto legislativo 31/2001

Il DL.vo 31/2001 (5) non include direttamente i cianobatteri e le cianotossine tra i parametri di tipo microbiologico o chimico da ricercare nelle acque destinate al consumo umano. Tuttavia, nell'Avvertenza dell'Allegato I sono inseriti 9 parametri accessori, tra cui un generale parametro "alghe", che possono essere ricercati a giudizio delle Autorità competenti. Per i gruppi alghe, funghi, nematodi e protozoi non sono specificati taxa o famiglie e non sono definiti valori di parametro. Diversamente, per i microrganismi enterovirus, batteriofagi anti-*E. coli*, enterobatteri patogeni e stafilococchi patogeni è imposto il criterio di costante assenza. Per tutti i parametri accessori sono invece forniti i volumi di riferimento su cui effettuare le ricerche e il corrispettivo per le alghe è riportato nella Tabella a1 allegata al capitolo.

È importante specificare che il Decreto vincola comunque le Autorità sanitarie a considerare i cianobatteri e i loro derivati tossici nei piani di ricerca e controllo delle risorse idropotabili, qualora le condizioni degli approvvigionamenti siano tali da rendere plausibile una loro presenza. Ciò, infatti, rientra nelle disposizioni dell'art. 4, comma 2, lettera a, dove è sancito che le acque destinate al consumo umano "non devono contenere microrganismi e parassiti, né altre sostanze, in quantità o concentrazioni tali da rappresentare un potenziale pericolo per la salute umana". Il concetto di prevenzione di rischi potenziali per la salute è ulteriormente ripreso nell'art. 8, comma 3 dove è specificato che le Autorità sanitarie competenti devono assicurare "una ricerca supplementare, caso per caso, delle sostanze e dei microrganismi per i quali non sono stati fissati valori di parametro a norma dell'Allegato I, qualora vi sia motivo di sospettare la presenza in quantità o concentrazioni tali da rappresentare un potenziale pericolo per la salute umana".

Ciò pertanto si applica sia ai parametri accessori riportati, sia ad altri per microrganismi potenzialmente pericolosi che non sono specificati per taxa o generi, come nel caso

dell'eterogeneo gruppo dei cianobatteri e delle loro tossine. Riguardo ad eventuali parametri da intendere come supporto all'individuazione di situazioni locali critiche per la possibile presenza di cianobatteri, si citano principalmente i parametri Nitrato (come NO_3^-), Ammonio, Conduttività, Concentrazione degli ioni idrogeno (pH) e altri elencati in Tabella al. Anche se i valori di parametro, in qualche caso, sono elevati rispetto a quelli dei fattori limitanti per lo sviluppo di microalghe in genere, il gran numero di dati che provengono dai controlli possono, nell'insieme, essere di una certa utilità.

Occorre inoltre considerare che i valori di parametro specificati dal Decreto sono concepiti per la tutela sanitaria dell'uomo e non sono quindi strettamente adattabili come valori di riferimento per il biota né sono confrontabili con corrispettivi riportati in altre normative del settore acque.

2.1.1.2. Decreto legislativo 152/2006

Il DL.vo 152/2006 (T.U.) (6) riunifica le normative nazionali in materia di acque derivanti dal recepimento della Direttiva Quadro europea 2000/60/CE (7) nella Parte III e negli Allegati I e II che sono pertinenti alla protezione e alla classificazione dei corpi idrici superficiali e sotterranei. Il Decreto definisce il quadro normativo per la protezione delle acque e la salvaguardia degli ecosistemi acquatici rispetto alla contaminazione chimica e l'alterazione antropica in genere, con gli obiettivi di mantenere o di ripristinare il buono stato ecologico. Fino all'ultimo adeguamento, definito dal Decreto ministeriale 260/2010 (4) e che viene discusso di seguito, non vi era un riferimento diretto alla ricerca dei cianobatteri. Tuttavia, a supporto della problematica, era ed è possibile usufruire di elementi qualitativi per la classificazione dello stato ecologico delle acque interne e dei corrispettivi sistemi di classificazione per la definizione degli stati qualitativi di elevato, buono e sufficiente, che possono porre in evidenza eventuali situazioni di rischio. Sono rilevanti, a tal fine, alcuni elementi biologici (fitoplancton), idromorfologici (idrologia, morfologia), chimici e chimico-fisici di supporto agli elementi biologici (condizioni termiche, ossigenazione, salinità, stato dei nutrienti, stato di acidificazione) per fiumi (Allegato IA.1.1), laghi (Allegato IA.1.2) e corpi idrici artificiali (Allegato IA.1.5) che possono indicare situazioni di possibile incremento di biomassa algale. Altre informazioni possono essere dedotte nella sezione riguardante le acque superficiali a specifica destinazione funzionale e in particolare le acque dolci superficiali destinate all'uso potabile (art. 80 e Allegato IIA).

I parametri che possono indirettamente fornire indicazioni di potenziali alterazioni, favorevoli allo sviluppo di cianobatteri, sono individuabili nel Gruppo I dell'Allegato IIA: pH, colore, materiali totali in sospensione, temperatura, conduttività, odore, nitrati, fosfati, ammoniaca. Nella Tabella al (sia A che B) si riportano i valori imperativi e i valori guida disponibili per i sopraddetti parametri. Anche in questo caso, i valori di parametro hanno valenza descrittiva per possibili situazioni di rischio specifiche per i cianobatteri. Di seguito si riportano alcuni richiami di interesse relativi ai determinandi chimici e biologici e ai sistemi di monitoraggio contenuti nei due principali Decreti con cui è stato emendato il T.U.

2.1.1.3. Decreto ministeriale 56/2009

Il Decreto ministeriale 56/2009 (8) ha introdotto importanti modifiche alla Parte Terza del T.U. definendo l'apparato tecnico per la gestione e la conduzione del monitoraggio e la classificazione dei corpi idrici superficiali ai sensi del T.U.

In questo contesto si accennano alcuni punti salienti del Decreto premettendo, tuttavia, che non vi sono indicatori chimico-fisici o biologici direttamente ricollegabili ai cianobatteri. Nell'art. 2 punto 1.1.1 e nell'Allegato I, punti A.1, A.2, sono definite le tipologie dei corpi idrici superficiali sul territorio nazionale e le condizioni idromorfologiche, chimico-fisiche e biologiche di riferimento tipo-specifiche per i corpi idrici superficiali di qualità elevata. Le condizioni di riferimento sono concepite per rappresentare uno stato qualitativo corrispondente a "pressioni molto basse, senza gli effetti dell'industrializzazione di massa, dell'urbanizzazione e dell'agricoltura intensiva" e quindi con impatti molto lievi sui parametri qualitativi considerati. I singoli parametri sono raffigurati come intervalli di valori ai fini della rappresentatività delle variabili ambientali negli ecosistemi acquatici. Il Decreto introduce il nuovo sistema per il calcolo degli indicatori di qualità definito come Rapporto di Qualità Ecologica (RQE). Ogni RQE deriva dal rapporto tra ciascun parametro di riferimento e il corrispondente parametro misurato e può assumere un valore variabile tra 0 e 1. Elementi fondamentali introdotti con il Decreto sono gli Standard di Qualità Ambientale (SQA), espressi come Concentrazione Massima Ammissibile (SQA_CMA) e/o come valore medio annuo (SQA_MA) per una serie di sostanze chimiche, come stabilito dalla Direttiva 2008/105/CE (9). Di pertinenza per le acque superficiali sono gli SQA per sostanze prioritarie, sostanze pericolose prioritarie e altre sostanze pericolose riportate nel paragrafo A.2.6, Tabella 1/A e gli SQA_MA per sostanze o gruppi di sostanze non inclusi tra le sostanze prioritarie ma riportati nell'Allegato 8 del T.U. (Paragrafo A.2.7, Tabella 1/B). Sono inoltre definiti 9 SQA_MA per sostanze da ricercare nelle acque superficiali utilizzate per l'estrazione di acqua potabile nell'ambito del monitoraggio supplementare (Paragrafo A.2.7, Tabella 2/B). Un elenco delle sostanze riportate nelle Tabelle 1/A, 1/B e 2/B è riportato nella Tabella a2 allegata a questo capitolo.

Un accenno sintetico al significato dei sistemi di monitoraggio di sorveglianza e operativo, peraltro già introdotti nel 2006 dal T.U., è descritto in Figura 1. Un particolare interesse riveste il monitoraggio di indagine che consente di effettuare controlli in particolari situazioni "di allarme o a scopo preventivo per la valutazione del rischio sanitario e l'informazione al pubblico" e quindi oltre gli scopi del T.U. finalizzati al controllo dello stato qualitativo dei corpi idrici a rischio di non raggiungimento dello stato qualitativo buono. Il monitoraggio di indagine lascia un margine per la ricerca di elementi qualitativi dovuti a pressioni specifiche o ignote che abbiano un impatto sulla salute umana, come nel caso dei cianobatteri e i loro prodotti tossici.

Nel contesto, si accenna anche al monitoraggio supplementare (Paragrafo A.3.8) che, come sopra riportato, riguarda le acque superficiali utilizzate per l'estrazione di acqua potabile.

Il monitoraggio supplementare è previsto per i corpi idrici che sono individuati secondo l'art. 82 del T.U. e che forniscono in media più di 100 m³/giorno di acqua, si effettua secondo le modalità definite per il monitoraggio di sorveglianza e quello operativo ma è rivolto a soddisfare i requisiti previsti dal DL.vo 31/2001 (5).

Nel monitoraggio supplementare devono essere ricercate le sostanze prioritarie della Tabella 1/A scaricate e/o immesse e/o rilasciate nei corpi idrici e le sostanze elencate in Tabella 1/B del Decreto (sostanze singole o appartenenti alle famiglie di cui all'Allegato 8 del T.U.) (Tabella a2, allegata al capitolo) nei casi in cui siano scaricate e/o immesse e/o rilasciate in quantità significativa da incidere negativamente sullo stato del corpo idrico. Si applica inoltre alle sostanze incluse nella sopra citata Tabella 2/B (Tabella a2, allegata al capitolo) ai fini di soddisfare i requisiti previsti dal DL.vo 31/2001 (5).

Una sintesi delle finalità per il monitoraggio supplementare è illustrata nella Figura 1. È importante notare che, per le acque superficiali utilizzate per l'estrazione di acqua potabile, vigono gli standard del DL.vo 31/2001 quando sono più restrittivi dei corrispondenti SQA dei parametri tabellari.

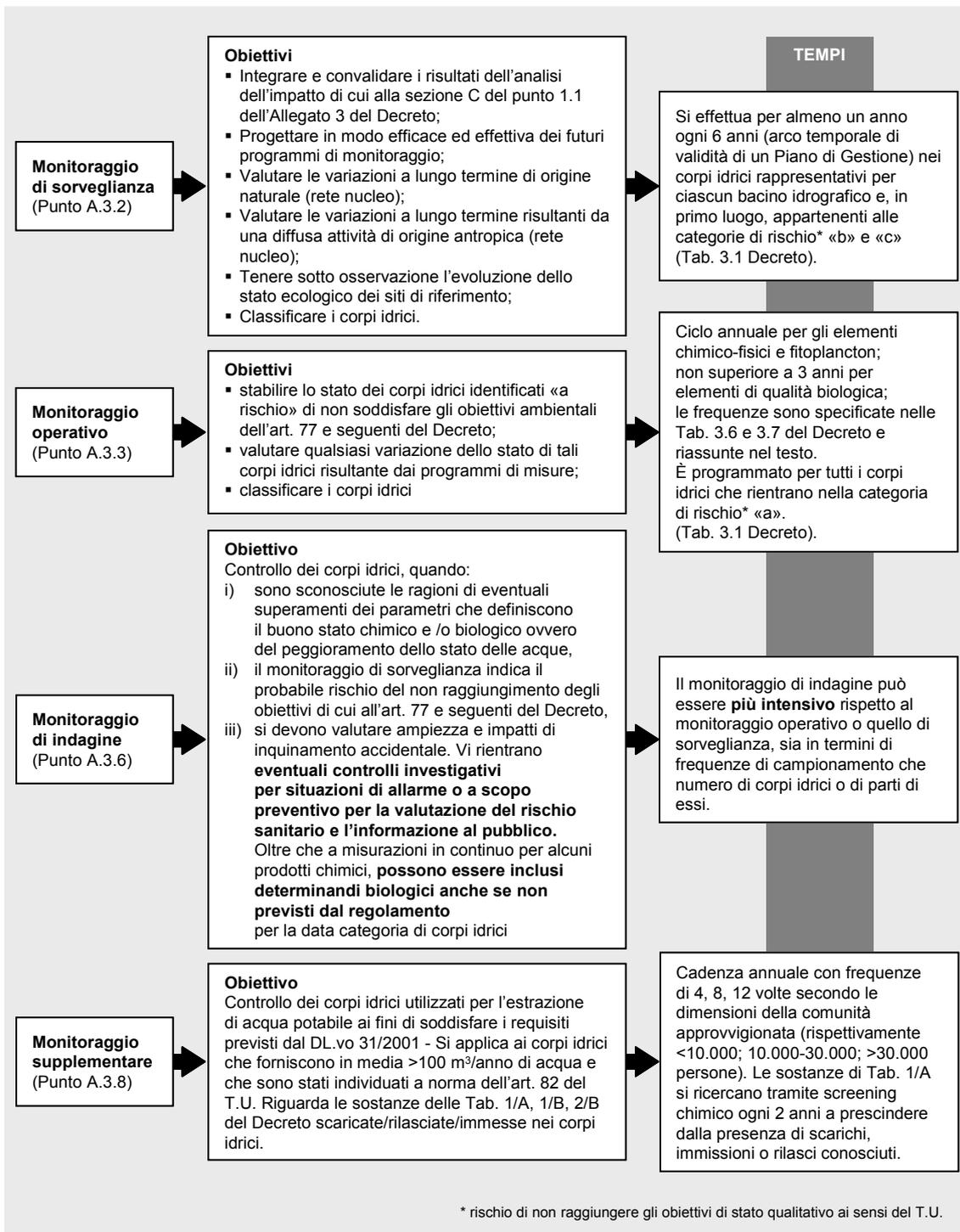


Figura 1. Sintesi delle diverse tipologie di monitoraggio per le acque interne come definiti dai Decreti ministeriali 56/2009 e 260/2010 che emendano il T.U.

2.1.1.4. Decreto ministeriale 260/2010

Il Decreto ministeriale 260/2010 (4) costituisce l'ultimo adeguamento del DL.vo 152/2006 e introduce i criteri tecnici di classificazione dello stato ecologico per le varie categorie di corpi idrici (fiumi, laghi, acque marino-costiere e di transizione) modificando l'Allegato I, Parte III del T.U. Il Decreto recepisce, tra l'altro, la Decisione della Commissione 2008/915/CE (10) che fissa valori, parametri e metodi da considerare per la classificazione di tutte le tipologie di acque al livello europeo e che sono stati studiati, sperimentati e validati nel corso dell'attività quinquennale di intercalibrazione condotta da oltre un migliaio di esperti degli Stati membri.

Il Decreto acquisisce i dati prodotti dagli Enti tecnici e di ricerca italiani¹, adattando i metodi di classificazione alla realtà del nostro Paese. La classificazione dello stato ecologico (elevato, buono, sufficiente, scarso) consiste di articolate metodologie di calcolo per i diversi parametri biologici specifici per le diverse aree geografiche e i relativi macrotipi e i tipi in cui sono suddivisi i corpi idrici.

L'impiego del parametro cianobatteri costituisce un valido supporto alla reale valutazione del rischio di non rientrare negli obiettivi di qualità ecologica dei corpi idrici ma soprattutto spinge a valutare anche l'aspetto sanitario ricollegabile alla loro presenza.

Il Decreto quindi, pur non introducendo valori limite come la densità di cellule per volume o standard qualitativi per i prodotti tossici, evidenzia la consolidata consapevolezza della rilevanza ambientale e sanitaria di tali microorganismi e apre la strada per l'implementazione legislativa relativa a questi elementi.

2.1.2. Normativa sulle acque di balneazione

2.1.2.1. Decreto legislativo 116/2008

In attuazione della Direttiva 2006/7/CE (11) relativa alla gestione della qualità delle acque di balneazione, è stato elaborato il DL.vo 30 maggio 2008, n. 116 (3). All'art. 12, in riferimento alle procedure di monitoraggio, viene stabilito che, qualora sia individuata, nell'area interessata alla balneazione, una tendenza alla proliferazione di macroalghe o di fitoplancton marino, le regioni e le province autonome devono provvedere allo svolgimento di indagini sui rischi per la salute e per la determinazione del livello di accettabilità. Individuati questi, devono adottare misure di gestione commisurate al problema. I criteri per determinare il divieto di balneazione, nonché le modalità e le specifiche tecniche per l'attuazione del DL.vo 116/2008 sono definiti nel Decreto 30 marzo 2010 (12) che stabilisce anche, secondo quanto previsto dall'allegato B e s.m.i., le procedure per lo svolgimento di un monitoraggio che permetta l'individuazione dei rischi per la salute associati alla presenza di cianobatteri, oltre che una serie di criteri su *Ostreopsis ovata*, un dinoflagellato bentonico epifitico. Per la sorveglianza delle fioriture di cianobatteri, l'Allegato B (previsto dall'art. 3) del Decreto 30 marzo 2010 raccomanda l'applicazione di un albero decisionale secondo le indicazioni della WHO (2), considerando la necessità di effettuare l'individuazione dei corpi idrici interessati dal problema. A questo scopo,

¹ Istituto Superiore per la Protezione e la Ricerca Ambientale (ISPRA), Istituto di Ricerca sulle Acque del Consiglio Nazionale delle Ricerche (CNR-IRSA), Istituto per lo Studio degli Ecosistemi del Consiglio Nazionale delle Ricerche (CNR-ISE), Istituto Superiore di Sanità (ISS), Agenzia nazionale per le Nuove tecnologie, l'Energia e lo Sviluppo economico sostenibile (ENEA), ARPA Lombardia, Ispettorato Generale del Corpo Forestale dello Stato (CFS).

l'indagine deve prevedere una valutazione dei dati storici, un'analisi dei nutrienti per definire la capacità del corpo idrico di sostenere le fioriture, un'ispezione visiva per osservare eventuali presenze/accumuli di cianobatteri e la valutazione della trasparenza come carattere di torbidità dell'acqua.

La trattazione di maggiori specifiche riguardo a questo argomento esula dal contesto generale e pertanto, qualora di interesse, si rimanda ai riferimenti normativi di pertinenza.

2.1.3. Frequenze di monitoraggio

In merito alla determinazione dei cianobatteri e delle cianotossine, si ritiene utile riportare, in particolare, le tempistiche per i campionamenti previste dal T.U. e dai suoi emendamenti (4, 6, 8) che possono riguardare, direttamente o indirettamente, questi elementi. In questo contesto si prendono in considerazione le modalità temporali di campionamento per i monitoraggi operativo e di sorveglianza, in particolare nei laghi, per i quali è stabilita la ricerca di fitoplancton e di parametri chimici e chimico-fisici (Tabella 3.6 del Decreto ministeriale 260/2010) (4). Per il monitoraggio di sorveglianza e il monitoraggio operativo è stabilito un ciclo annuale di campionamenti con frequenze di 6 volte per il fitoplancton e con cadenza bimestrale per i parametri chimico-fisici. I prelievi per i parametri chimico-fisici devono comunque essere effettuati in coincidenza con i prelievi di fitoplancton. Per le sostanze prioritarie della Tabella 1/A (Tabella a2 allegata al capitolo), il campionamento si effettua con cadenza mensile: tali sostanze devono essere ricercate se sono scaricate e/o rilasciate e/o immesse e/o già rilevate nel bacino idrografico o nel sottobacino nel caso del monitoraggio di sorveglianza, e nel corpo idrico nel caso del monitoraggio operativo. Per le sostanze non appartenenti all'elenco di priorità riportate nella Tabella 1/B (Tabella a2 allegata al capitolo), il campionamento si effettua con cadenza trimestrale: le sostanze devono essere ricercate se sono scaricate e/o rilasciate e/o immesse e/o già rilevate in quantità significativa nel bacino idrografico o nel sottobacino durante il monitoraggio di sorveglianza e nel corpo idrico durante il monitoraggio operativo. Si richiama l'attenzione sul fatto che il T.U. prevede l'effettuazione di monitoraggi operativi e/o di sorveglianza più intensivi, sia come frequenze che come siti di campionamento, nel caso di elementi chimici o biologici che mostrano grande variabilità naturale o causata da pressioni antropiche. Frequenze più ravvicinate sono anche previste per il monitoraggio di indagine mentre quelle individuate per il monitoraggio supplementare sono analoghe a quanto riportato nel DL.vo 31/2001 (5). Un'estrema sintesi delle tempistiche dei monitoraggi citati del T.U. è riportata nella già citata Figura 1.

2.1.4. Conclusioni

La complessa indagine delle normative inerenti alla protezione sanitaria ed ecologica delle acque, qualunque sia la destinazione e l'impiego, indica il grande cambiamento in atto nel mondo scientifico istituzionale e la continua evoluzione negli approcci allo studio, al controllo, alla gestione e alla regolamentazione degli ecosistemi acquatici e terrestri. L'enorme attività effettuata, ad esempio, nei circuiti di intercalibrazione per le acque superficiali dovrebbe far convergere l'attenzione della comunità nazionale e in particolare le nuove generazioni di studiosi, di tecnici, di docenti, a considerare l'ambiente acquatico come un mondo multiforme con interconnessioni ed equilibri spesso poco noti, se non addirittura ignorati. Per quanto ancora disomogenei e, spesso, poco armonizzati, i Decreti sulle acque obbligano a rispettare e quindi a

gestire parametri anche innovativi e non soltanto di natura chimica, infatti una grande rilevanza è attribuita alle componenti biologiche e microbiologiche degli ecosistemi acquatici. Nel merito della problematica dei cianobatteri si auspica che prossimi provvedimenti, sia a livello nazionale che comunitario, entrino nel merito di predisporre indicatori specifici e/o di categoria sia per la componente biotica che per la componente chimica relativa ai cianobatteri, così come è stato intrapreso per le acque di balneazione, sulla base di quanto stabilito da Organismi internazionali e dalla comunità scientifica in tutto il mondo. In particolare, la mancanza di un indicatore chimico per le tossine emesse dai cianobatteri tra le sostanze prioritarie, rende auspicabile un prossimo aggiornamento, in tal senso, della lista delle sostanze prioritarie a livello europeo, come è previsto dalla Direttiva 2008/105/CE (9), con la conseguente formulazione di idonei SQA e con le debite ricadute sulla Direttiva 2000/60/CE e sui recepimenti nazionali. Un grande passo avanti è stato tuttavia effettuato acquisendo, da parte del legislatore, la consapevolezza che i cianobatteri, pur naturalmente presenti nei corpi idrici, possono portare alla compromissione e quindi al declassamento di importanti risorse idriche con gravi ripercussioni sulla salute dell'uomo e degli organismi acquatici e sulla fruibilità delle acque potabili di origine superficiale.

Bibliografia

1. World Health Organization. Chemical fact sheets. Chapter 12. In: *Guidelines for Drinking-water Quality. Third Edition. Incorporating the First and Second Addenda. Volume 1. Recommendations. 3rd ed.* Geneva: WHO; 2008. p. 407-8. Disponibile all'indirizzo: http://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/GDW12rev1and2.pdf; ultima consultazione 17/1/12.
2. Chorus I, Bartram J (Ed.). *Toxic cyanobacteria in water: a guide to their public health consequences, monitoring and management.* London: E & FN Spon; 1999.
3. Italia. Decreto legislativo 30 maggio 2008, n. 116. Attuazione della Direttiva 2006/7/CE relativa alla gestione della qualità delle acque di balneazione e abrogazione della direttiva 76/160/CEE. *Gazzetta Ufficiale - S.O.* n. 155, del 4 luglio 2008.
4. Ministero dell'Ambiente e della Tutela del Territorio e del Mare. Decreto 8 novembre 2010 n. 260. Regolamento recante i criteri tecnici per la classificazione dello stato dei corpi idrici superficiali, per la modifica delle norme tecniche del Decreto legislativo 3 aprile 2006, n. 152, recante norme in materia ambientale, predisposto ai sensi dell'articolo 75, comma 3, del medesimo Decreto legislativo. *Gazzetta Ufficiale - S.O.* n. 31, 7 febbraio 2011.
5. Italia. Decreto legislativo n. 31 del 2 febbraio 2001. Attuazione della direttiva 98/83/CE relativa alla qualità delle acque destinate al consumo umano. *Gazzetta Ufficiale* n. 52, 3 marzo 2001.
6. Italia. Decreto legislativo n. 152 del 3 aprile 2006. Norme in materia ambientale. *Gazzetta Ufficiale - S.O. e s.m.i.* n. 88, 14 aprile 2006.
7. Europa. Direttiva 2000/60/CE del Parlamento Europeo e del Consiglio del 23 ottobre 2000 che istituisce un quadro per l'azione comunitaria in materia di acque. *Gazzetta Ufficiale delle Comunità Europee* L 327/1, 22 dicembre 2000.
8. Ministero dell'Ambiente e della Tutela del Territorio e del Mare. Decreto 14 aprile 2009, n. 56. Regolamento recante "Criteri tecnici per il monitoraggio dei corpi idrici e l'identificazione delle condizioni di riferimento per la modifica delle norme tecniche del Decreto legislativo 3 aprile 2006, n.152, recante Norme in materia ambientale, predisposto ai sensi dell'articolo 75, comma 3, del Decreto legislativo medesimo. *Gazzetta Ufficiale S.O.* n. 24, 30 maggio 2009.
9. Europa. Direttiva 2008/105/CE, relativa a standard di qualità ambientale nel settore della politica delle acque, recante modifica e successiva abrogazione delle Direttive del Consiglio 82/176/CEE,

- 83/513/CEE, 84/156/CEE, 84/491/CEE e 86/280/CEE, nonché modifica della Direttiva 2000/60/CE del Parlamento europeo del Consiglio. *Gazzetta Ufficiale dell'Unione Europea* L348/8424, dicembre 2008.
10. Europa. Decisione della Commissione del 30 ottobre 2008 che istituisce, a norma della direttiva 2000/60/CE del Parlamento europeo e del Consiglio, i valori delle classificazioni dei sistemi di monitoraggio degli Stati membri risultanti dall'esercizio di intercalibrazione. *Gazzetta Ufficiale dell'Unione Europea* L332/20, 10 dicembre 2008.
 11. Europa. Direttiva 2006/7/CE del Parlamento europeo e del Consiglio 15 febbraio 2006, relativa alla gestione della qualità delle acque di balneazione e che abroga la direttiva 76/160/CEE. *Gazzetta Ufficiale dell'Unione Europea* L64/37, 4 marzo 2006.
 12. Ministero della Salute. Decreto 30 marzo 2010. Definizione dei criteri per determinare il divieto di balneazione, nonché modalità e specifiche tecniche per l'attuazione del Decreto legislativo 30 maggio 2008, n. 116, di recepimento della direttiva 2006/7/CE, relativa alla gestione della qualità delle acque di balneazione. *Gazzetta Ufficiale - S.O.* n. 119, 24 maggio 2010.

Allegato

Tabella a1.A. DL.vo 31/2001: parametri chimici, chimico-fisici e biologici per il monitoraggio delle acque destinate o da destinarsi al consumo umano potenzialmente rilevanti in riferimento alla presenza di cianobatteri

DL.vo 31/2001				
Parametro	Valore di parametro	Note del Decreto	Controlli ai sensi del Decreto	Osservazioni
Nitrato (come NO ₃) ¹	50 mg/L	Nota 5	di verifica	Possibile indicatore dello stato trofico del corpo idrico. Fattore limitante per l'accrescimento della biomassa di fitoplancton e cianobatteri.
Ammonio ²	0,5 mg/L		di routine	
Conduttività ²	2500 µS/cm a 20°C	Nota 1	di routine	Variazioni repentine nelle concentrazioni di sostanze disciolte – sistemi di determinazione rapida e a basso costo
Concentrazione ioni idrogeno (pH) ³	6,5 ≥ pH ≤ 9,5	Nota 1 Nota 3	di routine	L'intervallo ottimale di pH per lo sviluppo di cianobatteri è di 6-9 (Rapporto WHO/SDE/WSH/03.04/57 del 2003)
Sapore ³	accettabile per i consumatori e senza variazioni anomale		di routine	Variazioni organolettiche percepibili
Colore ³	accettabile per i consumatori e senza variazioni anomale		di routine	Variazioni organolettiche percepibili – sistemi di determinazione rapida e a basso costo
Odore ³	accettabile per i consumatori e senza variazioni anomale		di routine	Variazioni organolettiche percepibili – sistemi di determinazione rapida e a basso costo
TOC ³	senza variazioni anomale	Nota 6	di verifica	Variazioni organolettiche percepibili – sistemi di determinazione rapida e a basso costo
Torbidità ³		Nota 7	di routine	Variazioni organolettiche percepibili – sistemi di determinazione rapida e a basso costo
Alghe ⁴		Volume di riferimento: 1 L	vedi art. 8, comma 3 del Decreto	Possibile indicatore dello stato trofico del corpo idrico e dello stato della comunità fitoplanctonica
<p>NOTE DEL DECRETO</p> <p>Nota 1: L'acqua non deve essere aggressiva*</p> <p>Nota 3: Per le acque non frizzanti confezionate in bottiglie o contenitori il valore minimo può essere ridotto a 4,5 unità di pH. Per le acque confezionate in bottiglie o contenitori, naturalmente ricche di anidride carbonica o arricchite artificialmente, il valore minimo può essere inferiore.</p> <p>Nota 5: (in riferimento al parametro Nitriti): Deve essere soddisfatta la condizione: $\{[(\text{nitrato}/50)] + [\text{nitrato}/0,5(0,1)]\} \leq 1$, ove le parentesi quadre esprimono la concentrazione in mg/L per nitrato (NO₃) e per il nitrito (NO₂), e il valore di 0,10 mg/L per i nitriti sia rispettato nelle acque provenienti da impianti di trattamento.</p> <p>Nota 6: Non è necessario misurare questo parametro per approvvigionamenti d'acqua inferiori a 10.000 m³ al giorno.</p> <p>Nota 7: In caso di trattamento delle acque superficiali, si applica il valore di parametro: ≤ a 1,0 NTU (unità nefelometriche di torbidità) nelle acque provenienti da impianti di trattamento.</p> <p>* Il termine "aggressiva" riferito all'acqua indica la possibilità che questa determini la solubilizzazione di sali inorganici generalmente insolubili, come ad esempio il carbonato di calcio e di magnesio, contenuti nel terreno e nelle rocce, e la corrosione di tubazioni, materiali edili, ecc. Tale fenomeno dipende dal contenuto di anidride carbonica (CO₂) e di acido carbonico (H₂CO₃), dalla temperatura e dal pH.</p>				

¹ Allegato I, Parte B ; ² Allegato II Tabella A; ³ Allegato I, Parte C; ⁴ Allegato I, Parte C (Avvertenza).

Tabella a1.B. DL.vo 152/2006: parametri chimici, chimico-fisici e biologici per il monitoraggio delle acque destinate o da destinarsi al consumo umano potenzialmente rilevanti in riferimento alla presenza di cianobatteri (Allegato 2A)

DL.vo 152/2006			
Parametro	Valore di parametro*	Note del Decreto	Osservazioni
pH	Valore guida: A1 → 6,5-8,5 A2 → 5,5-9 A3 → 5,5-9	Sono possibili deroghe in conformità al presente Decreto	Sistemi di determinazione rapida e a basso costo
Colore (dopo filtrazione semplice)	Valore imperativo: (mg/L scala pt) A1 → 20 A2 → 100 A3 → 200		Sistemi di determinazione rapida e a basso costo
Totale materiali in sospensione	Valore guida: (mg/L MES) A1 → 25 A2 → - A3 → -		Sistemi di determinazione rapida e a basso costo
Temperatura	Valore imperativo A1 → 25 A2 → 25 A3 → 25	Sono possibili deroghe in conformità al presente Decreto	Sistemi di determinazione rapida e a basso costo
Conduttività	Valore guida (mS/cm a 20°C) A1 → 1000 A2 → 1000 A3 → 1000		Sistemi di determinazione rapida e a basso costo
Odore	Valore guida (fattore di diluizione a 25°C) A1 → 3 A2 → 10 A3 → 20		Sistemi di determinazione rapida e a basso costo
Nitrati	Valore imperativo (mg/L) A1 → 50 A2 → 50 A3 → 50	Sono possibili deroghe in conformità al presente Decreto	Possibile indicatore dello stato trofico del corpo idrico. Fattore limitante per l'accrescimento della biomassa di fitoplancton e cianobatteri
Fosfati	Valore guida (mg/L P ₂ O ₅) A1 → 0,4 A2 → 0,7 A3 → 0,7	Tale parametro è inserito per soddisfare le esigenze ecologiche di taluni ambienti Sono possibili deroghe in conformità al presente Decreto	Possibile indicatore dello stato trofico del corpo idrico. Fattore limitante per l'accrescimento della biomassa di fitoplancton e cianobatteri
Ammoniaca	Valore imperativo (mg/L NH ₄ ⁺) A1 → - A2 → 1,5 A3 → 4	(nota riferita alla categoria A3) Sono possibili deroghe in conformità al presente Decreto	

* DL.vo 152/2006, art. 80 Categorie delle acque superficiali destinate alla produzione di acqua potabile:

A1: trattamento fisico semplice e disinfezione;

A2: trattamento fisico e chimico normale e disinfezione;

A3: trattamento fisico e chimico spinto, affinazione e disinfezione.

Tabella a2. DL.vo 152/2006 e s.m.i.: sostanze chimiche di pertinenza del monitoraggio di sorveglianza, operativo, di indagine e supplementare per le acque superficiali (4, 6, 8)

Sostanze della lista di priorità (Tabella 1/A, paragrafo A.2.6)		
alaclor	difeniletere bromato (<i>sommatoria congeneri 28, 47, 99, 100, 153, 154</i>)	nichel e composti
cloroalcani C ₁₀ -C ₁₃		4-nonilfenolo
antiparassitari ciclodienici:	diuron	ottilfenolo (4-(1,1',3,3'-tetrametil butil fenolo)
- aldrin	endosulfan	pentaclorobenzene
- dieldrin	esaclorobenzene	pentaclorofenolo
- endrin	esaclorobutadiene	piombo e composti
- isodrin	esaclorocicloesano	simazina
antracene	fluorantrene	tetracloruro di carbonio
atrazina	idrocarburi policiclici aromatici	tetracloroetilene
cadmio e composti	benzo(a)pirene	tricloroetilene
clorfenvinfos	benzo(b)fluorantene	tributilstagno composti (tributilstagno catione)
clorpirifos – clorpirifos etile	benzo(k)fluorantene	triclorobenzeni
DDT totale	benzo(g,k,i)perilene	triclorometano
p,p'-DDT	indeno(1,2,3-cd)pirene	trifluralin
1,2-dicloroetano	isoproturon	
diclorometano	mercurio e composti	
di(2-etilesilftalato)		
Sostanze non incluse nell'elenco prioritario ma appartenenti ad alcune famiglie incluse nell'Allegato 8 del T.U. (Tabella 1/B, paragrafo A.2.6)		
arsenico	1-cloro-3-nitrobenzene	metamidofos
azinfos metile	1-cloro-4-nitrobenzene	mevinfos
azinfos etile	cloronitrotolueni	ometoato
bentazone	2-clorotoluene	paration etile
2-cloroanilina	3-clorotoluene	paration metile
3-cloroanilina	4-clorotoluene	2,4,5-T
4-cloroanilina	croto totale	toluene
3,4-dicloroanilina	2,4-D	1,1,1-tricloroetano
clorobenzene	demeton	2,4,5-triclorofenolo
1,2-diclorobenzene	diclorvos	2,4,6-triclorofenolo
1,3-diclorobenzene	eptaclor	terbutilazina e metabolita
1,4-diclorobenzene	fenitrothion	composti trifenilstagno
2-clorofenolo	fention	xileni
3-clorofenolo	linuron	pesticidi singoli
4-clorofenolo	malation	pesticidi totali
2,4-diclorofenolo	MCPA	
1-cloro-2-nitrobenzene	mecoprop	
Sostanze da ricercare nelle acque superficiali destinate all'estrazione di acqua potabile ai fini di soddisfare i requisiti previsti dal DL.vo 31/2001 (Tabella 2/B, paragrafo A.2.6 del Decreto ministeriale 56/2009)		
antimonio	fluoruri	selenio
boro	nitrate (NO ₃ ⁻)	cloruro di vinile
cianuro	nitrito (NO ₂ ⁻)	vanadio

2.2. VALORI DI RIFERIMENTO INTERNAZIONALI

Emanuele Ferretti, Lucia Bonadonna

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

Alcuni Paesi hanno da qualche tempo sviluppato regolamenti o linee guida per le cianotossine e i cianobatteri nelle acque potabili. I vari approcci e il grado di adozione delle singole linee guida sono stati riassunti in un documento della *Federal Environment Agency* di Berlino (1).

A livello internazionale i vari Paesi hanno focalizzato la propria attenzione sulle microcistine prodotte da *Microcystis aeruginosa* e *Planktothrix agardhii* adottando in molti casi i valori guida per l'acqua potabile. Questo perché le microcistine (MC) sono ampiamente considerate come la più importante causa di possibili danni per la salute umana da cianobatteri su scala mondiale. Molte linee guida hanno preso come riferimento il valore guida provvisorio di 1,0 µg/L per la microcistina-LR (MC-LR) in acqua potabile fissato nel 1998 dalla WHO (2). Tale valore è da considerarsi provvisorio a causa dei pochi studi tossicologici condotti sulle MC e si riferisce alla sola MC-LR. Un elenco completo dei valori guida adottati nei diversi Paesi per le cianotossine nell'acqua potabile è riportato nella Tabella 1.

Tabella 1. Valori guida adottati in diversi Paesi per le cianotossine nell'acqua potabile

Valore guida	Note
Australia	
MC totali (espresse come tossicità equivalente di MC-LR)	1,3 µg/L Valori riportati nelle <i>Linee guida australiane per l'acqua potabile</i>
Brasile	
MC	1,0 µg/L
Saxitossina (equivalente)	3,0 µg/L
Cilindrospermopsina	15 µg/L
I livelli di MC, saxitossine e cilindrospermopsina sono previsti nelle linee guida insieme a programmi di monitoraggio della biomassa. I valori guida per le MC sono stati resi obbligatori. I valori guida espressi come equivalenti di saxitossina e cilindrospermopsina sono raccomandati. L'uso di alghe è proibito; test di tossicità e analisi delle tossine quando la conta delle cellule supera 10.000 cellule/mL o 1 mm ³ di biovolume.	
Canada	
Tossine cianobatteriche (espresse come MC-LR)	1,5 µg/L I valori guida sono usati come il riferimento per la qualità dell'acqua ed espressi con l'unità di concentrazione massima ammissibile (CMA). I CMA derivano dalla dose giornaliera tollerabile (TDI), che a sua volta deriva dal calcolo del livello cui non sono osservati effetti avversi (NOAEL) in base a dati provenienti da studi sull'uomo o sugli animali. Per ricavare un CMA da un TDI, si deve tenere conto del peso corporeo medio e del consumo di acqua potabile, insieme ad altre considerazioni. In termini di salute le linee guida assicurano che i CMA siano inferiori ai livelli di esposizione dove sono stati osservati effetti negativi. Il valore guida è considerato conservativo della salute umana contro l'esposizione alle altre MC (MC totali) che potrebbero essere presenti.
Cina	
MC-LR	1,0 µg/L Valore guida provvisorio della WHO* per la MC-LR

segue

continua

Valore guida		Note
Corea		
MC-LR	1,0 µg/L	Valore guida provvisorio della WHO* per la MC-LR. Sistema di allerta algale basato sulla conta delle cellule e sulla clorofilla-a.
Francia		
MC-LR	1,0 µg/L	Valore riportato nel decreto nazionale sull'acqua potabile.
Giappone		
MC-LR	1,0 µg/L	Valore guida provvisorio della WHO* per la MC-LR.
Norvegia		
MC-LR	1,0 µg/L	È stato adottato il valore guida provvisorio della WHO* per l'acqua potabile.
Nuova Zelanda		
Cianobatteri: <1 cianobatterio potenzialmente tossico presente in 10 mL di campione.		I valori massimi accettabili (VMA) si riferiscono a microrganismi o sostanze organiche con ricadute per la salute. I valori massimi accettabili provvisori (VMAP) si riferiscono alle tossine da cianobatteri. I VMA si basano sulle linee guida della WHO*. Indicano la concentrazione di un analita, che non comporti nessun rischio significativo per il consumatore di acqua per l'intera durata della vita. Il metodo di derivazione varia secondo le condizioni neozelandesi e il modo in cui l'analita presenta un rischio. Sono tuttavia calcolati con l'uso di un TDI. I VMA sono considerati come Standard in Nuova Zelanda. Gli standard rappresentano i criteri di conformità e sono regolarmente monitorati.
VMAP per tossine da cianobatteri:		
Anatossina (come SNTX-eg)	3,0 µg/L	
Anatossina-a (S)	1,0 µg/L	
Cilindrospermopsina	3,0 µg/L	
Endotossine LPS	3,0 µg/L	
MC	1,0 µg/L	
Nodularina	1,0 µg/L	
Saxitossina	1,0 µg/L	
Polonia		
MC-LR	1,0 µg/L	Valore guida riportato nella legislazione nazionale in vigore per l'acqua potabile.
Repubblica Ceca		
MC-LR	1,0 µg/L	Valore indicato nella legislazione nazionale, in conformità al valore guida provvisorio della WHO*.
Spagna		
MC-LR	1,0 µg/L	Massima Concentrazione Ammessa nell'acqua potabile prevista nella legislazione nazionale.
Sud Africa		
MC-LR	0-0,8 µg/L	Valori per le MC nell'acqua potabile indicati nelle linee guida come "Target Water Quality Range".
USA		
Attualmente non ci sono valori guida		Il più alto livello di contaminazione permesso nell'acqua potabile è indicato come <i>Maximum Contaminants Levels (MCL)</i> . Si tratta di livelli applicabili. I cianobatteri e le loro tossine sono elencati come contaminanti microbiologici nella lista dei contaminanti candidati (LCC). Questo significa che ad oggi sono riconosciuti come contaminanti non regolamentati, anche se è nota la presenza nei sistemi di acque pubbliche e potrebbero richiedere una regolamentazione nell'ambito del "Safe Drinking Water Act". I contaminanti inseriti nella LCC sono una priorità per l'agenzia di protezione ambientale degli Stati Uniti, con l'obiettivo di impostare gli MCL.

* Il documento di riferimento è *Guidelines for drinking-water quality* della WHO (1996)

Bibliografia

1. Chorus I. *Current approaches to cyanotoxin risk assessment, risk management and regulations in different countries*. Berlin: Federal Environment Agency (Umweltbundesamt); 2005.
2. World Health Organization. *Guidelines for drinking-water. quality second edition. Addendum to Volume 2: Health criteria and other supporting information*. Geneva: WHO; 1998.

2.3. VALORI DI RIFERIMENTO NAZIONALI

Laura Achene, Massimo Ottaviani, Luca Lucentini

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

2.3.1. Base decisionale

Nelle sezioni precedenti sono stati richiamati gli elementi di valutazione del rischio relativi alle diverse cianotossine e, con particolare riguardo all'esposizione alle tossine attraverso l'acqua potabile, sono stati riportati i valori di riferimento per le cianotossine nelle acque destinate al consumo umano adottati in diversi Paesi.

Attualmente in Italia, così come a livello europeo, non esistono limiti di sicurezza o valori guida per il controllo del rischio di proliferazione di cianobatteri in acque destinate al consumo umano.

Il DL.vo 31/2001 e s.m.i. stabilisce i parametri di qualità per le acque destinate al consumo umano in recepimento della Direttiva 98/83/CE. La definizione dei parametri e dei valori parametrici nella direttiva, così come il recepimento nazionale di questi, è basato sulle conoscenze scientifiche disponibili tenendo conto del principio di precauzione al fine di garantire che le acque possano essere consumate in condizioni di sicurezza nell'intero arco della vita. I valori parametrici individuati sono in genere fondati sugli orientamenti stabiliti dalla *World Health Organization* (WHO) (1).

La ricerca nelle acque destinate al consumo umano di sostanze non espressamente indicate nell'allegato I del DL.vo 31/2001 – come nel caso delle cianotossine – viene effettuata in conformità a quanto previsto in art. 4 comma 2, lettera a) e in art. 8 comma 3 del Decreto, integrato con quanto disposto in Allegato 1 che indica la ricerca delle alghe come parametro accessorio da disporsi a giudizio dell'autorità sanitaria competente.

La valutazione del rischio relativamente a parametri non espressamente inclusi nel DL.vo 31/2001 deve necessariamente basarsi sulle conoscenze scientifiche disponibili tenendo in fondamentale considerazione le indicazioni emanate dalla WHO. È importante sottolineare che, nell'approccio della WHO, i criteri che presiedono alla definizione di un valore guida per un dato fattore di rischio sono: la provata occorrenza della sostanza nell'acqua potabile, l'esistenza di un interesse sanitario a livello internazionale, la sussistenza di informazioni tossicologiche a supporto della definizione del valore guida.

Ai fini della definizione dei valori guida le cianotossine non sono state oggetto di valutazione nelle prime edizioni dei documenti della WHO *International standards for drinking-water* nel 1958, 1963 e 1971 e nella prima e seconda edizione delle linee guida sulle acque potabili pubblicate rispettivamente nel 1984 e 1993. In un addendum alla seconda edizione, pubblicato nel 1998 sulla base dei dati disponibili (*Tolerable Daily Intake*, TDI di 0,04 µg/kg pc/giorno), è stato fissato un valore guida di 1,0 µg/L per la microcistina-LR (MC-LR), il composto ritenuto più diffuso e più tossico. Il valore è provvisorio in quanto è definito su una limitata base di dati e riguarda solo il congenere MC-LR (cfr. sez 1.3) ed è indicato comunque anche nella più recente edizione delle linee guida WHO sulle acque potabili del luglio 2011 (1).

Il valore guida della WHO è stato adottato come valore di parametro in molte legislazioni nazionali, anche nell'ambito dell'UE (cfr. sez 2.2).

Attualmente, nel contesto del processo di revisione continuo delle linee guida della WHO è anche in fase di definizione un valore guida per la cilindrospermopsina, per la quale è stata proposta una TDI di valore simile a quella della MC-LR (2).

2.3.2. Approccio e criteri di valutazione

Tenendo conto delle indicazioni elaborate a livello internazionale (1, 3) e delle valutazioni e conoscenze acquisite sul piano nazionale, il gruppo di lavoro ha considerato l'utilità e le condizioni connesse alla fissazione di un valore massimo ammissibile per le cianotossine, la valutazione delle tossine da considerare con carattere di priorità e l'approccio da implementare per la definizione del valore massimo ammissibile.

In questo contesto, il gruppo ritiene fondamentale evidenziare quanto segue.

- Il progresso di studi multidisciplinari sulle cianotossine ha consentito di evidenziare rilevare e identificare, ad oggi, diverse classi di tossine, differenziate per aspetti strutturali e attività biologica e, in molti casi, un numero elevato di congeneri all'interno di ogni classe di tossine; ad esempio la classe delle microcistine annovera più di 80 varianti strutturali. In tali circostanze risulta attualmente impraticabile l'assegnazione di singoli valori di riferimento per tutte le possibili cianotossine e, d'altra parte, la definizione di un massimo valore ammissibile per un numero limitato di cianotossine potrebbe essere ritenuta insufficiente a garantire la sicurezza al consumo di acque approvvigionate in condizioni di bloom algale, generalmente caratterizzate da profili tossici complessi. È anche da considerare che la ricerca accurata delle diverse cianotossine in campioni di acqua o altre matrici ambientali è fortemente ostacolata dalla disponibilità di metodi analitici e risorse strumentali e umane adeguate.
- L'esame di consistenti dati storici sulla contaminazione delle acque da parte di cianobatteri in Italia evidenzia come le microcistine rappresentano la classe di tossine largamente predominante, sebbene sia anche a più riprese evidenziata la presenza di cilindrospermopsina. Le varianti di MC presenti possono differire significativamente anche a seconda delle specie algali presenti delle aree geografiche, degli stadi di sviluppo della popolazione algale; la MC-LR spesso non risulta il congenere dominante predominando varianti meno tossiche come le forme demetilate.
- Su tali basi, un approccio efficiente per garantire un'adeguata qualità delle acque destinate al consumo umano rispetto al rischio cianotossine deve necessariamente basarsi sull'adozione dei *Water Safety Plan* e dei controlli a barriera multipla, come descritto nella Parte 2 del Rapporto ISTISAN 11/35 sez. 1.1.
- Nondimeno, l'adozione di un valore massimo ammissibile per una o più cianotossine, relativamente alle classi di cui si ha evidenza di maggiore diffusione, secondo principi di massima precauzione, è una strategia utile ad indicare il rischio di contaminazione di cianotossine in seguito a bloom di cianobatteri sia nell'ambito del controllo della filiera che per la valutazione della conformità al punto di utenza. Tale approccio, sul piano normativo è peraltro seguito in altri casi, come ad esempio per gli indicatori fecali, il cui controllo è stato dimostrato utile per la prevenzione della presenza di buona parte dei patogeni di origine fecale (4). Si ritiene pertanto che la definizione del valore massimo ammissibile per la classe delle microcistine può essere adeguato per la prevenzione e il controllo delle situazioni di rischio delle cianotossine in Italia, soprattutto nel contesto di un approccio preventivo basato sull'analisi e il controllo integrato dei rischi (come

descritto nel Rapporto ISTISAN 11/35 Pt. 2, sez. 1.1). Allo stato attuale delle conoscenze e sulla base del quadro di contaminazione emergente a livello nazionale, il gruppo di lavoro intende pertanto definire un valore massimo ammissibile per il gruppo delle microcistine; il valore stabilito dalla WHO per la MC-LR (composto più tossico all'interno della classe delle microcistine, (3-5) pari a 1,0 µg/L è considerato adeguato allo scopo. La necessità di considerare anche l'esposizione a congeneri diversi dalla MC-LR richiede tuttavia la fissazione di un limite da applicare alla somma delle diverse microcistine potenzialmente presenti; a tal fine, viene condiviso l'approccio basato sull'applicazione dei *Toxicity Equivalent Factors* (TEF), similmente a quanto adottato per il controllo delle diossine (2-5) sebbene non si consideri ancora sufficientemente adeguato lo stato della definizione dei fattori di equivalenza tra le microcistine, relativamente agli effetti acuti, a breve e lungo termine (cfr. sez. 1.3). Pertanto un valore massimo ammissibile deve essere stabilito per la MC-LR, pari al valore guida stabilito dalla WHO di 1,0 µg/L, riferendosi al contenuto di tossina totale (intra ed extracellulare); sulla base di un approccio ampiamente conservativo nei confronti della protezione della salute, tale valore deve essere riferito alla somma delle concentrazioni dei diversi congeneri di MC presenti nel campione.

- La definizione dei valori di riferimento dovrà periodicamente essere oggetto di revisione in considerazione dei progressi sulle conoscenze in materia di tossicità delle cianotossine e del quadro della contaminazione nazionale.

2.3.3. Valori di riferimento nazionali per le cianotossine

In base ai criteri sopra discussi, e alle conclusioni condivise dal gruppo di lavoro, il sistema di gestione del rischio per il controllo delle cianotossine nelle acque destinate al consumo umano deve basarsi:

- su un approccio preventivo di valutazione del rischio e controlli “a barriera multipla” secondo i principi dei *Water Safety Plan* della WHO (1, 6, 7) (come descritto nel Rapporto ISTISAN 11/35 Pt. 2 sez. 1.1.);
- sul rispetto, nei punti di conformità stabiliti dal DL.vo 31/2001 (art. 6), del valore massimo ammissibile per le cianotossine.

Il valore massimo ammissibile provvisorio per la MC-LR in acque destinate al consumo umano è pari a 1,0 µg/L riferito al contenuto di tossina totale (intra ed extracellulare). Sulla base di un approccio ampiamente conservativo nei confronti della protezione della salute, con sovrastima nella valutazione della tossicità, secondo l'approccio di stima di peggior caso, il valore di 1,0 µg/L deve essere riferito alla somma delle concentrazioni dei diversi congeneri di MC presenti nel campione, considerati come equivalenti di MC-LR. A tal fine devono essere ricercati i congeneri di microcistine determinabili al meglio delle potenzialità analitiche disponibili e, come criterio minimo, i congeneri per i quali sono attualmente commercialmente disponibili standard analitici, Dem-MC-RR, MC-RR, MC-YR, Dem-MC-LR, MC-LR, MC-LA, MC-LY, MC-LF, MC-LW.

La definizione dei valori di riferimento, compresa la determinazione di valore massimo ammissibile per altre cianotossine, sarà periodicamente oggetto di revisione in considerazione dei progressi sulle conoscenze in materia di tossicità delle cianotossine e del quadro della contaminazione nazionale.

Bibliografia

1. World Health Organization. *Guidelines for drinking-water quality*. Geneva: WHO; 2011.
2. Wolf HU, Frank C. Toxicity assessment of cyanobacterial toxin mixtures. *Environmental Toxicology* 2002;17:395-9.
3. Chorus I, Bartram J (Ed.). *Toxic cyanobacteria in water: a guide to their public health consequences, monitoring and management*. London: E & FN Spon; 1999.
4. Chorus I. Water safety plans. A better regulatory approach to prevent human exposure to harmful cyanobacteria. In: Huisman J, Matthijs H, Visser P (Ed.). *Harmful cyanobacteria*. Dordrecht: Springer; 2005. p. 201-27.
5. Ikehara T, Imamura S, Sano T, Nakashima J, Kuniyoshi K, Oshiro N, Yoshimoto M, Yasumoto T. The effect of structural variation in 21 microcystins on their inhibition of PP2A and the effect of replacing cys269 with glycine. *Toxicon* 2009;54(4):539-44.
6. World Health Organization. *Guidelines for drinking-water quality*. Geneva: WHO; 2006.
7. Ottaviani M, Lucentini L, Bonadonna L, Ferretti E. Valutazione e gestione del rischio nella filiera delle acque destinate al consumo umano: i water safety plan nella revisione della direttiva 98/83/CE. *Notiziario dell'Istituto Superiore di Sanità* 2009;22(1):3-8.

SEZIONE 3
Metodi di sorveglianza e controllo

3.1. IDENTIFICAZIONE, CONTEGGIO E QUANTIFICAZIONE DI CIANOBATTERI TOSSICI

Roberta Congestri (a), Domenico D'Alelio (b), Emanuela Viaggiu (a)

(a) *Dipartimento di Biologia, Università degli Studi di Roma Tor Vergata, Roma*

(b) *IASMA Research and Innovation Centre, Fondazione Edmund Mach, San Michele all'Adige*

3.1.1. Tassonomia dei cianobatteri nello scenario del controllo delle acque

L'analisi tassonomica dei cianobatteri nelle acque destinate al consumo umano è di fondamentale importanza per il controllo e il monitoraggio della qualità delle risorse idriche e per la conseguente tutela della salute dell'uomo.

La presenza di cianobatteri tossici nei campioni d'acqua prelevati per le analisi di routine deve essere rilevata (identificazione) e quantificata (conteggio) in maniera accurata e rapida così da fornire una misura di allerta essenziale per l'adozione di strategie volte a valutare, a prevenire o a mitigare il rischio associato all'esposizione a cianotossine nelle acque in distribuzione.

I cianobatteri tossici descritti finora presentano una notevole diversità fenotipica e genotipica, e si collocano in almeno 3 dei 4 raggruppamenti indicati dall'inquadramento tassonomico tradizionale.

L'ampia varietà morfologica delle forme tossiche (coccoidi e filamentose dritte o curve, solitarie o in aggregati di vario aspetto, capaci di divisioni cellulari su piani diversi o meno, e con la possibilità di differenziare cellule specializzate) unitamente alle piccole dimensioni cellulari, osservabili durante le analisi microscopiche, rendono in molti casi l'identificazione e il conteggio di questi microrganismi particolarmente problematici e impegnativi, necessitando nella maggior parte dei casi di un'elevata preparazione e capacità dell'operatore.

3.1.1.1. Problemi e prospettive dell'integrazione tra approcci tradizionali e molecolari

Attualmente la caratterizzazione dei cianobatteri prevede l'applicazione di un approccio polifasico che tiene conto di caratteri fenotipici e genetici. In particolare, la necessità di confrontare le evidenze molecolari acquisite negli anni più recenti (sequenziamento 16S rRNA, DNA fingerprinting) con l'organizzazione tassonomica classica hanno condotto alla definizione di un approccio integrato alla valutazione della diversità dei cianobatteri. Questo criterio prevede la necessità di combinare informazioni di tipo genetico con i dati citomorfologici, ultrastrutturali, biochimici ed ecologici, raccolti in 150 anni di ricerche "classiche" sulla diversità dei cianobatteri, al fine di definire un singolo taxon (1, 2). Solo questo criterio conduce a un inquadramento tassonomico il più possibile condivisibile dalla comunità scientifica e, in quanto tale, strumento di comunicazione valido e inequivocabile. Ne consegue la necessità di una continua revisione e implementazione dell'assetto tassonomico di questi microrganismi e della nomenclatura associata al fine di tener conto del progredire delle conoscenze che derivano

dall'introduzione di questo approccio polifasico e dall'applicazione di tecniche e metodologie sempre più raffinate.

Nella bibliografia specialistica più recente si sottolinea come i cianobatteri, pur rappresentando un gruppo monofiletico di procarioti unici nella capacità di fotosintesi ossigenica tra i batteri, presentino una notevole diversità morfologica, fisiologica e genetica e che la tassonomia fondata su caratteri morfologici non rifletta sempre le reali relazioni evolutive tra gli organismi, così come indicato da dati di filogenesi molecolare e di ibridazione DNA-DNA (3, 4).

Peraltro, è noto che la morfologia di questi organismi può subire ampie variazioni in relazione alle condizioni ambientali e alle fasi di crescita e tale instabilità, inoltre, risulta particolarmente evidente in coltura (es. perdita delle vescicole gassose o della capacità di formare colonie nelle specie planctoniche). I processi di diversificazione e speciazione sono, infatti, particolarmente efficienti nei cianobatteri in virtù di una spiccata adattabilità (acclimatazione e adattamento) alle variazioni ambientali, correlata tanto alla capacità di scambio orizzontale di materiale genetico nelle popolazioni naturali quanto a meccanismi di mutazione. Tali processi, rappresentando essi una traiettoria di ricombinazione genica in assenza di meccanismi di riproduzione sessuata, hanno sicuramente contribuito al successo evolutivo dei cianobatteri (5).

Al fine di caratterizzare i cianobatteri è risultato quindi necessario utilizzare i dati genetici come criterio di base da complementare con i dati fenotipici, espressione questi della variabilità in natura derivata dal continuo adattamento e diversificazione di nuovi ecotipi e morfotipi. Questa diversità, infatti, non può essere rilevata con la sola analisi di isolati in coltura (5, 6). Infatti il trasferimento in coltura di ceppi di cianobatteri da popolazioni naturali e il loro mantenimento in condizioni standard rappresenta un aspetto particolarmente critico degli studi sui cianobatteri:

- Le condizioni colturali standard possono essere diverse rispetto alle condizioni di crescita delle singole popolazioni nei loro habitat di origine.
- Il mantenimento in coltura può portare all'adattamento fisiologico dei ceppi di cianobatteri.
- Data l'ampia diversità intraspecifica a livello di popolazione naturale, un unico ceppo può non essere rappresentativo della diversità *in situ* della popolazione originaria.

Gli aspetti generali più innovativi introdotti dall'approccio integrato alla classificazione dei cianobatteri sono esposti in un recente compendio (7), di cui di seguito riportiamo una sintesi:

- è necessario rinnovare i criteri utilizzati per definire le unità tassonomiche (generi, specie), la cui caratterizzazione attraverso l'applicazione di metodi molecolari è indispensabile per la revisione tassonomica dei cianobatteri. Il sequenziamento del locus genico che codifica la porzione 16S del RNA ribosomiale (16S rRNA) rappresenta il principale metodo molecolare, più o meno standardizzato, utilizzato principalmente per discriminare a livello di genere;
- i raggruppamenti risultanti dall'analisi del 16S rRNA corrispondono in gran parte ai generi "tradizionali" dei cianobatteri, distinti in base ai caratteri fenotipici. Un limite di similarità del 95% è da ritenersi indicativo di generi diversi per i cianobatteri. Questo limite restrittivo, pur non rappresentando un criterio obbligatorio standard per separare taxa biologici in senso assoluto, può essere un importante marcatore per una discriminazione preliminare a livello di genere. Ne consegue che la caratterizzazione dei generi deve essere basata sulla separazione molecolare (~95% o meno di similarità genetica) in combinazione con almeno un carattere citomorfologico univocamente assegnato a ciascun genere e ritenuto discriminante a livello di specie;

- nel corso degli ultimi decenni, la maggior parte dei generi di cianobatteri “tradizionali” (*sensu* Geitler) e quelli di nuova istituzione sono stati confermati da metodi molecolari sulla base dei caratteri morfologici selezionati alla luce delle moderne revisioni (morfologiche ed ecologiche), tra questi alcuni taxa coinvolti nella produzione di tossine come *Cylindrospermopsis*, *Microcystis* e *Planktothrix*; mentre la posizione filogenetica di altri generi comprendenti forme tossiche, come *Aphanizomenon* e *Anabaena*, è risultata meno chiara (8);
- sebbene il sequenziamento del gene 16S rRNA possa essere usato quale approccio genetico standard per separare i generi di cianobatteri, un simile approccio è problematico se applicato a specie e popolazioni. È evidente che, all’interno dei diversi generi, ricorrono diversi morfotipi e/o ecotipi in diverse località e periodi dell’anno, come risultato di un processo di diversificazione probabilmente diverso nell’ambito dei diversi habitat: infatti, tutte le popolazioni di cianobatteri sono in continuo cambiamento ed evoluzione. Diversi raggruppamenti sub-generici (specie tradizionali) sono caratterizzati da modificazioni ecologiche, morfologiche o biochimiche, riconoscibili e più o meno stabili entro un dato periodo di tempo. Si ricorda a questo proposito che la possibilità di distinguere le diverse “specie” è fondamentale per gli studi ecologici di popolazioni naturali planctoniche e soprattutto nelle ricerche volte a valutare e monitorare il rischio della produzione di tossine da parte di popolazioni e di fioriture di popolazioni di cianobatteri;
- concludendo, il moderno sistema tassonomico dei cianobatteri deve essere basato sulla definizione molecolare dei genotipi (= raggruppamenti con un indice di similarità pari approssimativamente al 95% o meno utilizzando il gene 16S rRNA quale marcatore standard), i quali corrispondono alla categoria classica “genere”; di contro, le unità sub-generiche (specie) non possono essere riconosciute utilizzando i metodi di sequenziamento del gene 16S rRNA. Per esempio, dal momento che questo gene può presentarsi in copia multipla all’interno del genoma di alcuni batteri, il suo utilizzo a fini tassonomici può presentare alcune ambiguità. A questo riguardo, e in accordo con lo stato attuale della conoscenza sulla esistenza di specie criptiche, mutanti pigmentari stabilizzati ecc., ne consegue che la categoria specie è utile ma la sua concettualizzazione o definizione può essere probabilmente solo una misura convenzionale, con differenti criteri in diversi generi. La più appropriata definizione di specie è quella che segue: “Gruppi di popolazioni (o ceppi) che appartengono ad un solo genotipo, caratterizzate da caratteristiche fenotipiche stabilizzate (ovvero definibili e riconoscibili, con distinti limiti di variazione) e occupanti la medesima nicchia ecologica. Essi ricorrono ripetitivamente (nel tempo) in una varietà di località ecologicamente simili”.

3.1.1.2. Il caso di alcune popolazioni italiane del genere *Planktothrix*

La tassonomia del genere *Planktothrix* si basa prevalentemente su caratteri fenotipici ed ecologici. In effetti, tentativi volti a definire le diverse specie attraverso analisi morfologiche, genetiche e biochimiche si sono rivelati inadeguati in quanto basati su pochi ceppi (ovvero colture monoclonali) simpatrici, sì da sottostimare la effettiva diversità naturale. Una ulteriore complicazione è data dal fatto che i marcatori molecolari utilizzati per la discriminazione a livello di genere (come il 16S rRNA) presentano la medesima configurazione all’interno di specie morfologicamente ed ecologicamente distinte e non sono quindi utilizzabili nella discriminazione a livello di specie.

Alla luce di queste singolarità, presenti peraltro anche in altri generi di cianobatteri, si è ricorso all’utilizzo di marcatori diversi dal 16S rRNA, in un approccio in cui la filogenesi può essere

prodotta partendo da un data set composto dal “concatenamento” dei diversi geni. Nel caso di *Planktothrix*, i geni a singola copia rpoC1 (codificante una sub-unità dell’enzima RNA-polimerasi) ed rbcLX (che include un gruppo di loci genici codificanti per l’enzima RuBisCO) sono stati utilizzati, unitamente al 16S rRNA, all’interno di un approccio filogenetico MLST (9). In particolare, si è visto come il gene rpoC1 avesse configurazioni distinte in *P. rubescens* e *P. agardhii*. Un limite di queste indagini era però rappresentato dall’utilizzo di un numero inadeguato di ceppi per caratterizzare *P. rubescens*, con l’analisi filogenetica totalmente sbilanciata verso *P. agardhii*. Per ovviare a tale problema, uno studio estensivo è stato realizzato sulle popolazioni di *Planktothrix* che vivono nel distretto dei laghi subalpini italiani, con lo scopo di identificare le specie presenti e di rendere chiare le relazioni filogenetiche tra di esse. In questo ambito, 500 ceppi di *Planktothrix* sono stati isolati, circa 50 ceppi per lago (10), e sono stati caratterizzati morfologicamente e geneticamente per i loci rpoC1 e rbcLX (11, 12). Dal punto di vista morfologico, sono state identificate due morfospesie (*P. rubescens* e *P. suspensa*, quest’ultima estremamente rara) (11). Sul piano genetico, ben 6 genotipi. Quattro di questi ultimi risultavano associati a un solo morfotipo. Inoltre, dall’analisi genetica si è evinto un elevato tasso di ricombinazione nel gene rpoC1 tra le popolazioni delle due morfospesie campionate (10). La ricombinazione genetica – nei batteri definita anche “trasferimento genico laterale” o HGT (*Horizontal Gene Transfer*) – è un processo evolutivo attraverso cui pezzi di un gene passano da un ipotetico individuo A ad un altro individuo B formando un terzo individuo A+B rispetto al gene in questione. In effetti, se da un lato la sostituzione di uno o più nucleotidi è il “meccanismo” alla base della divergenza tra 2 o più entità, la ricorrenza di HGT all’interno di un genere rende complicato il corretto posizionamento filogenetico delle diverse unità tassonomiche. I risultati ottenuti dallo studio realizzato sulle popolazioni italiane evidenziano che l’HGT è una causa di diversità genetica sotto stimata nel genere *Planktothrix* e che le relazioni filogenetiche tra morfospesie possono essere inficiate da tale fenomeno. D’altro canto, essi mostrano anche il ruolo potenziale dell’HGT quale vettore di innovazioni ecologiche e risposte adattative ai cambiamenti ambientali (ovvero plasticità evolutiva) nel genere *Planktothrix*.

In ultima analisi, i principali limiti degli studi filogenetici attuali – propedeutici per la corretta identificazione di taxa a livello di specie – sono:

- la disponibilità di un buon numero di ceppi simpatici per ciascuna unità tassonomica (in modo tale da coprire la diversità intra-popolazione)
- l’uso di marcatori molecolari adeguati, la cui configurazione all’interno di ciascuna unità tassonomica risulti essere associata o a mutazione o a ricombinazione genetica (o eventualmente ad entrambi e in che misura).

L’analisi filogenetica di riferimento per lo sviluppo di metodiche di identificazione e quantificazione di specie cianobatteriche deve essere quindi opportunamente rappresentativa della variabilità genetica naturale, che può emergere in conseguenza di eventi tanto di mutazione quanto di ricombinazione genetica.

3.1.2. Metodi di identificazione e quantificazione di cianobatteri tossici

3.1.2.1. Identificazione al microscopio ottico

Si riporta una selezione delle revisioni tassonomiche più recenti di cianobatteri tossici quale materiale consigliato a supporto dell’analisi di campioni naturali al microscopio ottico. Nell’ambito di un sistema integrato di controllo della qualità delle acque destinate al consumo

umano, si ritiene infatti che il regolare monitoraggio delle acque, in termini di prelievo e osservazione di campioni, e il conteggio al microscopio di morfotipi “critici” costituiscano informazioni essenziali per la segnalazione preliminare di potenziali rischi e per dirigere analisi di accertamento e l’attuazione di contromisure. In tal senso, il contatto con i progressi di una disciplina in evoluzione, come la tassonomia dei cianobatteri, rappresenta un’esigenza reale per chi, operando nel controllo ambientale e sanitario, deve catalogare ed enumerare organismi biologici e comunicare informazioni inequivocabili agli altri operatori del settore.

Lista dei principali taxa di cianobatteri a tutt’oggi associati alla produzione di tossine nei bacini italiani e referenze consigliate per il loro riconoscimento al microscopio ottico (13-20):

- *Aphanizomenon flos aquae*, *A. ovalisporum*;
- *Cylindrospermopsis raciborskii*;
- *Dolichospermum (ex Anabaena) flos aquae*, *D. lemmermannii*, *D. planctonicum*, *D. spiroides*;
- *Microcystis aeruginosa*, *M. flos aquae*, *M. wesenbergii*;
- *Planktothrix agardhii*, *P. rubescens*.

Per quanto concerne le indicazioni sui metodi di conteggio di cianobatteri si rimanda alla recente revisione (vedi Appendice B).

Vengono, di seguito, sintetizzate le più importanti tecniche messe a punto negli ultimi anni per supportare l’identificazione e il conteggio di cianobatteri tossici in campioni naturali.

L’utilizzo di metodi molecolari, soprattutto l’amplificazione di frammenti genici attraverso PCR (*Polymerase Chain Reaction*) combinata al sequenziamento dei raggruppamenti di geni che codificano per alcune delle principali cianotossine, rappresenta, ad oggi, uno strumento promettente per il rilievo della presenza e la stima dell’abbondanza di forme tossiche nelle acque. Sebbene questo approccio consenta di superare l’ambiguità legata all’impossibilità di distinguere al microscopio individui tossici e non tossici appartenenti alla stessa specie, si ritiene ancora necessario un avanzamento della conoscenza di questa tecnica affinché il metodo possa essere adottato in analisi routinarie.

Si sottolinea, inoltre, che tali tecniche analitiche recentemente oggetto di numerose ed esaustive review (21-25) comportano a tutt’oggi costi, anche di funzionamento (QPCR) e tempi elevati e che richiedono, al pari dell’approccio microscopico, una notevole esperienza e preparazione tecnica dell’operatore (isolamento e purificazione del DNA, ottimizzazione e calibrazione per QPCR).

3.1.2.2. Identificazione e quantificazione al microscopio

Tecniche automatiche o semi-automatiche di conteggio, calcolo del biovolume e analisi morfometrica basate su microscopia in epifluorescenza e analisi di immagine di campioni naturali. Esistono delle limitazioni all’applicazione di queste tecniche perlopiù dovute alla difficoltà da parte dei sistemi di discriminare le singole entità da enumerare e misurare, soprattutto nel caso di campioni contenenti forme coccali in aggregati o forme filamentose, più o meno curve, solitarie o riunite in fasci. Il grado di sovrapposizione tra filamenti, soprattutto nei campioni più densi, presenta degli svantaggi che vari autori hanno affrontato nel corso dell’ultimo decennio (26-32).

3.1.2.3. Identificazione e quantificazione con metodi genetici

Tecniche di PCR, amplificazione di frammenti genici, rappresentano ad oggi i più importanti tra i metodi genetici applicati al riconoscimento e alla quantificazione di cianobatteri tossici.

3.1.2.4. PCR convenzionale

Prima della descrizione delle macroregioni geniche codificanti le cianotossine, vari test molecolari alternativi sono stati impiegati nel tentativo di identificare e classificare i cianobatteri tossici. Il gene che codifica per il 16S rRNA e lo spaziatore intergenico 16S-23S rRNA ITS (*Internal Transcribed Spacer*) sono stati testati come possibili strumenti di rilevamento e discriminazione di cianobatteri epatotossici.

La tecnologia PCR, unitamente al sequenziamento dei geni attraverso di essa amplificati e/o alla tecnica RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) ha consentito di costruire alberi filogenetici includendo un ampio spettro di specie epatotossiche, in particolare all'interno del genere *Microcystis* (33).

Molti altri loci genici sono stati testati come strumenti diagnostici molecolari: ad esempio, variazioni nel gene codificante per il pigmento ficocianina hanno consentito la delimitazione intragenetica di ceppi di *Microcystis*, *Anabaena* e *Nodularia*, mentre sequenze del gene regolante l'azoto-fissazione (*nifJ*) sono state usate per distinguere ceppi produttori di epatotossine da quelli neurotossici del genere *Anabaena*.

3.1.2.5. Cluster genici di cianotossine come marker

Il sequenziamento dei cluster genici che codificano per microcistina, nodularina, cilindrospermopsina e, più recentemente, anatoxina-a e saxitossina ha consentito l'utilizzo delle tecniche di PCR per l'analisi della presenza e distribuzione *in situ* dei geni implicati nella produzione di tali cianotossine (34-39). Questi studi, oltre a contribuire ad approfondimenti sull'evoluzione delle vie biosintetiche delle diverse tossine, permettono ad oggi di sfruttare un ampio spettro di informazioni di sequenze come base per lo sviluppo di piani di monitoraggio real-time e completi delle acque superficiali, diretti cioè a tutti i principali genotipi tossici di cianobatteri (40).

A questo proposito va, tuttavia, ricordata la capacità dei cianobatteri di produrre una grande quantità di peptidi non ribosomali ciclici o lineari diversi dalle tossine suddette e ciò deve essere tenuto in considerazione all'atto della definizione di primer specifici per le diverse entità tassonomiche (41, 24). Inoltre, la tecnica PCR convenzionale è soggetta a problemi tipici e richiede la conoscenza di principi base di biologia molecolare. I primer sono solitamente sviluppati e testati su un numero limitato di ceppi e quindi possono non essere opportunamente applicabili a nuovi ceppi o specie senza ulteriori analisi di verifica. Inoltre, i campioni ambientali possono contenere inibitori di PCR e questo aspetto dovrebbe essere verificato in caso di risultati negativi. Le principali limitazioni del metodo sono legate alla possibilità di sovrastima del rischio dovuto alla presenza di forme tossiche. Infatti, l'analisi di un elevato numero di ceppi di *Microcystis* unitamente a campioni ambientali ha portato a identificare alcuni casi in cui i geni per la sintesi della microcistina erano presenti ma l'organismo era incapace di produrre microcistine, probabilmente a causa di mutazioni all'interno della estesa macroregione genica di regolazione (22). D'altra parte, gli studi condotti da Kurmayer et al. (42) e Ostermaier e Kurmayer (43) hanno mostrato che una frazione piuttosto alta di ceppi/colonie di *Planktothrix* isolati in laghi alpini austriaci conteneva geni ma non era in grado di produrre microcistine. Questi risultati dimostrano inoltre che la ricorrenza di genotipi-mcy inattivi è linearmente relazionata alla densità di popolazione e che questi mutanti non tossici non sono contro-selezionati durante la transizione da pre-fioritura a fioritura.

3.1.2.6. Quantitative *real-time* PCR

L'applicazione di questa tecnica quantitativa che stima l'abbondanza di copie di geni target nel campione consente di valutare la proporzione dei genotipi potenzialmente tossici nell'ambiente naturale. Affinché la QPCR rappresenti uno strumento di monitoraggio è necessaria l'esistenza di una correlazione significativa tra l'abbondanza dei genotipi tossici e la concentrazione delle tossine nell'ambiente. Questo approccio permette infatti di analizzare l'espressione dei geni relativi alla produzione delle tossine, che può avere un ciclo stagionale sotto l'influenza di fattori esterni come le variazioni di temperatura e nutrienti (44-47) o variare in relazione alle fasi di successione di una fioritura (48, 43). Nonostante, quindi, le più recenti acquisizioni sulla variabilità della produzione di tossine da parte di individui in possesso di geni che codificano per le tossine stesse, la QPCR rappresenta al momento una tecnica molto promettente per il monitoraggio della qualità dell'acqua, il cui sviluppo futuro consentirà l'applicazione di uno strumento accurato ed efficace per la previsione della concentrazione di tossine nelle acque. La ricerca sulla possibilità di utilizzo di strumentazione portatile, infine, apre nuove importanti prospettive per il controllo *in situ* di aree costiere sempre più estese e con costi e tempi di risposta largamente ridotti (49).

Bibliografia

1. Hoffmann L, Kaštovský J, Komárek J. Proposal of cyanobacterial system - 2004. In: Büdel B, Krienitz L, Gürtner G, Schagerl M (Ed.). *Süßwasserflora von Mitteleuropa 19/2*. Heidelberg: Elsevier/Spektrum; 2005. p. 657-60.
2. Hoffmann L, Komárek J, Kaštovský J. System of cyanoprokaryotes (cyanobacteria) - state in 2004. *Archiv für Hydrobiologie. Supplementband/Algological Studies (Cyanobact. Res.6)* 2005;117:95-115.
3. Tomitani A, Knoll AH, Cavanaugh CM, Ohno T. The evolutionary diversification of cyanobacteria: Molecular-phylogenetic and paleontological perspectives. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2006;103(14):5442-7.
4. Shi T, Falkowski PG. Genome evolution in cyanobacteria: The stable core and the variable shell. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2008;105(7):2510-5.
5. Komárek J. Cyanobacterial taxonomy: current problems and prospects for the integration of traditional and molecular approaches. *Algae* 2006;21(4):349-75.
6. Komárek J. Problems in cyanobacterial taxonomy: implication for most common toxin producing species In: *Le fioriture di alghe tossiche nelle acque dolci: emergenza sanitaria e misure di controllo*, Workshop. Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2000. (Rapporti ISTISAN 02/9). P. 6-43.
7. Komárek J. Recent changes (2008) in cyanobacteria taxonomy based on a combination of molecular background with phenotype and ecological consequences (genus and species concept). *Hydrobiologia* 2010;639:245-259.
8. Rajaniemi P, Hrouzek P, Kaštovská K, Willame R, Rantala A, Hoffmann L, Komárek J, Sivonen K. Phylogenetic and morphological evaluation of the genera *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Trichormus* and *Nostoc* (Nostocales, Cyanobacteria). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 2005;55(1):11-26.
9. Lin S, Wu ZX, Yu GL, Zhu ML, Yu BS, Li RH. Genetic diversity and molecular phylogeny of *Planktothrix* (Oscillatoriales, cyanobacteria) strains from China. *Harmful Algae* 2010;9(1):87-97.
10. D'Alelio D, Gandolfi A, Boscaini A, Flaim G, Tolotti M, Salmaso N. *Planktothrix* populations in subalpine lakes: selection for strains with strong gas vesicles as a function of lake depth, morphometry and circulation. *Freshwater Biology* 2011;56(8):1481-93.

11. D'Alelio D, Salmaso N. Occurrence of an uncommon Planktothrix (Cyanoprokaryota, Oscillatoriales) in a deep lake south of the Alps. *Phycologia* 2011;50(4):379-83.
12. D'Alelio D, Gandolfi A, Salmaso N. One, no one and one hundred thousand Planktothrix species: is lateral gene transfer a neglected source of genetic diversity? *14th International Conference on Harmful Algae*, 1-6 November 2010, Hersonissos, Crete (Greece), p. 179.
13. Dvořák P, Hašler P. Occurrence and morphological variability of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Wolosz.) Seenayya et Subba Raju (Cyanophyta, Nostocales) near Olomouc in 2006. *Fottea, Olomouc* 2007;7(1):39-42.
14. Komárek J, Komárková J. Review of the European Microcystis-morphospecies (Cyanoprokaryotes) from nature. *Czech Phycology, Olomouc* 2002;2:1-24.
15. Komárek J, Komárková J. Taxonomic review of the cyanoprokaryotic genera Planktothrix and Planktothricoides. *Czech Phycology, Olomouc* 2004;4:1-18.
16. Komárek J, Komárková J. Diversity of Aphanizomenon-like cyanobacteria. *Czech Phycology, Olomouc* 2006;6:1-32.
17. Komárek J, Zapomělová E. Planktic morphospecies of the cyanobacterial genus *Anabaena* = subg. *Dolichospermum* – 1. part: coiled types. *Fottea, Olomouc* 2007;7(1):1-31.
18. Komárek J, Zapomělová E. Planktic morphospecies of the cyanobacterial genus *Anabaena* = subg. *Dolichospermum* – 2. part: straight types. *Fottea, Olomouc* 2008;8(1):1-14.
19. Wacklin P, Hoffmann L, Komárek J. Nomenclatural validation of the genetically revised cyanobacterial genus *Dolichospermum* (Ralfs ex Bornet et Flahault) comb. nova. *Fottea* 2009;9(1):59-64.
20. Zapomělová E. Current taxonomic issues with planktonic representatives of the genus *Anabaena* (Cyanobacteria) with special reference to their morphological features; literary review. *Czech Phycology, Olomouc* 2006;6:33-47.
21. Pearson LA, Neilan BA. The molecular genetics of cyanobacterial toxicity as a basis for monitoring water quality and public health risk. *Current Opinion in Biotechnology* 2008;19(3):281-8.
22. Sivonen K. Emerging high throughput analyses of cyanobacterial toxins and toxic cyanobacteria. In: Hudnell HK (Ed.). *Cyanobacterial harmful algal blooms: state of the science and research needs*. New York: Springer; 2008. p. 539-557.
23. Vichi S, Gemma S, Testai E. *Metodi genetici nell'identificazione di cianobatteri e della loro potenziale tossicità Cianobatteri potenzialmente tossici: aspetti ecologici, metodologici e valutazione del rischio* Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2008. (Rapporti ISTISAN 08/6).p. 59-67.
24. Wilhelm SW. Field methods in the study of toxic cyanobacterial blooms. In: Hudnell HK (Ed.). *Cyanobacterial harmful algal blooms: state of the science and research needs*. New York: Springer; 2008. p. 501-12.
25. Humbert JF, Quiblier C, Gugger M. Molecular approaches for monitoring potentially toxic marine and freshwater phytoplankton species. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 2010;397(5):1723-32.
26. Walsby AE, Avery A. Measurement of filamentous cyanobacteria by image analysis. *Journal of Microbiological Methods* 1996;26(1-2):11-20.
27. Congestri R, Federici R, Albertano P. Evaluating biomass of Baltic filamentous cyanobacteria by image analysis. *Aquatic Microbial Ecology* 2000;22(3):283-90.
28. Albertano P. Image analysis for qualitative and quantitative evaluation of planktic cyanobacteria. In: *Le fioriture di alghe tossiche nelle acque dolci: emergenza sanitaria e misure di controllo*. Workshop. Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2000. (Rapporti ISTISAN 02/9). p 64-9.
29. Congestri R, Capucci E, Albertano P. Morphometric variability of *Nodularia* (Cyanobacteria) in Baltic natural communities. *Aquatic Microbial Ecology* 2003;32(3):251-9.

30. Ernst B, Nesper S, O'Brien E, Hoeger SJ, Dietrich DR. Determination of the filamentous cyanobacteria *Planktothrix rubescens* in environmental water samples using an image processing system. *Harmful Algae* 2006;5(3):281-9.
31. Almesjo L, Rolff C. Automated measurements of filamentous cyanobacteria by digital image analysis. *Limnology and Oceanography Methods* 2007;5:217-24.
32. Zeder M, Van den Wyngaert S, Köster O, Felder KM, Pernthaler J. Automated quantification and sizing of unbranched filamentous cyanobacteria by model-based object-oriented image analysis. *Applied and Environmental Microbiology* 2010;76(5):1615-22.
33. Neilan BA. The molecular evolution and DNA profiling of toxic cyanobacteria. *Current Issues in Molecular Biology* 2002;4(1):1-11.
34. Tillett D, Dittmann E, Erhard M, von Döhren H, Borner T, Neilan BA. Structural organization of microcystin biosynthesis in *Microcystis aeruginosa* PCC7806: an integrated peptidepolyketide synthetase system. *Chemistry & Biology* 2000;7(10):753-64.
35. Christiansen G, Fastner J, Erhard M, Borner T, Dittmann E. Microcystin biosynthesis in *Planktothrix*: genes, evolution, and manipulation. *Journal of Bacteriology* 2003;185(2):564-72.
36. Moffitt MC, Neilan BA. Characterization of the nodularin synthetase gene cluster and proposed theory of the evolution of cyanobacterial hepatotoxins. *Applied and Environmental Microbiology* 2004;70(11):6353-62.
37. Rouhiainen L, Vakkilainen T, Siemer BL, Buikema W, Haselkorn R, Sivonen K. Genes coding for hepatotoxic heptapeptides (microcystins) in the cyanobacterium *Anabaena* strain 90. *Applied and Environmental Microbiology* 2004;70(2):686-92.
38. Mihali TK, Kellmann R, Muenchhoff J, Barrow KD, Neilan BA. Characterization of the gene cluster responsible for cylindrospermopsin biosynthesis. *Applied and Environmental Microbiology* 2008;74(3):716-22.
39. Kellmann R, Michali TK, Jeon YJ, Pickford R, Pomati F, Neilan BA. Biosynthetic intermediate analysis and functional homology reveal a saxitoxin gene cluster in cyanobacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 2008;74(13):4044-53.
40. Méjean A, Mann S, Maldiney T, Vassiliadis G, Lequin O, Ploux O. Evidence that biosynthesis of the neurotoxic alkaloids anatoxin-a and homoanatoxin-a in the cyanobacterium *Oscillatoria* PCC 6506 occurs on a modular polyketide synthase initiated by L-proline. *Journal of the American Chemical Society*. 2009;131(22):7512-3.
41. Ostermaier V, Kurmayer R. Application of real-time PCR to estimate toxin production by the cyanobacterium *Planktothrix* sp. *Applied and Environmental Microbiology* 2010;76(11):3495-3502.
42. Welker M, von Döhren H. Cyanobacterial peptides-nature's own combinatorial biosynthesis. *FEMS Microbiology Reviews* 2006;30(4):530-63.
43. Kurmayer R, Christiansen G, Fastner J, Börner T. Abundance of active and inactive microcystin genotypes in populations of the toxic cyanobacterium *Planktothrix* spp. *Environmental Microbiology* 2004;6(8):831-41.
44. Ostermaier V, Kurmayer R. Distribution and abundance of nontoxic mutants of cyanobacteria in lakes of the Alps. *Microbial Ecology* 2009;58(2):323-33.
45. Briand E, Escoffier N, Straub C, Sabart M, Quiblier C, Humbert J-F. Spatiotemporal changes in the genetic diversity of a bloom-forming *Microcystis aeruginosa* (cyanobacteria) population. *The ISME Journal multidisciplinary Journal of Microbial Ecology* 2009;3(4):419-29.
46. Davis TW, Berry DL, Boyer GL, Gobler CJ. The effects of temperature and nutrients on the growth and dynamics of toxic and non-toxic strains of *Microcystis* during cyanobacteria blooms. *Harmful Algae* 2009;8(5):715-25.

47. Rinta-Kanto JM, Konopko EA, Debruyn JM, Bourbonniere RA, Boyer GL, Wilhelm SW. Lake Erie *Microcystis*: relationship between microcystin production, dynamics of genotypes and environmental parameters in a large lake. *Harmful Algae* 2009;8(5):665-73.
48. Van de Waal DB, Gonzalo Ferreruela G, Tonk L, Van Donk E, Huisman J, Visser PM, Matthijs HCP. Pulsed nitrogen supply induces dynamic changes in the amino acid composition and microcystin production of the harmful cyanobacterium *Planktothrix agardhii*. *FEMS Microbiology Ecology* 2010;74(2):430-8.
49. Manganelli M, Scardala S, Stefanelli M, Vichi S, Mattei D, Bogialli S, Ceccarelli P, Corradetti E, Petrucci I, Gemma S, Testai E, Funari E. Health risk evaluation associated to *Planktothrix rubescens*: an integrated approach to design tailored monitoring programs for human exposure to cyanotoxins. *Water Research* 2010;44(5):1297-306.

3.2. METODI FLUORIMETRICI *IN SITU*, PIGMENTI ALGALI MARCATORI E *REMOTE SENSING*

Giuseppe Morabito (a), Mariano Bresciani (b), Andrea Lami (a)

(a) *Istituto per lo Studio degli Ecosistemi, Consiglio Nazionale delle Ricerche, Pallanza*

(b) *Istituto per il Rilevamento Elettromagnetico dell'Ambiente, Consiglio Nazionale delle Ricerche, Milano*

3.2.1. Considerazioni generali

I metodi presentati nel capitolo sono da intendersi come metodi per il monitoraggio delle fioriture di cianobatteri in tempi rapidi e su larga scala spaziale. Danno una quantificazione della biomassa algale in generale e cianobatterica in particolare, in termini di clorofilla e/o pigmenti algali, con gradi diversi di definizione tassonomica, dalla classe all'ordine, secondo il metodo impiegato.

Attraverso queste metodologie di indagine, basate sull'analisi di pigmenti marcatori specifici, è possibile analizzare in modo preciso la distribuzione verticale dei cianobatteri all'interno della colonna d'acqua, individuando gli strati nei quali sono localizzati i diversi taxa, che sfruttano in modo differente i gradienti luminosi e le proprietà ottiche del corpo d'acqua, come spiegato alla sez. 1.1.

La possibilità di effettuare un monitoraggio in tempi rapidi e con un elevato dettaglio spaziotemporale, permette di ottenere informazioni precise sulla distribuzione dei cianobatteri, risultato impossibile da ottenere con le procedure analitiche che prevedono il prelievo di campioni discreti e l'analisi microscopica dei preparati. Quindi, attraverso l'applicazione di questi metodi di indagine, diventa più semplice programmare un monitoraggio con frequenza più adeguata a seguire l'evoluzione di una fioritura cianobatterica, venendo incontro ad alcune delle esigenze citate nella sez. 1.4.

3.2.1.1. Fluorimetria *in situ*

La nascita di una tecnica di determinazione quantitativa dei popolamenti algali, attraverso la fluorimetria *in vivo* (IVF), risale agli anni '60 (1-3). Il principio del metodo si basa sull'analisi dello spettro di fluorescenza emesso da alcuni pigmenti accessori del complesso antenna periferico del PS II, dopo averli sottoposti ad eccitazione per mezzo di una luce di lunghezza d'onda compresa tra 400 e 650 nm.

Durante le ultime due decadi è progressivamente migliorata la possibilità di differenziare distinte popolazioni algali, caratterizzate da corredo pigmentario diverso e, quindi, da spettri di fluorescenza diversi (4). Oltre alla fluorescenza emessa dalle clorofille (a, b, c), il metodo utilizza l'emissione delle ficobiline (ficocianine e ficoeritrine), permettendo di distinguere Chlorophyta, cianobatteri (con ficobiline e con ficoeritrine), Chrysophyta (diatomee, crisoficee) e Cryptophyta. La misura restituisce un dato in termini di clorofilla totale e relativa alle quattro classi differenti.

La stima della concentrazione di clorofilla, associata a ogni gruppo spettrale (algale), si ottiene dal confronto delle intensità relative tra lo spettro modello di riferimento e quello ottenuto dalla misura *in situ*.

Il limite minimo di rivelabilità è fissato attorno a 20 ng/L (corrispondenti a 20 ppb), anche se tale valore può essere raggiunto soltanto sotto condizioni eccezionalmente favorevoli. Questo valore limite dipende dal segnale di fondo dello spettrometro, dal segnale causato dalla dispersione dell'acqua e della materia disciolta, ma anche dalla morfologia della singola cellula fitoplanctonica e dal grado di difformità composizionale tra il popolamento effettivamente analizzato e la coltura impiegata per la calibrazione (5).

Rispetto ad un monitoraggio condotto con metodi tradizionali, la fluorimetria *in vivo* offre il vantaggio di permettere l'acquisizione di risultati in tempo reale, su larga scala spaziale e con elevata frequenza temporale, a costi relativamente contenuti. Inoltre, permette di seguire l'evoluzione temporale delle fioriture e di analizzare la distribuzione verticale fine dei popolamenti algali. Alcuni problemi di carattere metodologico si presentano nella possibilità di discriminare in modo efficace i cianobatteri. Infatti, i fluorimetri più semplici, generalmente dotati di fonti di emissione che permettono di distinguere ficocianina (eccitazione intorno a 600 nm) e clorofilla-a, non sono in grado di rilevare in modo sufficientemente affidabile i cianobatteri con ficoeritrine (es. *Planktothrix* spp.). Con gli strumenti più sofisticati, che possiedono fino a sei LED per l'eccitazione dei pigmenti, è possibile distinguere tra cianobatteri con ficocianina e con ficoeritrina (eccitazione intorno a 570 o 630 nm, a seconda della strumentazione), sebbene, in quest'ultimo caso, la presenza delle Cryptophyta, anch'esse dotate di ficoeritrina, possa confondere l'interpretazione del segnale. Il problema può essere risolto se il fluorimetro permette di inserire, tra i parametri di misura, un *fingerprint* specifico per la fluorescenza dei cianobatteri con ficoeritrina (6).

In Figura 1 e 2 sono riportati due esempi di applicazione della fluorimetria *in situ* per lo studio della distribuzione dei cianobatteri in un lago profondo (Lago Maggiore).

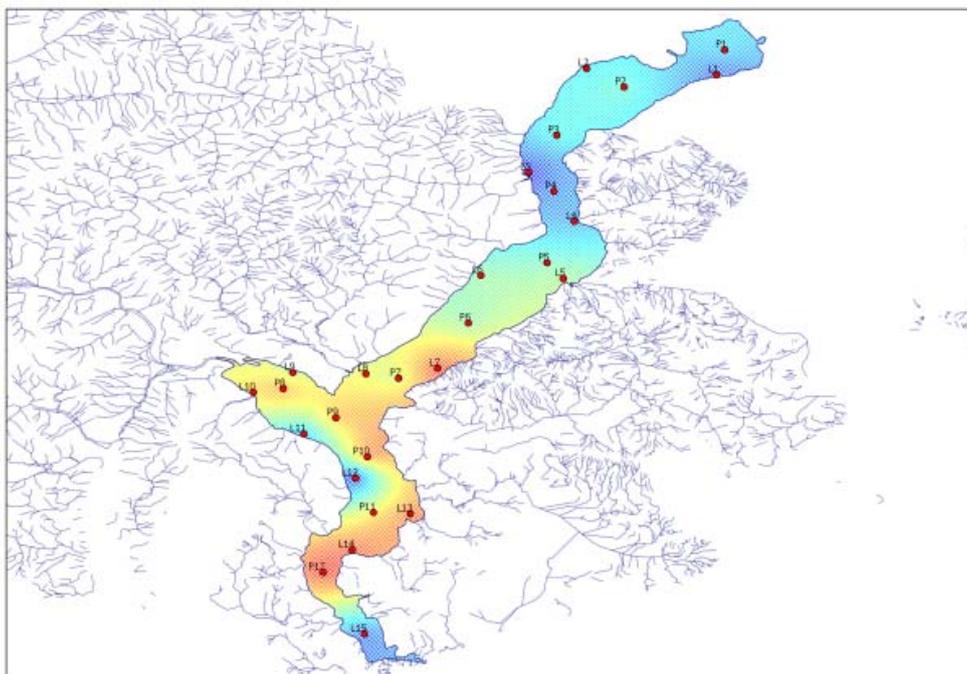


Figura 1. Distribuzione della clorofilla attribuibile alle criptofitee/cianobatteri nello strato superficiale (scala 0,5-6 µg/L)

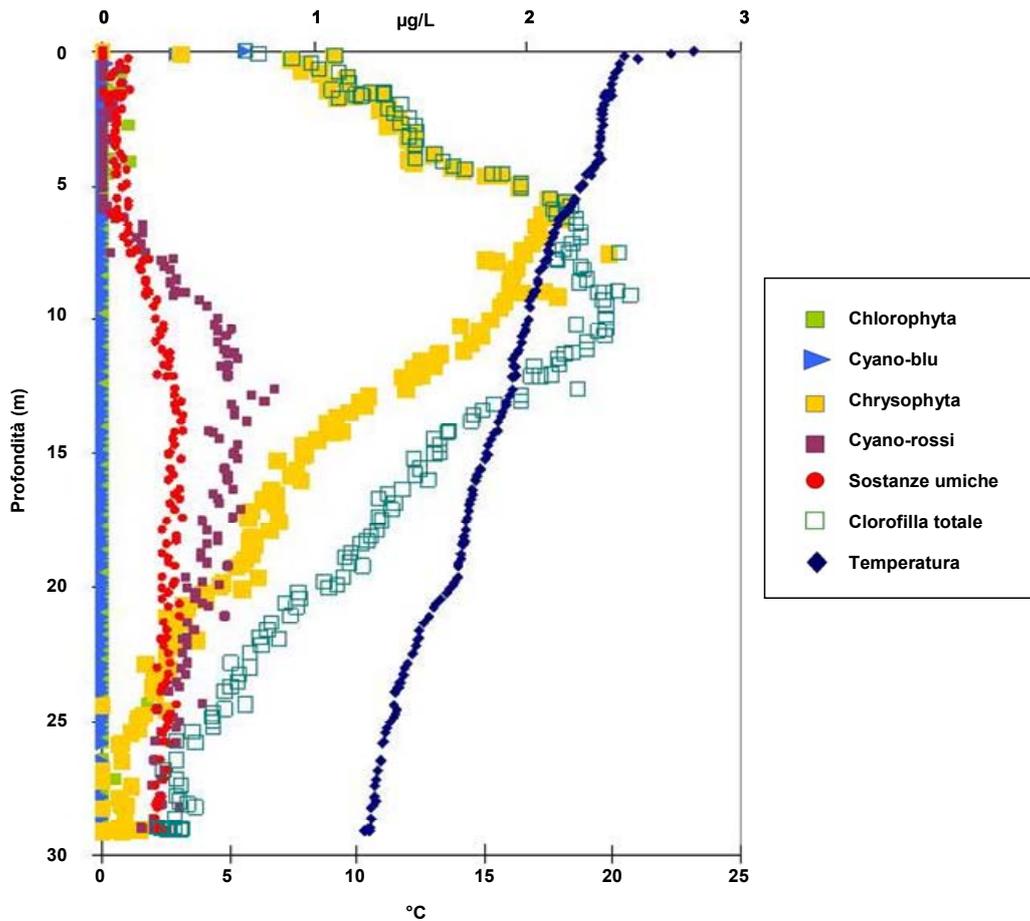


Figura 2. Distribuzione verticale di temperatura, sostanze umiche e classi algali rilevate con fluorimetria *in situ*

3.2.2. Telerilevamento per la determinazione dei cianobatteri

Il telerilevamento è un approccio integrato multidisciplinare che permette di acquisire a distanza informazioni dettagliate sulle caratteristiche qualitative e quantitative di superfici o parti di territorio. L'acquisizione dei dati avviene attraverso speciali sensori (radiometri) che montati a bordo di piattaforme satellitari o aeree registrano le informazioni trasportate dall'energia elettromagnetica emessa, riflessa o diffusa dai corpi osservati. I vantaggi del telerilevamento sono la visione sinottica di vaste porzioni di territorio con osservazioni frequenti e continue nel tempo e la ripresa multispettrale che permette di estendere la visione a colori dell'uomo ad altre lunghezze d'onda dello spettro elettromagnetico.

A partire dagli anni '80 le tecniche di telerilevamento satellitare sono diventate un efficace strumento d'integrazione delle abituali metodologie limnologiche nell'analisi delle dinamiche temporali e spaziali di alcuni parametri di qualità delle acque (7). In particolare, grazie al lancio dei satelliti di nuova generazione, di elevate prestazioni radiometriche (es. aumentata numerosità delle bande spettrali) le ricerche si sono orientate anche alle applicazioni per la

determinazione dei cianobatteri. Queste si basano sulle caratteristiche di assorbimento della luce visibile dei pigmenti fotosintetici (ficobiliproteine) tipici dei cianobatteri.

Pigmenti come la ficocianina e la ficoeritrina producono caratteristici picchi di assorbimento/riflessione della radiazione elettromagnetica emergente dalla colonna d'acqua e possono essere rilevati dai sensori satellitari. Nel dettaglio i cianobatteri mostrano un picco di assorbimento attorno ai 650 nm (8) e un flesso compreso tra i 627 e i 635 nm (9).

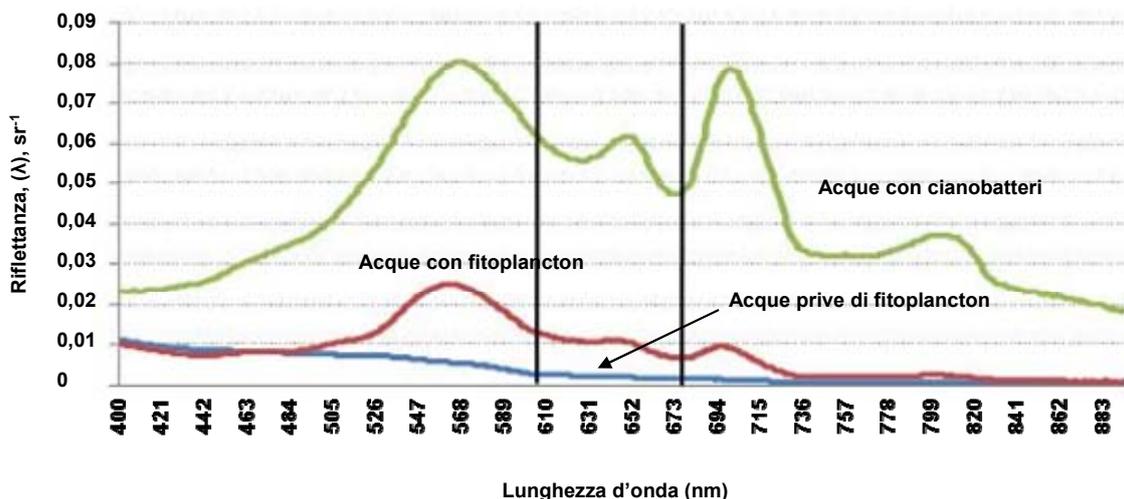


Figura 3. Presenza dei cianobatteri altera profondamente la risposta spettrale delle acque, in particolare nella regione compresa tra i 600 e 650 nm

Per lo studio delle proprietà di assorbimento/riflessione della luce ad opera dei cianobatteri diviene fondamentale l'utilizzo di spettroradiometri di campo che permettono uno studio non influenzato dai fattori di disturbo che contaminano invece i dati telerilevati (es. atmosfera). Oltre a permettere la definizione accurata delle bande di assorbimento, la relazione tra le misure radiometriche e le misure di concentrazioni dei pigmenti fotosintetici caratteristici permette di ricavare algoritmi semi-empirici che essendo basati su rapporti di banda dei valori di riflettanza possono essere applicati alle immagini satellitari permettendo di ottenere mappe quantitative delle concentrazioni di cianobatteri presenti nello strato eufotico della colonna d'acqua. Le misure di campo con spettroradiometri seguono precisi protocolli di misura internazionali (10) e contemplano misure che considerino la componente angolare della radiazione elettromagnetica incidente e misure di radiazione riflessa e diffusa. Le caratteristiche di buoyancy dei cianobatteri obbligano inoltre ad effettuare le misure radiometriche in differenti momenti della giornata e a diverse profondità, soprattutto nei casi di specie più sensibili a elevate intensità di radiazione elettromagnetica poiché queste possono trovarsi a differenti metri sotto l'interfaccia aria-acqua. Questi dati sono quindi di fondamentale importanza nell'interpretare il dato osservato da satellite che rappresenta un'integrazione del segnale proveniente dai primi metri della colonna d'acqua.

Gli esempi di lavori di ricerca dedicati alla mappatura dei cianobatteri nello strato eufotico della colonna d'acqua sono sempre più numerosi e affrontati con differenti tipologie di sensori (11). Gli algoritmi di elaborazione delle immagini sono tipicamente basati su rapporti di bande nella regione del rosso (lunghezze comprese tra i 600 e i 650 nm) oppure tra rosso e vicino

infrarosso (650 e 750 nm) nel caso di fioriture intense. Altri approcci prevedono l'utilizzo della modellistica bio-ottica con dati concernenti le proprietà ottiche inerenti (IOP) e apparenti (AOP) delle acque.

In presenza d'intense fioriture di cianobatteri (concentrazioni di chl-a superiori ai 20 mg/m³) con anche eventuale produzione di schiuma si possono utilizzare la maggior parte dei sensori (MERIS, MODIS, LANDSAT, SeaWifs) a disposizione per una mappatura qualitativa e per una vasta copertura dell'ecosistema considerato. Nel caso di una presenza meno massiccia, è necessario utilizzare sensori che abbiano la capacità di isolare e discriminare la regione dello spettro elettromagnetico in cui si ha la risposta caratteristica ed esclusiva dei cianobatteri. Tra questi è necessario precisare che alcuni sensori dotati di bande spettrali strette non hanno limitazioni d'utilizzo, come i sensori iperspettrali aerotrasportati (es. MIVIS, AISA, AVIRIS, CASI) o satellitari (Hyperion e in futuro PRISMA dell'ASI). L'utilizzo d'immagini iperspettrali aerotrasportate deve in particolare prevedere un corretto piano di volo, che comprenda l'orario (sole allo zenith), la quota (non bisogna esagerare con la risoluzione spaziale, poiché dati con pixel troppo risoluto hanno scarso segnale ed elevato rumore), la geometria di volo (il sole deve essere posteriore alla direzione di volo).

3.2.2.1. Identificazione dei cianobatteri attraverso l'analisi dei pigmenti marcatori separati con HPLC

I pigmenti sono presenti in tutti gli organismi fotosintetici poiché la loro funzione primaria è quella della raccolta di luce per la fotosintesi accanto a quella di fotoprotezione (12). La determinazione del contenuto in clorofilla nella colonna d'acqua dei corpi idrici è stata ampiamente utilizzata per stimare la biomassa del fitoplancton e la produttività nelle acque naturali. I suoi prodotti di degradazione (clorofillide, feofitina e feoforbide) sono stati usati come indicatori diagnostici dello stato fisiologico del fitoplancton e dei processi di "grazing" (13-16). Inoltre, i carotenoidi sono stati utilizzati come bio-marcatori per la loro specificità tassonomica (17) e quindi per rappresentare tutta la comunità foto trofica. In generale l'analisi dei pigmenti algali è stata ampiamente utilizzata per determinare la struttura della comunità fitoplanctonica in campioni di acqua come supplemento o alternativa al conteggio microscopico (18). Infine i pigmenti conservati nei sedimenti sono stati impiegati per indagare l'evoluzione nel passato dei livelli di produzione e di composizione della comunità foto trofica (19, 20).

La determinazione dei pigmenti algali prevede che il campione venga prelevato e filtrato (tipicamente su filtri GF/C o GF/F), i filtri vengano conservati congelati a basse temperature e quindi estratti con un solvente organico. La scelta della procedura di estrazione dipende da diversi fattori tra cui le caratteristiche della matrice rispetto alla facilità di estrazione dei pigmenti, e le proprietà e le quantità relative dei pigmenti presenti (21, 22). I principali problemi connessi con l'estrazione si riferiscono a prevenire la segmentazione delle lunghe catene di legami coniugati carbonio-carbonio doppi, che sono i cromofori che assorbono la luce della maggior parte dei pigmenti. Gli elettroni debolmente legati di queste catene possono essere rimossi da elementi molto elettronegativi, come l'ossigeno, rompendo così la coniugazione, impedendo ai pigmenti di assorbire la luce nelle lunghezze d'onda visibili. Inoltre, tutti i pigmenti sono instabili verso luce, calore, acidi e perossidi e la stabilità varia tra i diversi composti. Ad esempio tra i carotenoidi, la fucoxantina e la peridinina sono labili in condizioni alcaline deboli.

Dal 1980, le analisi HPLC sono diventati il metodo prioritario per una rapida determinazione quantitativa dei carotenoidi, delle clorofille e dei suoi derivati presenti negli ecosistemi acquatici (17, 18, 22, 23). Numerose sono quindi le revisioni bibliografiche dedicate all'analisi dei pigmenti algali basate sull'HPLC e a queste si rimanda per un approfondimento per le

informazioni tecniche concernenti la scelta del sistema di analisi, le prestazioni e le limitazioni del metodo (17, 24-26). In questo contesto ci si limiterà a presentare alcuni principi generali e aspetti più critici che devono essere tenuti presenti per una determinazione affidabile dei carotenoidi. Per l'analisi dei pigmenti algali viene più frequentemente scelta la tecnica della cromatografia in fase inversa liquida ad alta pressione (RP-HPLC; 25, 27). Il principio della separazione cromatografica è semplice; miscele di pigmenti introdotti a una colonna di piccole particelle vengono separate in base alla loro differente affinità con il materiale contenuto nella colonna cromatografica (fase stazionaria) e il flusso di solvente si muove attraverso la colonna stessa (fase mobile). In RP-HPLC, il materiale di riempimento è costituito da particelle di 5µm, rivestite da un composto non polare, monomero o polimero (es. C8, C18). In genere si utilizzano due fasi mobili (indicate come A e B) che vengono spinte dalla pompa attraverso la colonna con un gradiente da una all'altra in modo da diminuire progressivamente la polarità della fase mobile nel corso dell'analisi. I solventi tipicamente usati come fase mobile sono metanolo, acetone, acqua e acetonitrile, con l'aggiunta spesso di piccole quantità di reagenti detti ion-pairing. La separazione dell'estratto avviene quindi in funzione della relativa affinità dei singoli pigmenti per la fase stazionaria non polare e la loro solubilità nella fase mobile. I pigmenti polari sono più fortemente attratti da solventi polari rispetto alle particelle non polari della colonna, passano attraverso la colonna HPLC più rapidamente e sono i primi composti ad essere rilevati. Al contrario, i pigmenti non polari vengono attratti più fortemente dal materiale della colonna non polare e non saranno nuovamente disciolti nella fase mobile fino a quando la polarità della fase mobile non è diminuita. I composti vengono quindi rilasciati dalla fase stazionaria e portati verso il rivelatore in sequenza decrescente di polarità. È tuttavia necessaria un'opportuna verifica con standard per confermare l'identità e il comportamento cromatografico dei pigmenti, non è sufficiente basarsi esclusivamente sulla posizione cromatografica e semplici caratteristiche spettrali per l'identificazione del pigmento.

I criteri e le linee guida per la scelta della strumentazione che compone un HPLC sono discussi in diversi lavori (24, 26, 28) a cui si rimanda per un approfondimento. Il sistema minimo che garantisca una sufficiente capacità analitica è nella maggior parte dei casi composto da un autocampionatore, una pompa ad alta pressione (> 20 kPa), una colonna ad alta risoluzione, un rivelatore in linea spettrofotometrico a serie di diodi che copra il campo spettrale tra 300 e 800 nm. Alcuni componenti supplementari possono includere un rivelatore a fluorescenza, rilevatori di radioattività o di spettrometria di massa-selettivi in funzione dell'applicazione e della disponibilità di fondi.

3.2.2.2. Stima delle concentrazioni limite di clorofilla-a per crescenti livelli di allerta

Le metodiche descritte forniscono la concentrazione della clorofilla totale o della clorofilla riferibile ai cianobatteri o dei pigmenti marcatori per i cianobatteri. Quindi, i valori soglia per la valutazione del rischio devono, necessariamente, fare riferimento alla concentrazione della clorofilla e non alla densità dei cianobatteri o alla concentrazione di tossine.

Il valore di riferimento proposto dalla *World Health Organization* (WHO), di 1,0 µg/L di microcistina-LR, corrisponde ad una densità di popolazione di 5000 cell/mL, assumendo un contenuto cellulare di tossina di 0,2 pg/cell. Secondo alcuni autori (29), tale concentrazione di tossina intracellulare corrisponde ad una concentrazione media in clorofilla cianobatterica di 1,0 µg/L, misurata con fluorimetria *in situ*. Questa indicazione è, in generale, in accordo con quanto riportato (30) per colture di *Microcystis*, relativamente al contenuto in clorofilla, sebbene il contenuto in tossina possa essere più alto in coltura. È dimostrato (30, 31) che esiste una correlazione positiva tra i contenuti intracellulari di tossina e clorofilla, quindi è ragionevole

proporre delle soglie di allerta per valori crescenti di clorofilla, poichè dovrebbe aumentare, in corrispondenza, anche la tossicità del popolamento algale.

In condizioni di dominanza da cianobatteri (a partire da 20.000 cell/mL), la WHO indica in 10 µg/L di clorofilla totale il valore limite per un rischio basso di esposizione, tra 10 e 50 µg/L il valore per un rischio moderato e sopra 50 µg/L la concentrazione per un rischio elevato (32). A questi valori di concentrazione di clorofilla dovrebbero corrispondere concentrazioni di microcistina comprese tra 2-4 µg/L (fino ad un massimo di 10), tra 10-20 µg/L (fino ad un massimo di 50) e superiori ad 1 mg/L, rispettivamente (33). Questi limiti possono essere applicati sia all'interpretazione delle immagini da satellite che all'analisi dei pigmenti marcatori in HPLC, che permettono di quantificare l'importanza dei cianobatteri all'interno del popolamento algale, pur non fornendo una stima diretta, in termini di clorofilla-a, del loro contributo alla popolazione fitoplanctonica totale.

Con la fluorimetria *in situ* è possibile, invece, ottenere un dato di clorofilla direttamente riferibile alla popolazione cianobatterica: con questa informazione si possono individuare soglie di allerta più precise, a partire dal rapporto tra tossine e clorofilla nelle cellule cianobatteriche.

Alcuni autori (29) indicano un rapporto intracellulare microcistine/clorofilla in popolazioni naturali di *Microcystis* di circa 0,2 prendendo come riferimento il valore di sicurezza di 1,0 µg/L di microcistina, questo significa, in termini di concentrazione di clorofilla cianobatterica, un valore di 5 µg/L. Tale valore rappresenta, nel sistema *Alert Level Framework* (34), il livello di allarme 1. Il livello di vigilanza viene fissato fino a 2000 cell/mL, equivalenti a 0,4 µg/L di microcistina e, per i rapporti sopra riportati, a 2 µg/L di clorofilla cianobatterica. Il livello di allarme 2 è fissato, infine, a 50 µg/L di clorofilla, equivalenti a 50000 cell/mL e 10 µg/L di tossina.

Per quanto riguarda *Planktothrix rubescens*, questa specie potrebbe avere livelli intracellulari di microcistina più elevati rispetto a *Microcystis* (33). Questo sembra confermato da alcuni autori (32), che riportano, per *Planktothrix* spp., rapporti microcistina/clorofilla-a circa doppi rispetto a quelli osservati in *Microcystis* spp. Sulla base di queste osservazioni, il livello di vigilanza, in caso di dominanza di *Planktothrix* andrebbe fissato a 1 µg/L, il livello di allarme 1 a 2,5 µg/L, il livello di allarme 3 a 25 µg/L.

I valori limite proposti per i due generi di cianobatteri, possono essere presi come riferimento nella fluorimetria *in situ*, assumendo *Microcystis* come rappresentativa dei cianobatteri con ficocianine e *Planktothrix* come modello per quelli con ficoeritrine e riferendosi alla clorofilla cianobatterica misurata.

Bibliografia

1. Yentsch CS, Menzel DW. A method for the determination of phytoplankton chlorophyll and phaeophytin by fluorescence. *Deep-Sea Research* 1963;10(3):221-231.
2. Holm-Hansen O, Lorenzen CJ, Holms RW, Strickland JO. Fluorometric determination of chlorophyll. *ICES Journal of Marine Science* 1965;30(1):3-15.
3. Lorenzen MJ. A method for the continuous measurement of in vivo chlorophyll concentration. *Deep Sea Research* 1966;13(2):223-227.
4. Beutler M, Wiltshire KH, Meyer B, Moldaenke C, Lüring C, Meyerhöfer M, Hansen UP, Dau H. A fluorometric method for the differentiation of algal populations *in vivo* and *in situ*. *Photosynthesis Research* 2002;72(1):39-53.
5. Beutler M. *Entwicklung eines Verfahrens zur quantitativen Bestimmung von Algengruppen mit Hilfe computergestützter Auswertung spektralaufgelöster Fluoreszenzanregungsspektren. Diplomarbeit.* Kiel: Univ. Kiel; 1998.

6. Leboulanger C, Dorigo U, Jacquet S, Le Berre B, Paolini G, Humbert JF. Application of a submersible spectrofluorometer for rapid monitoring of freshwater cyanobacterial blooms: a case study. *Aquatic Microbial Ecology* 2002;30:83-89.
7. Lindell T, Pierson D, Premazzi G, Zilioli E. *Manual for monitoring European lakes using remote sensing techniques*. Luxembourg: Office for Official Publications of the European Communities; 1999 (EUR Report n. 18665 EN).
8. Gons HJ. Optical teledetection of chlorophyll a in turbid inland waters. *Environmental Science & Technology* 1999;33(7):1127-32.
9. Gons HJ, Hakvoort H, Peters SWM, Simis SGH. Optical detection of cyanobacterial blooms. In: Huisman J, Matthijs H, Visser P (Ed.). *Harmful cyanobacteria*. Dordrecht: Springer; 2005. p. 177-99.
10. Fargion GS, Mueller JL. *Ocean optics protocols for satellite ocean color sensor validation, Vol. Revision 2*. Greenbelt, Maryland: National Aeronautical and Space Administration, Goddard Space Flight Center; 2000.
11. Kutser T. Passive optical remote sensing of cyanobacteria and other intense phytoplankton blooms in coastal and inland waters. *International Journal of Remote Sensing* 2009;30: 4401-25.
12. Porra RJ, Pfundel EE, Engel N. Metabolism and function of photosynthetic pigments In: Jeffrey SW, Mantoura RFC, Wright SW (Ed.). *Phytoplankton pigments in oceanography: guidelines to modern methods Monographs on oceanographic methodology*. Paris: UNESCO Publishing; 1997. p. 85-126.
13. Lorenzen CJ. Determination of chlorophyll and pheo-pigments: spectrophotometric equations. *Limnology and Oceanography* 1967;12:343-6.
14. Shuman FR, Lorenzen CJ. Quantitative degradation of chlorophyll by a marine herbivore. *Limnology and Oceanography* 1975;20:580-6.
15. Gieskes WWC, Kraay GW, Tijssen SB. Chlorophylls and their degradation products in the deep pigment maximum layer of the tropical North Atlantic. *Netherland Journal of Sea Research* 1978;12:195-204.
16. Jeffrey S, Hallegraeff G. Chlorophyllase distribution in ten classes of phytoplankton: a problem for chlorophyll analysis. *Marine Ecology Progress Series* 1987;35:293-304.
17. Jeffrey SW. Chlorophyll and carotenoid extinction coefficients. In: Jeffrey SW, Mantoura RFC, Wright SW, editors. *Phytoplankton Pigments in Oceanography*. Paris: UNESCO Publishing; 1997. p. 595-6.
18. Millie DM, Paerl HW, Hurley GP. Microalgal pigment assessments using high-performance liquid chromatography: a synopsis of organismal and ecological applications. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 1993;50:2513-27.
19. Leavitt PR, Hodgson DA. Sedimentary pigments. In: Smol JP, Birks HJB, Last WM (Ed.). *Tracking environmental change using lake sediments volume 3: terrestrial, algal, and siliceous indicators*. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers; 2001. p. 295-325.
20. Guilizzoni P, Lami A. Paleolimnology: use of algal pigments as indicators. In: Bitton G (Ed.). *Encyclopedia of environmental microbiology*. Chichester, UK: Wiley J. and Sons; 2001. p. 2306-17.
21. Jeffrey SW, Humphrey GF. New spectrophotometric equations for determining chlorophylls a, b, c1 and c2 in higher plants, algae and natural phytoplankton. *Biochimie und Physiologie der Pflanzen* 1975; 167:191-4.
22. Wright SW, Jeffrey SW, Mantoura RFC, Llewellyn CA, Bjørnland T, Repeta D, Welschmeyer N. Improved HPLC method for the analysis of chlorophylls and carotenoids from marine phytoplankton. *Marine Ecology Progress Series* 1991;77:183-96.

23. Mantoura RFC, Llewellyn CA. The rapid determination of algal chlorophyll and carotenoid pigments and their breakdown products in natural waters by reverse-phase high-performance liquid chromatography. *Analytical Chimica Acta* 1983; 151:297-314.
24. Kost HP. Plant pigments. Vol. I Fat-soluble pigments. In: Sweig G, Sherma J (Ed.). *Handbook of chromatography*. Boca Ratón: CRC Press; 1988.
25. Pfander H, Riesen R. High-performance liquid chromatography. In: Britton G, Liaaen-Jensen S, Pfander H (Ed.). *Carotenoids Vol 1A Isolation and Analysis*. Boston: Birkhäuser; 1995. p. 145-90.
26. Jeffrey SW, Mantoura RFC, Wright SW (Ed.). *Phytoplankton pigments in oceanography*. Paris: UNESCO Publishing; 1997.
27. Jeffrey SW, Wright SW, Zapata M. Recent advances in HPLC pigment analysis of phytoplankton. *Marine Freshwater Research* 1999;50:879-96.
28. Wright SW, Jeffrey SW, Mantoura RFC. Evaluation of methods and solvents for pigment extraction. In: Jeffrey SW, Mantoura RFC, Wright SW (Ed.). *Phytoplankton pigments in oceanography*. Paris: UNESCO Publishing; 1997. p. 261-82.
29. Izydorczyk K, Carpentier C, Mrówczyński J, Wagenvoort A, Jurczak T, Tarczynska M. Establishment of an Alert Level Framework for cyanobacteria in drinking water resources by using the Algae Online Analyser for monitoring cyanobacterial chlorophyll a. *Water Research* 2009;43(4):989-96.
30. Lyck S. Simultaneous changes in cell quotas of microcystin, chlorophyll a, protein and carbohydrate during different growth phases of a batch culture experiment with *Microcystis aeruginosa*. *Journal of Plankton Research* 2004;26(7):727-36.
31. Vezie C, Briant L, Sivonen K, Bertru G, Lefeuvre JC, Salkinoja-Salonen M. Variation of microcystin content of cyanobacterial blooms and isolated strains in Lake Grand-Lieu (France). *Microbial Ecology* 1998;35:126-35.
32. Chorus I, Bartram J (Ed.). *Toxic cyanobacteria in water: a guide to their public health consequences, monitoring and management*. London: E & FN Spon; 1999.
33. Codd GA, Morrison LF, Metcalf JS. Cyanobacterial toxins: risk management for health protection. *Toxicology and Applied Pharmacology* 2005;203(3):264-72.
34. House J, Ho L, Newcombe G, Burch M. *Management strategies for toxic blue-green algae: Literature Survey*. A report for the CRC for Water Quality and Treatment Project 2.0.2.4.1.2; Boca Ratón: CRC Press; 2004.

3.3. METODI DI SCREENING E CONFERMA PER LA DETERMINAZIONE DI CIANOTOSSINE

Sara Bogialli (a), Luca Lucentini (b)

(a) Dipartimento Di Scienze Chimiche, Università degli Studi di Padova, Padova

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

3.3.1. Campionamento per la ricerca di tossine algali

Le cianotossine presenti in un corpo idrico sono principalmente contenute all'interno delle cellule produttrici (tossine intracellulari); tuttavia elevate concentrazioni di tossine possono essere rilasciate in acqua soprattutto a seguito di senescenza e lisi cellulare (tossine extracellulari o libere).

Il rischio associato alla presenza di cianotossine nelle acque da destinarsi e destinate al consumo umano può essere notevolmente ridotto mediante rimozione o filtrazione delle biomasse algali presenti nelle acque (vedi sez. 4.2). Tuttavia, gli stessi trattamenti utilizzati per la rimozione delle cellule come anche l'utilizzo di trattamenti con agenti ossidanti responsabili di lisi cellulare, potrebbero aumentare il rilascio degli agenti tossici in forma libera all'interno del corpo idrico. La scelta della determinazione del contenuto totale, intracellulare o extracellulare di tossine è principalmente da relazionare ad esigenze specifiche di valutazione del rischio, ad es. per la valutazione dell'esposizione o dell'efficienza dei trattamenti di potabilizzazione. Nell'adottare principi cautelativi per la salvaguardia della salute umana, soprattutto se in concomitanza di intense fioriture algali, è consigliabile comunque determinare la frazione totale di tossine eventualmente presenti sia nelle acque da destinare sia in acque destinate al consumo umano.

Per le analisi di screening e/o conferma, la conservazione dei campioni deve essere effettuata coerentemente alle esigenze di determinazione della frazione totale (intracellulare + extracellulare) e/o libera (extracellulare) di tossine.

Come contenitori per il prelievo sono indicate bottiglie di polietilene o vetro scuro lavate con acqua ultrapura esente da tracce degli analiti (vedi Appendice A). I campioni devono essere conservati al buio e alla temperatura di 1-10°C per prevenire la degradazione degli analiti dovuta all'azione di luce e agenti microbiologici. In queste condizioni la conservazione è limitata ad un tempo massimo di 24 h; per periodi di conservazione più lunghi sarà necessario il congelamento dei campioni.

- *Analisi del contenuto totale di tossine*
conservare i campioni in bottiglie di polietilene o vetro e sottoporli ad almeno un ciclo di congelamento e scongelamento per favorire la lisi cellulare. In caso di necessità di filtrazione, possono essere utilizzati filtri a fascia nera.
- *Analisi del contenuto extracellulare di tossine*
conservare i campioni in bottiglie di polietilene o vetro al buio e alla temperatura di 1-10°C per un tempo massimo di 24 h. In caso di necessità di filtrazione, la porosità dei filtri non deve essere superiore ai 0,45 µm al fine di trattenere le cellule algali.

3.3.2. Metodi di screening

Nella gestione del rischio, è utile disporre di metodologie di analisi di screening per individuare precocemente la presenza di cianotossine e la tipologia della classe prodotta. I metodi di screening sono metodi biologici, immunologici e biochimici qualitativi e/o semiquantitativi che non necessitano di standard analitici esterni. Le metodiche di screening devono garantire una sensibilità adeguata al livello tossicologico di interesse, semplicità nell'esecuzione e la possibilità di analizzare velocemente e a basso costo un gran numero di campioni. In genere sono in grado di identificare la classe di tossine, ma non specificatamente il singolo composto.

Per i metodi di screening valgono le stesse considerazioni fatte sulla valutazione del rischio associato al contenuto totale o extracellulare di tossine. Il campione di acqua deve essere conservato e pretrattato concordemente con le esigenze dettate dall'analisi di tossine totali o libere.

Una selezione di metodi di screening è riportata in Allegato.

3.3.2.1. Saggi biologici *in vivo*

Il saggio su topo (*Mouse BioAssay*, MBA) è stato in passato il saggio *in vivo* maggiormente utilizzato per la determinazione della tossicità di campioni contenenti cianotossine.

Il MBA è un test economico in grado di fornire informazioni sulla tossicità totale del campione nel giro di poche ore, compresa la classe tossicologica a cui la tossina appartiene, es. epatotossina, neurotossina (1, 2). Gli svantaggi legati al MBA comprendono la poca sensibilità la mancanza di selettività e non per ultimo problemi di carattere etico legati all'utilizzo di animali da laboratorio. Nel corso degli ultimi anni sono stati sviluppati altri metodi biologici basati sull'utilizzo di crostacei tradizionalmente utilizzati nei saggi ecotossicologici quali *Daphnia* spp. *Moina* spp. e *Thamnocephalus platyurus* tra quelli dulciacquicoli (3-5) e *Artemia salina* tra quelli marini (6, 7). Questi saggi, a risposta rapida (24 ore) e di facile esecuzione presentano però le stesse limitazioni del MBA e in più non sono in grado di discriminare tra le classi di tossine, perché la tossicità viene espressa solo in termini di EC₅₀.

3.3.2.2. Metodi immunologici

Il metodo immuno-enzimatico ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*), consente la determinazione di cianotossine nelle acque da destinare e destinate al consumo umano, incluse le acque di sorgente, le acque di piscina e quelle utilizzate per la produzione di acque per dialisi, secondo le definizioni riportate nelle normative vigenti. Oggi sono disponibili sul mercato kit ELISA per l'analisi di microcistine (MC) e cilindrospermopsina (CYN).

Per le MC, sono disponibili kit in grado di determinare concentrazioni comprese tra 0,1-5,0 µg/L di MC-LR, mentre per la CYN il range di concentrazione è 0,04-2,0 µg/L. Concentrazioni superiori di analiti possono essere dosate previa diluizione del campione; molti protocolli di analisi sono stati validati sul campione di acqua tal quale. L'affidabilità e la sensibilità di un test ELISA dipendono essenzialmente dal tipo di anticorpo utilizzato e dalla sua capacità di legarsi ai composti target. La scelta del test ELISA più idoneo dipende dalla esigenza di determinare un composto specifico (anticorpi monoclonali) o di essere efficace come screening per una classe di sostanze (anticorpi policlonali).

Il test policlonale più diffuso per la determinazione di MC, impiega anticorpi specifici capaci di riconoscere e legarsi all'ADDA, l'amminoacido caratteristico della classe delle MC e delle

nodularine (NOD) e non è quindi in grado di discriminare tra i diversi congeneri. I risultati sono espressi come equivalenti di MC-LR e la quantità totale di MC presente nel campione è determinata per interpolazione su curva di taratura. L'analisi qualitativa e quantitativa si basa su una reazione colorimetrica tra un reagente e la perossidasi legata alla MC-LR. Questi test rispondono a tutti i composti contenenti l'ADDA, compresi possibili prodotti di degradazione o coniugazione. Per questo motivo, insieme all'impossibilità di conoscere a priori la reattività specifica di congeneri diversi dalla MC-LR, questi test sono considerati semi-quantitativi e non risultano utili per una valutazione del rischio relativa al diverso potenziale tossicologico delle varianti di MC.

Considerazioni simili possono essere fatte sui test ELISA policlonali per CYN, con i quali è stato riscontrata una sovrastima anche di un ordine di grandezza rispetto ai metodi chimici (8, 9) in presenza di *Aphanizomenon sp.* In questo caso, sono state ipotizzate reazioni di *cross-reaction* con isomeri o congeneri della CYN.

I test per MC che utilizzano anticorpi monoclonali si basano sulla competizione indiretta tra un complesso proteico della MC (es. un coniugato con la siero-albumina bovina – *Bovine Serum Albumin*: MC-LR-BSA) che funziona da antigene, e quello contenuto nel campione.

Entrambe le tipologie di ELISA si basano sulla rivelazione spettrofotometrica, quindi il campione sottoposto ad analisi, deve essere privo di qualsiasi composto endogeno o reagente in grado di interferire con la risposta colorimetrica.

Nei kit ELISA più diffusi per la determinazione di MC, ai livelli prossimi ai rispettivi limiti di rivelazione, sono stati stimati falsi positivi in misura variabile dal 6 al 17% (10).

Recentemente sono stati descritti metodi di analisi basati sulla realizzazione di recettori sintetici in grado di reagire con la MC-LR. Questi *Molecularly Imprinted Polimers* (MIP) sono molto sensibili (limite di rivelazione 0,1 µg/L) ma mostrano scarsa reattività verso gli altri congeneri di MC (11). Sono stati utilizzati anche come materiali per estrazione.

3.3.2.3. Metodi biochimici

Le MC e le NOD sono potenti inibitori naturali delle fosfatasi proteiche (serina/treonina) PP1 e PP2A (12). Sono disponibili test di inibizione della attività enzimatica relativamente sensibili per la determinazione delle cianotossine. È possibile utilizzare sia la PP1 sia la PP2A, con differenti prestazioni in termini di sensibilità (13, 14), ma comunque adeguate ai limiti WHO senza necessità di pre-trattamento del campione.

La quantificazione della inibizione può essere fatta con tecniche spettrofotometriche diverse (range di risposta 0,1-2,5 µg/L) o radiometriche, più sensibili (15).

Analogamente ai test immunologici, quelli di inibizione enzimatica non sono selettivi nei confronti dei vari congeneri di MC, tuttavia la risposta è proporzionale alla tossicità totale del campione, quindi possono essere utilizzati per valutare il potenziale rischio tossicologico associato a questi composti.

3.3.3. Metodi di conferma per la determinazione di cianotossine

I metodi di conferma sono basati sulla determinazione di proprietà chimico-fisiche quali peso molecolare, presenza di gruppi cromofori o funzionali in grado di dare reazioni specifiche. Una selezione di metodi di conferma è riportata in Allegato, dove sono riportate le caratteristiche di prestazione e le stime dei costi e degli investimenti di capitale necessari.

I metodi chimico-fisici di conferma, se sufficientemente selettivi, possono permettere la contemporanea analisi di MC, CYN e anatoossina-a (ANA-a) e composti di degradazione e/o strutturalmente analoghi di interesse tossicologico, come la omo-anatoossina, la diidro- ed epossio- anatoossina (16) e deossicilindrospermopsina.

Nelle analisi di cianotossine in acqua da destinare e destinata al consumo umano, è consigliabile stimare sia la quantità intracellulare di tossine, sia la frazione disciolta in acqua, soprattutto per la corretta gestione dei trattamenti di potabilizzazione.

Nei casi in cui si disponga di strumentazione di elevata sensibilità e selettività, i protocolli di analisi che prevedono l'iniezione diretta del campione al sistema di rivelazione sono da preferire perché riducono al minimo le possibilità di alterazione del campione e di propagazione dell'errore (17, 18). Tuttavia, in questi casi, è necessario tenere in debita considerazione l'influenza che il campione acquoso può avere sull'accuratezza e l'affidabilità del metodo, con particolare riferimento a "effetti matrice", riproducibilità e robustezza del metodo.

Nelle analisi di cianotossine con metodi chimici tuttavia, il pretrattamento, l'estrazione e la pre-concentrazione del campione sono spesso necessari sia per raggiungere una sensibilità adeguata, sia per effettuare una contemporanea purificazione dai composti organici e inorganici presenti nell'acqua.

È consigliabile fare ricorso a protocolli che prevedano l'utilizzo di uno standard di processo o standard interno, al fine di garantire l'affidabilità dell'analisi e compensare eventuali errori in fase di preparazione del campione. Lo standard di processo dovrebbe essere virtualmente assente nel campione da analizzare e strutturalmente simile agli analiti da determinare. Si consiglia l'uso, quando disponibili, di isotopi o composti analoghi. Per l'analisi di MC, la NOD può essere impiegata come standard di processo, previo accertamento della sua assenza nei campioni da analizzare.

La disponibilità commerciale di standard analitici certificati rimane un anello debole della determinazione chimica di cianotossine. Attualmente sono disponibili circa 12 varianti di MC su circa 80 conosciute, 8 di saxitossine, anatoossina e due di CYN.

3.3.3.1. Preparazione del campione per la determinazione di cianotossine

Conservazione e pre-trattamento

Il campione di acqua deve essere conservato secondo quanto previsto per l'analisi del contenuto extracellulare o totale di tossine.

Nel caso di campioni di acque sottoposte a processo di potabilizzazione, l'eccesso di ossidante, in genere cloro libero, può alterare l'esito dell'analisi. La rimozione del cloro residuo può essere ottenuta per trattamento con una soluzione di sodio tiosolfato.

Se il protocollo prevede l'uso di uno standard di processo, questo deve essere aggiunto in seguito al trattamento con antiossidante.

Spesso le procedure prevedono che il pH del campione di acqua sia reso acido o basico a seconda del tipo di interazioni presenti tra analiti e fase stazionaria utilizzata nella preparazione del campione.

Nel caso in cui si debba procedere alla filtrazione, differenti tipi di filtri devono essere impiegati per la determinazione del contenuto extracellulare o totale di cianotossine. Nel primo caso devono essere impiegati filtri di porosità non superiore a 0,45 µm, per trattenere le cellule algali. Nel caso di analisi del contenuto totale, se necessario il campione può essere filtrato con filtri a fascia nera.

Estrazione e purificazione

Le tecniche di estrazione e pre-concentrazione più diffuse si basano sulla estrazione in fase solida (*Solid Phase Extraction*, SPE), tramite l'uso di una cartucce riempite con diverse fasi stazionarie (19). I materiali più utilizzati sono C-18 (20, 23) materiali polimerici in divinilbenzene-polisterene, anche funzionalizzati con gruppi polari (HLB), (24, 26) e Carbon Black Grafitizzati (GCB) (18, 27). È stata proposta anche l'estrazione contemporanea di MC e ANA-a mediante cromatografia a coppia ionica (28). Sono state utilizzate anche cartucce costituite da immunosorbenti anti-MC-LR (29) e da MIP (30).

Al contrario, per l'estrazione di composti polari come CYN e ANA-a, compresi composti analoghi (es. omo-anatossina) e prodotti di degradazione, sono state impiegate fasi stazionarie polari, come gli scambiatori ionici (31, 32). Un'alternativa alle cartucce per SPE che risulta in genere più veloce, prevede l'uso di dischi per estrazione costituiti da fasi stazionarie analoghe; queste procedure sono state usate efficacemente anche per l'estrazione contemporanea di MC e ANA-a (33).

Con questa tecnica il campione pretrattato e filtrato, è trasferito direttamente su cartuccia. I volumi solitamente campionati variano a seconda dei limiti di rivelazione che si vogliono raggiungere e del sistema di rivelazione impiegato. In genere il range di volumi è compreso tra 0,1 L e 1 L.

Gli analiti sono estratti dalla cartuccia in genere dopo uno step di lavaggio per eliminare composti della matrice potenzialmente interferenti. Le più comuni fasi organiche utilizzate per l'estrazione di MC sono costituite da metanolo, acetonitrile, soluzioni di diclorometano-metanolo addizionate di diversi modificanti (18), acidi (34) o basici.

Per la ri-eluzione di CYN e ANA-a l'acqua, generalmente acidificata, è il solvente più frequentemente utilizzato insieme a miscele acqua/metanolo (35, 37).

Per matrici acquose, l'estrazione tramite SPE risulta in genere efficace anche come step di purificazione. Tuttavia, la eventuale presenza di composti endogeni in grado di interferire con la determinazione finale, dipende sostanzialmente dal sistema di rivelazione a disposizione. Nel caso di rivelatori poco selettivi, può essere necessario un secondo passaggio su cartucce SPE che dovrebbero essere costituite da materiali diversi rispetto a quelli utilizzati in fase di estrazione. In genere lo schema applicabile all'analisi di MC, prevede l'uso di materiali idrofobici nell'estrazione e idrofilici in fase di purificazione, per esempio florisil o silice.

La soluzione estratta dalla cartuccia SPE è in genere sottoposta a ulteriore concentrazione per mezzo di evaporazione in bagni termostatici a temperature $\leq 50^{\circ}\text{C}$. Il residuo viene ricostituito, filtrato nel caso in cui la torbidità lo renda necessario e un'aliquota viene iniettata nel sistema di rivelazione.

In letteratura sono disponibili metodi di analisi del contenuto intracellulare, extracellulare o totale (somma di intracellulare ed extracellulare) di tossine. Le metodiche disponibili per la determinazione del contenuto extracellulare di cianotossine prevedono quasi invariabilmente la filtrazione del campione con filtri non superiori a $0,45\ \mu\text{m}$. L'analisi del contenuto intracellulare va effettuata estraendo i composti target dal residuo di filtrazione. Queste procedure però sono in genere meno affidabili e più irripetibili. Alternativamente è possibile determinare il contenuto totale di tossine e per differenza quello intracellulare, in seguito a lisi cellulare, ottenuta per mezzo di sonicazione e/o cicli di congelamento-scongelo. Questa opzione è preferibile alla prima perché le prestazioni dei metodi per la determinazione di contenuto extracellulare e totale sono confrontabili, in quanto è possibile utilizzare lo stesso protocollo di analisi a meno del pretrattamento del campione. In Figura 1 è riportato un diagramma schematico di preparazione del campione per l'analisi di cianotossine in acqua, mentre in Appendice A è riportato il metodo analitico per la determinazione di MC per la determinazione di MC in acque da destinare e destinate al consumo umano.

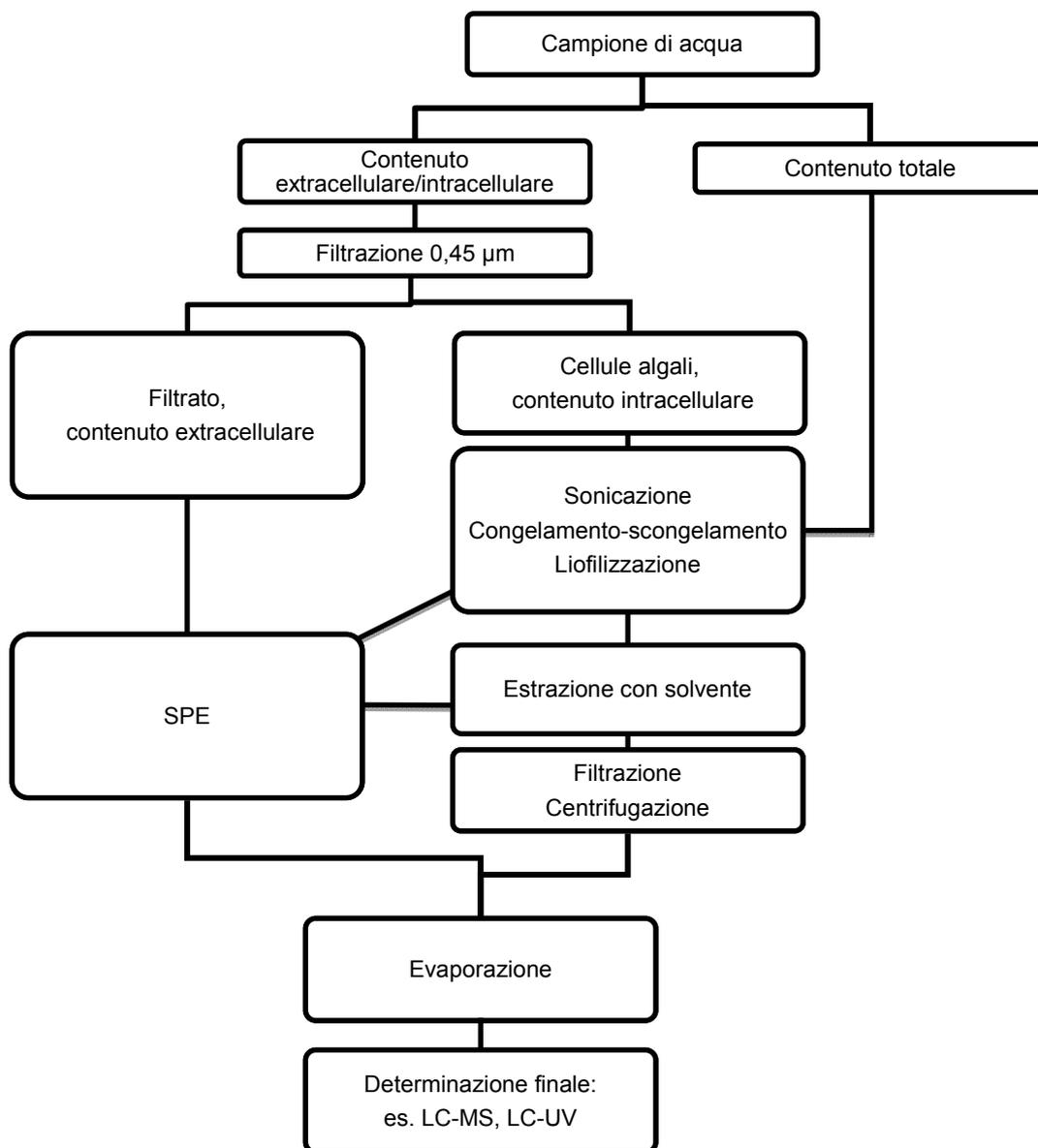


Figura 1. Diagramma schematico di procedure di preparazione del campione per analisi di conferma di cianotossine in acqua

Sistemi di rivelazione

La cromatografia liquida ad alta prestazione (HPLC) accoppiata a rivelatori spettrofotometrici, amperometrici o mass spettrometrici è il sistema di elezione per la determinazione chimica delle cianotossine. Recentemente sono stati sviluppati metodi di analisi basati sulla Ultra Performance Liquid Chromatography (UPLC) che aumentando il potere

risolutivo e il numero di piatti teorici riduce significativamente i tempi di determinazione (20, 38). Sono necessari gli standard analitici delle singole tossine per l'analisi qualitativa e quantitativa, basata sul confronto con i tempi di ritenzione e i segnali del rivelatore.

Le condizioni cromatografiche più utilizzate prevedono l'impiego di C-18 come fase stazionaria e acqua, metanolo e acetonitrile come fasi mobili. Per la separazione di cianotossine idrofiliche, come l'ANA-a, è possibile anche l'utilizzo di colonne polari (39), tipo HILIC (*Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography*). Agenti acidi sono quasi sempre utilizzati per favorire la separazione cromatografica e, soprattutto, l'incremento del segnale quando si usa come rivelatore lo spettrometro di massa in modalità di ionizzazione positiva. In questo caso può essere usato acido formico in concentrazione variabile da 1 a 20 mM (12, 13, 40, 41), mentre per la rivelazione UV si preferisce ricorrere all'acido trifluoroacetico (TFA) (42) perché assicura un rumore di fondo più basso nella regione di lunghezze d'onda tipica delle MC (220-240 nm), della ANA-a (227 nm) e della CYN (260 nm).

La rivelazione con UV ha trovato molte applicazioni, ma è necessario disporre di un rivelatore a fotodiodi (DAD) per garantire la selettività necessaria (15, 16, 26, 34, 43), soprattutto per l'identificazione delle singole varianti di MC (15, 26, 34). L'uso del rivelatore fluorimetrico (FLD) permette di raggiungere elevate sensibilità e selettività, con limiti di rivelazione dell'ordine dei ng/L, ma l'analisi prevede un processo di derivatizzazione (32).

Tuttavia, per una identificazione inequivocabile delle singole varianti di cianotossine, si deve ricorrere all'uso della spettrometria di massa (MS). Trappole ioniche tridimensionali e lineari (LIT), spettrometri a singolo e soprattutto a triplo quadrupolo (LC-MS/MS) (15, 17, 18, 23, 44, 45), sono i rivelatori più indicati per un'analisi affidabile, sensibile e specifica di cianotossine. L'elevata selettività assicura una probabilità molto bassa della presenza di segnali dovuti a composti interferenti, tuttavia in alcuni casi è necessario comunque prestare attenzione a criticità cromatografiche e mass-spettrometriche, come nel caso della possibile erronea identificazione di ANA-a in luogo dell'aminoacido fenilalanina (17, 27, 46, cfr. Appendice A).

Informazioni utili sulla presenza di MC possono essere desunte dalla presenza di un frammento ionico a m/z 135, caratteristico della classe e derivante dalla rottura del frammento amminoacidico ADDA. La presenza di più siti basici può dar luogo a ioni molecolari multicarica, come nel caso delle MC della serie RR, che contengono due residui di arginina. È importante quindi considerare come intervallo di scansione, anche in fase di ottimizzazione delle condizioni strumentali, sia quello degli ioni monocarica, corrispondenti ai pesi molecolari, sia quello degli ioni bicarica, con m/z 400-700 (18, 19).

Recentemente, la spettrometria di massa ad alta risoluzione, mediante rivelatori a quadrupolo-tempo di volo (q-ToF) (33), *Matrix Assisted Laser Desorption Ionization*-ToF (MALDI-ToF) (47, 48) od Orbitrap™ (49, 51) ha fornito molte informazioni utili sulla identificazione di nuove varianti di MC e/o prodotti di degradazione (vedi sez. 4.3). L'analisi qualitativa è molto veloce perché il rivelatore è così specifico che spesso è possibile eliminare la fase di preparazione del campione e può quindi essere utilizzata come screening avanzato per la presenza di cianotossine. Per l'analisi quantitativa però è necessario disporre comunque degli standard analitici.

3.3.4. Conclusioni

I metodi biologici e chimico-fisici forniscono informazioni diverse e spesso complementari. La scelta o l'uso combinato di metodi di screening e di conferma è dettata anche da esigenze tecniche relative alla disponibilità nel singolo laboratorio sia della strumentazione analitica sia delle competenze necessarie. Nella valutazione del rischio correlato, è necessario spesso trovare

un compromesso tra sensibilità e specificità dei metodi analitici a disposizione e tenere infine in debita considerazione la scelta tra analisi della frazione libera o totale di tossine.

Tecniche di screening altamente sensibili anche se poco selettive per la determinazione del contenuto totale di cianotossine ad esempio, possono dare indicazioni sovrastimate sulla concentrazione di tossici presenti. Il metodo immunologico ELISA è quello indicato come più idoneo per le analisi di screening di MC e CYN perché è sufficientemente sensibile e capace di determinare, anche se con capacità di responso differente, diverse varianti di cianotossine. Questo approccio produce un responso veloce e molto cautelativo dal punto di vista della protezione della salute dell'uomo, e può essere utilizzato come azione di primo livello. Dati più accurati e valutazioni più raffinate devono essere ottenuti con tecniche analitiche o combinazioni di tecniche più complesse (10).

L'identificazione e la quantificazione delle diverse varianti di cianotossine sono l'ultimo stadio del processo di valutazione del rischio, ed è significativo soprattutto in seguito alla disponibilità di studi di tossicità specifici relativi alle singole varianti di tossine.

Le analisi di conferma devono essere capaci di determinare le diverse varianti delle classi di cianotossine, quindi i metodi più indicati prevedono l'utilizzo della spettrofotometria con DAD o spettrometria di massa e massa tandem accoppiato a metodi di separazione cromatografica. Queste stesse tecniche combinate di conferma sono consigliate per le analisi di anatoxine, non essendo disponibili metodi di screening affidabili.

Bibliografia

1. 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: a guide to their public health consequences, monitoring, and management*. London: E & FN Spon; 1999. p. 155-78.
2. Seawright AA, Nolan CC, Shaw GR, Chiswell RK, Norris RL, Moore MR, Smith MJ. The oral toxicity for mice of the tropical cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska). *Environmental Toxicology* 1999;14:135-42.
3. Haney JF, Sasner JJ, Ikawa M. Effects of products released by *Aphanizomenon flos-aquae* and purified saxitoxin on the movements of *Daphnia carinata* feeding appendages. *Limnology and Oceanography* 1995;40:263-72.
4. Törökné A, Vasdinnyei R, Asztalos BM. A rapid microbiotest for the detection of cyanobacterial toxins. *Environmental Toxicology* 2007;22:64-8.
5. Ferrão-Filho AS, Soares MC, de Magalhães VF, Azevedo SM. A rapid bioassay for detecting saxitoxins using a *Daphnia* acute toxicity test. *Environmental Pollution* 2010;158:2084-93.
6. Kiviranta J, Sivonen K, Niemala SI. Detection of toxicity of Cyanobacteria by the *Artemia salina* bioassay. *Environmental Toxicology Water Quality* 1991;6:423-36.
7. Lindsay J, Metcalf JS, Codd GA. Protection against the toxicity of microcystin-LR and cylindrospermopsin in *Artemia salina* and *Daphnia* spp. by pre-treatment with cyanobacterial lipopolysaccharide (LPS). *Toxicon* 2006;48:995-1001.
8. Yilmaz M, Philips, EJ, Szabo NJ, Badylak S. A comparative study of Florida strains of *Cylindrospermopsis* and *Aphanizomenon* for cylindrospermopsin production. *Toxicon* 2008;51:130-9.
9. Bláhová L, Oravec M, Maršálek B, Šejnohová L, Šimek Z, Bláha L. The first occurrence of the cyanobacterial alkaloid toxin cylindrospermopsin in the Czech Republic as determined by immunochemical and LC/MS methods. *Toxicon* 2009;53:519-24.

10. Triantis T, Tsimeli K, Kaloudis T, Thanassoulis N, Lytras E, Hiskia A. Development of an integrated laboratory system for the monitoring of cyanotoxins in surface and drinking waters. *Toxicon* 2010;55:979-89.
11. Chianella I, Lotierzo M, Piletsky SA, Tothill IE, Chen B, Karim K, Turner APF. Rational Design of a polymer specific for microcystin- LR using a computational approach. *Analytical Chemistry* 2002;74:1288-93.
12. Matsushima R, Yoshizawa S, Watanabe M, Harada KF, Furusawa M, Carmichael WW, Fujiki H. In vitro and in vivo effects of protein phosphatase inhibitors, microcystins and nodularin, on mouse skin and fibroblasts. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1990;171:867-74.
13. Honkanen RE., Codispoti BA., Tse K., Boynton AL. Characterization of natural toxins with inhibitory activity against serine/threonine protein phosphatases. *Toxicon* 1994;32:339-50.
14. Heresztyn T, Nicholson BC. Determination of cyanobacterial hepatotoxins directly in water using a protein phosphatase inhibition assay. *Water Research* 2001;35:3049-56.
15. McElhiney J, Lawton LA. Detection of the cyanobacterial hepatotoxins microcystins. *Toxicology and Applied Pharmacology* 2005;203:219-30.
16. James KJ, Furey A, Sherlock IR, Stack MA, Twohig M, Caudwell FB, Skulberg OM. Sensitive determination of anatoxin-a, homoanatoxin-a and their degradation products by liquid chromatography with fluorimetric detection. *Journal of Chromatography A* 1998;798:147-57.
17. 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. *Journal of Chromatography A* 2006;1122:180-85.
18. 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. *Environmental Science & Technology* 2006;40:2917-23.
19. Pérez S, Aga DS. Recent advances in the sample preparation, liquid chromatography tandem mass spectrometric analysis and environmental fate of microcystins in water. *TRAC- Trends in Analytical Chemistry*. 2005;24:658-70.
20. Meriluoto J, Lawton L, Harada KI. Isolation and detection of microcystins and nodularins, cyanobacterial peptide hepatotoxins. In: Holster O (Ed.). *Methods in molecular biology*. New Jersey: Humana Press Inc; 2000. p. 65-87.
21. Hummert C, Reichelt M, Weiss J, Liebert HP, Luckas B. Identification of microcystins in cyanobacteria from the Bleiloch former drinking-water reservoir (Thuringia, Germany). *Chemosphere* 2001;44:1581-8.
22. Zhang L, Ping X, Yang Z. Determination of microcystin-LR in surface water using high-performance liquid chromatography/tandem electrospray ionization mass detector. *Talanta* 2004;62:191-8.
23. Harada KI, Nakano T, Fujii K, Shirai M. Comprehensive analysis system using liquid chromatography-mass spectrometry for the biosynthetic study of peptides produced by cyanobacteria. *Journal of Chromatography A* 2004;1033:107-13.
24. ISO 20179. *Water quality – Determination of Microcystins – Method using Solid Phase Extraction (SPE) and High Performance Liquid Chromatography (HPLC) with Ultraviolet (UV) detection*. Geneva: International Organization for Standardization; 2005.
25. Wang J, Pang X, Ge F, Ma Z. An ultra-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry method for determination of microcystins occurrence in surface water in Zhejiang Province, China. *Toxicon* 2007;49:1120-8.

26. Rapala J, Erkomaa K, Kukkonen J, Lahti K. Detection of microcystins with protein phosphatase inhibition assay, high-performance liquid chromatography–UV detection and enzyme-linked immunosorbent assay, comparison of methods. *Analytica Chimica Acta* 2002;466:213-31.
27. Dimitrakopoulos IK, Kaloudis TS, Hiskia AE, Thomaidis NS, Koupparis MA. Development of a fast and selective method for the sensitive determination of anatoxin-a in lake waters using liquid chromatography–tandem mass spectrometry and phenylalanine-d5 as internal standard. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 2010;397:2245-52.
28. Pietsch J, Fichtner S, Imhof L, Schmidt W, Brauch HJ. Simultaneous determination of cyanobacterial hepato- and neurotoxins in water samples by ion-pair supported enrichment and HPLC-ESI-MS-MS. *Chromatographia* 2001;5:339-44.
29. Aranda-Rodriguez R, Kubwabo C, Frank MB. Extraction of 15 microcystins and nodularin using immunoaffinity columns. *Toxicon* 2003; 42: 587-99.
30. Chianella I, Piletsky SA, Tothill IE, Chen B, Turner APF. MIP-based solid phase extraction cartridges combined with MIP-based sensors for the detection of microcystin-LR. *Biosens Bioelectron* 2003;18:119-27.
31. 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 Communication in Mass Spectrometry* 2003;17:583-8.
32. James KJ, Furey A, Sherlock IR, Stack MA, Twohig M, Caudwell FB, Skulberg OM. Sensitive determination of anatoxin-a, homoanatoxin-a and their degradation products by liquid chromatography with fluorimetric detection. *Journal of Chromatography A* 1998;798:147-57.
33. Maizels M, Budde ML. A LC/MS Method for the determination of cyanobacteria toxins in water. *Analytical Chemistry* 2004;76:1342-51.
34. Ortea PM, Allis O, Healy BM, Lehane M, Ni Shuilleabhain A, Furey A, James KJ. Determination of toxic cyclic heptapeptides by liquid chromatography with detection using ultra-violet, protein phosphatase assay and tandem mass spectrometry. *Chemosphere* 2004;55:1395-1402.
35. Osswald J, Rellán S, Gago A, Vasconcelos V. Toxicology and detection methods of the alkaloid neurotoxin produced by cyanobacteria, anatoxin-a. *Environment International* 2007;33:1070-89.
36. Poon GK, Griggs LJ, Edwards C, Beattie KA, Codd GA. Liquid chromatography-electrospray ionization-mass spectrometry of cyanobacterial toxins. *Journal of Chromatography A* 1993;628:215-33.
37. Namikoshi M, Murakami T, Watanabe MF, Oda T, Yamada J, Tsujimura S, Nagai H, Oishi S. Simultaneous production of homoanatoxin-a, anatoxin-a, and a new nontoxic 4-hydroxyhomoanatoxin-a by the cyanobacterium *Raphidiopsis mediterranea* Skuja. *Toxicon* 2003;42(5):533-8.
38. Oehrle SA, Southwell B, Westrick J. Detection of various freshwater cyanobacterial toxins using ultra-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Toxicon* 2010;55:965-72.
39. Dell'Aversano C, Eaglesham GK, Quilliam MA. Analysis of cyanobacterial toxins by hydrophilic interaction liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 2004;1028:155-64.
40. Spoof L, Vesterkvist P, Lindholm T, Meriluoto J. Screening for cyanobacterial hepatotoxins microcystins and nodularin in environmental water samples by reversed-phase liquid chromatography–electrospray ionisation mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 2003;1020:101-15.
41. Sjøvall O, Meriluoto J. SOP: analysis of microcystins by liquid chromatography–mass spectrometry. In: Meriluoto J, Codd, GA (Ed.). *TOXIC: Cyanobacterial monitoring and cyanotoxin analysis*. Turku, Finland: Abo Akademi University Press; 2005. p. 105-110.

42. Barco M, Rivera J, Caixach J. Analysis of cyanobacterial hepatotoxins in water samples by microbore reversed-phase liquid chromatography-electrospray ionisation mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 2002;959:103-11.
43. Metcalf JS, Lindsay J, Beattie KA, Birmingham S, Saker ML, Törökné AK, Codd GA. Toxicity of cylindrospermopsin to the brine shrimp *Artemia salina*: comparisons with protein synthesis inhibitors and microcystins. *Toxicol* 2002;40:1115-20.
44. Eaglesham GK, Norris RL, Shaw GR, Smith MJ, Chiswell RK, Davis BC, Neville GR, Seawright AA, Moore MR. Use of HPLC-MS/MS to monitor cylindrospermopsin, a blue-green algal toxin, for public health purposes. *Environmental Toxicology* 1999;14:151-4.
45. Spoo L, Berg KA, Rapala J, Lahti K. First observation of cylindrospermopsin in *Anabaena lapponica* isolated from the boreal environment (Finland). *Environmental Toxicology* 2006;21:552-60.
46. 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. *Journal of Chromatography A* 2005;1082:91-7.
47. Fastner J, Erhard M, Döhren H. Determination of oligopeptide diversity within a natural population of *Microcystis* spp. (cyanobacteria) by typing single colonies by matrix assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *Applied and Environmental Microbiology* 2001;67:5069-76.
48. Welker M, Fastner J, Erhard M, Von Dohren H. Applications of MALDI-TOF MS analysis in cyanotoxin research. *Environmental Toxicology* 2002;17:367-74.
49. Diehnelt CW, Dugan NR, Peterman SM, Budde WL. Identification of microcystin toxins from a strain of *Microcystis Aeruginosa* by liquid chromatography introduction into a hybrid linear ion trap-fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometer. *Analytical Chemistry* 2006;78:501-12.
50. Merel S., Lebot B, Clement M, Seux R, Thomas O. Ms identification of microcystin-LR chlorination by-products. *Chemosphere* 2009;74:832-9.
51. Merel S, Clement M, Mourot A, Fessard V, Thomas O. Characterization of cylindrospermopsin chlorination. *Science of the Total Environment*- 2010;408:3433-42.
52. Falconer IR. Measurement of toxins from blue-green algae in water and foodstuffs. In: Falconer IR (Ed.). *Algal toxins in seafood and drinking water*. London: Academic Press; 1993. p. 165-75.
53. Fischer WJ, Garthwaite I, Miles CO, Ross KM, Aggen JB, Chamberlin AR, Towers NR, Dietrich, R. Congener-independent immunoassay for microcystins and nodularins. *Environmental Science e Technology* 2001;5:4849-56.
54. Zeck A, Weller MG, Bursill D, Niessner R. Generic microcystin immunoassay based on monoclonal antibodies against Adda. *Analyst* 2001;126:2002-7.

Allegato

Esempi di metodi per l'analisi di cianotossine in acque da destinare e destinate al consumo umano

Sistema di rivelazione scelto	LOD µg/L	P	Costo		Commenti	Rif.
			Str*	Per		
Saggi biologici generici						
Mouse bioassay ^S			B/M	M	Responso per classe tossica, non selettivo. Necessità di autorizzazioni, risvolti etici	52
<i>Artemia salina</i> bioassay ^S <i>Daphnia</i> bioassay ^S			B/M	M	Poco sensibile, non selettivo. Disponibili kit commerciali	3-7, 43
Microcistine e nodularine						
ELISA, policlonale ^S	0,6-2,5	-	A	B	Sensibile. Rapido Risposta per tutte le MC espressa in equivalenti di MCLR. Reattività dei congeneri può variare.	10, 15, 53
ELISA, monoclonale ^S	0,1	-	A	B	Molto sensibile. Rapido Risposta per tutte le MC espressa in equivalenti di MCLR. Reattività dei congeneri può variare.	10, 15, 54
Inibizione della protein fosfatasi, radioattivo ^S	0,1	-	M	B	Sensibile. Non selettivo. Richiede attrezzatura speciale	15
Inibizione della protein fosfatasi, spettrofotometrico ^S	0,1-2,5	-	M	B	Sensibile, non selettivo. Necessità di enzimi purificati	10, 15
LC-DAD ^C	0,25	SPE	B/M	M	Selettività in funzione della separazione cromatografica Necessità di standard esterni per quantitativa	10
LC-MS/MS ^C	0,002-0,017	SPE	B/M	A	Alta sensibilità e selettività per le diverse varianti. Necessità di standard esterni per quantitativa	10, 18, 25, 45

segue

continua

Sistema di rivelazione scelto	LOD µg/L	P	Costo		Commenti	Rif.
			Str*	Per		
ANA-a e analoghi strutturali						
LC-DAD ^C	0,05	SPE	B/M	M	Necessità di standard esterni per quantitativa	28
LC-FLD ^C	0,01	SPE	B/M	M	Alta selettività nei confronti di interferenti** Necessità di derivatizzazione Necessità di standard esterni per quantitativa	32
LC-MS/MS ^C	0,008-0,2	- /SP E	B	M/A	Alta sensibilità. Alta selettività nei confronti di interferenti* Necessità di standard esterni per quantitativa	17, 27, 28
					Analisi diretta, rapido	17
Cilindrospermopsina e analoghi strutturali						
ELISA, policlonale ^S	0,04	-	A	B	Sensibile. Possibile risposta per analoghi strutturali o coniugati.	9
LC-MS/MS ^C	0,3	-	B	A	Alta sensibilità e selettività. Analisi diretta, rapido Necessità di standard esterni per quantitativa	18

S metodo di screening; **C** metodo di conferma; **LC** cromatografia liquida; **MS/MS** spettrometria di massa tandem;

DAD Photodiode Array Detector; **FLD** Fluorimetric Detector;

P Preparazione del campione; **SPE** Solid Phase Extraction

Str Strumentazione; **Per** Personale

B basso; **M** medio; **A** alto;

* per costi strumentazione si intende la somma del capitale iniziale e del materiale consumabile necessario

** Caso della fenilalanina

SEZIONE 4
Misure di mitigazione del rischio

4.1. MISURE DI PREVENZIONE: CONTROLLI ALLA CAPTAZIONE E SUI NUTRIENTI

Neil Thomas William Ellwood (a), Pier Paolo Abis (b), Lorenza Meucci (c), Franca Palumbo (d)

(a) *Dipartimento di Scienze Geologiche, Università degli Studi Roma Tre, Roma*

(b) *Acquedotto Pugliese SpA, Bari*

(c) *Società Metropolitana Acque, Torino*

(d) *Laboratori Iren Acqua Gas, Genova*

4.1.1. Aspetti generali

Le strategie di prevenzione risultano essere molto importanti ai fini della gestione complessiva di fenomeni di bloom algale in corpi idrici superficiali. La conoscenza e il controllo dei fattori alla base della genesi dei bloom rivestono, infatti, un ruolo fondamentale nella messa a punto di strategie efficaci per la prevenzione di tali manifestazioni. Dovrebbero quindi essere condotti con costanza programmi di monitoraggio che includano al loro interno la verifica di quegli elementi determinanti nella potenziale insorgenza di fioriture algali. Questi, se utilizzati assieme a modelli che descrivano come i fattori antropici e naturali possono influenzare le fioriture algali, risultano fondamentali nella gestione di fioriture massive in laghi e fiumi. È auspicabile, infatti, una pianificazione strategica che abbia l'obiettivo di prevenire in maniera efficace e sicura i bloom tramite la messa in relazione e la gestione delle connessioni causali con altri sistemi (metereologici, geologici, idrologici). Generalmente, l'ambiente naturale in cui ricadono i bacini di raccolta delle acque è circondato da sistemi agricoli o urbani sviluppati senza che, nel corso degli anni, venga preso in reale considerazione l'impatto potenziale di tali modificazioni territoriali sulla qualità delle acque naturali (1). Fra l'altro la riduzione della connettività dei sistemi di acque naturali comporta il deterioramento della *water quality-resilience* ovvero quella generale capacità dei sistemi idrici interconnessi di mediare eventi singoli di peggioramento della qualità avvenuti in un punto del sistema. Idealmente, le strategie di gestione del territorio dovrebbero essere disegnate in maniera tale da preservare la qualità ambientale originaria in una zona di territorio sufficientemente estesa da permettere eventuali future modificazioni dell'area di alimentazione all'interno della quale ricadono i corpi idrici (1).

Invece, a causa dell'incremento della densità della popolazione umana e della pervasività delle attività agricole e industriali, il carico di nutrienti recapitante in molti corsi d'acqua è aumentato considerevolmente (2). Questo incremento di azoto e fosforo, è il fattore più importante che influenza il fenomeno della eutrofizzazione delle acque naturali (3) inteso come una forte accelerazione dei normali processi naturali di produzione biologica in fiumi, laghi e dighe. L'eutrofizzazione può quindi manifestarsi visivamente tramite vari fenomeni quali tappeti galleggianti di vegetali, aggregazioni di macrofite bentoniche e fioriture algali generiche o di cianobatteriacee (4, 5). Accanto alle strategie per prevenire l'accumulo di nutrienti nei corpi idrici andrebbero inoltre sviluppate metodologie per il management dei corpi idrici mirate a ridurre la concentrazione di azoto e fosforo lungo la colonna d'acqua in maniera da cercare di prevenire la formazione di fioriture algali massive (6).

4.1.2. Sorgenti di nutrienti, eutrofizzazione e gestione

Gli apporti esterni di nutrienti nelle acque superficiali sono di varia origine e, spesso, di tipo diffuso, come quelle derivanti dalla agricoltura o dalle precipitazioni atmosferiche. Esistono anche sorgenti di tipo puntuale quali, ad esempio, quelle provenienti da impianti industriali, sbocchi fognari o da impianti di trattamento di acque reflue di varia natura. Ci sono, però, anche importanti sorgenti interne di nutrienti (*internal loading*) provenienti da sedimenti e acqua ipolimnica. Questi rilasciano, in genere stagionalmente, nutrienti nelle acque definite primarie e vocate alla produzione di acqua per il consumo umano. In ogni caso molte delle strategie di gestione dei corpi idrici generalmente adottate sono spesso limitate a poche o addirittura singole azioni o misure che frequentemente si dimostrano di scarsa utilità in assenza di interventi su larga scala o, almeno, di entità paragonabile con l'estensione dell'area del bacino di presa.

Generalmente il fosforo è considerato il nutriente limitante nelle acque naturali dolci per cui il controllo degli apporti esterni di fosforo costituisce la misura primaria adottata ai fini della prevenzione o della gestione dei fenomeni di eutrofizzazione. La teoria in base alla quale controllare gli apporti di azoto possa da sola limitare l'eutrofizzazione è stata invece sconsigliata (2, 7). Al contrario, per quanto riguarda la riduzione degli apporti di azoto, vi sono evidenze di fenomeni di crescente proliferazione e bloom di cianobatteri azotofissatori successivamente ad attività mirate alla riduzione di azoto nelle acque (7). È stato infatti appurato che la "fissazione" di azoto è sufficiente a promuovere la crescita sfruttando la concentrazione di fosforo disponibile. In ogni caso deve essere posta attenzione sul ruolo dell'azoto anche in quei casi, come per *Microcystis* sp., in cui si verificano bloom di specie potenzialmente tossiche che non appartengono alla classe dei batteri azoto fissatori (8). In conclusione per ridurre l'eutrofizzazione o, comunque, almeno la probabilità di insorgenza di bloom algali, l'obiettivo principale della gestione del corpo idrico deve essere la riduzione dei contenuti di fosforo tenendo però in considerazione anche l'azoto se il problema persiste in relazione a specie che non siano capaci di fissare azoto.

Gli apporti esterni di nutrienti possono essere gestiti o limitati attraverso lavori di bonifica nell'area di *catchment* o attività che includano alcune misure quali la diminuzione dell'utilizzo di fertilizzanti, le restrizioni per l'accesso degli animali da allevamento ai laghi e ai fiumi, l'aumento delle zone di rispetto ripariali, il ripristino delle lagune e foreste nelle zone marginali e miglioramenti nel trattamento delle acque prima del rilascio nell'ambiente (sorgenti puntiformi). Alcune di queste attività possono anche mitigare gli effetti avversi legati al progressivo riscaldamento climatico in atto, poiché questo causa un generale aumento del carico dei nutrienti (9, 10).

L'apporto interno di nutrienti comporta, invece, principalmente lo scambio del fosforo tra i sedimenti e gli strati di acqua sovrastanti ed è una delle fasi principali del ciclo del fosforo (11). Infatti, l'apporto interno calcolato per molti corpi idrici può tranquillamente superare quello legato a fonti esterne di fosforo (12). I sedimenti possono contenere e mantenere al proprio interno grandi quantità di fosforo fino ad arrivare a concentrazioni di diversi ordini di grandezza superiori a quanto rilevabile nelle acque sovrastanti. Inoltre i sedimenti possono di volta in volta agire come "serbatoio" accumulando fosforo al proprio interno o da sorgente rilasciandolo nella colonna d'acqua quando mutano le condizioni al contorno. Questo apporto interno, nelle giuste condizioni ambientali, può stimolare fortemente la crescita di cianobatteri e alghe. È comunemente accettato il concetto che l'apporto interno di fosforo sia principalmente legato alla risospensione del sedimento causato dal moto ondoso, alla bioattività e al rilascio di fosforo dovuto all'instaurarsi, generalmente in estate, di condizioni anossiche all'interfaccia tra sedimento e acqua (13). Comunque, alcuni studi hanno mostrato solo nulle o trascurabili differenze nell'entità dell'*internal loading* tra laghi ossici e anossici. Questo suggerisce che

l'entità del fenomeno dello scambio di fosforo sia funzione della capacità dei sedimenti di sequestrare il fosforo stesso (14).

Considerando la natura ciclica dei fenomeni legati al rilascio di nutrienti dagli strati inferiori, il recupero del lago in termini di progressiva riduzione dei fenomeni di eutrofizzazione, può essere molto differito nel tempo rispetto alla avvenuta riduzione degli apporti di fosforo derivanti da cause esterne. In ogni caso questo va legato alla serie storica specifica di apporti di nutrienti (12). Molti studi hanno infatti mostrato chiaramente che la rimozione di apporti esterni fino a livelli ai quali teoricamente dovrebbe essere visibile un chiaro miglioramento della qualità dell'acqua, non ha invece portato gli effetti desiderati a causa dell'effetto contrapposto legato al rilascio del fosforo dai sedimenti sottostanti (15, 16). In laghi, però, che hanno ricevuto contributi esterni di nutrienti solo per periodi limitati, l'apporto interno sembra avere in genere una scarsa influenza sulle capacità di recupero della situazione (17, 18). Nel caso di laghi con una lunga serie storica di fenomeni eutrofici il recupero è molto più lento e può variare, in alcuni casi, da 10 a 20 anni (19, 20). In situazioni in cui l'apporto esterno sia stato ridotto o quasi annullato ma il fenomeno legato agli apporti interni è ancora molto evidente, potrebbe aver senso rimuovere o coprire lo strato superficiale del sedimento per accelerare il recupero.

Esistono molte tecnologie utilizzabili per effettuare un corretta gestione degli apporti interni sebbene la loro reale applicabilità sia vincolata a fattori dimensionali. Le più comuni pratiche utilizzate sono il trattamento chimico, il dragaggio e l'ossidazione (21), sebbene la reale efficacia delle tecniche di ossidazione, debba ancora essere comprovata e spiegata. Le applicazioni di natura chimica prevedono il trattamento del fosforo con un ligante che lo inattivi. Spesso si tratta di solfato di alluminio (allume), calcare o ferro (21). Tali sostanze sono applicate allo stesso tempo sia come agenti flocculanti per rimuovere il fosforo dalla colonna d'acqua che come agenti per effettuare un *capping* in maniera da isolare i sedimenti e bloccare il rilascio di fosforo dai sedimenti in periodi in cui si verificano fenomeni anossici all'interno degli strati più profondi dell'acqua (22). L'allume è la sostanza inattivante usata più frequentemente a causa del doppio meccanismo di azione. Esso infatti reagisce con il fosforo solubile disciolto all'interno della colonna d'acqua per formare un precipitato insolubile. Allo stesso tempo, tra pH 6 e 8, forma dei fiocchi insolubili di idrossido di alluminio che hanno una grossa capacità di adsorbire grandi quantità di composti inorganici del fosforo (23). Gli effetti dell'aggiunta di allume possono durare fino a circa 15 anni anche se questo dato, e tale pratica, non è necessariamente trasponibile a tutte le situazioni. Infatti in quei laghi caratterizzati da consistenti popolazioni di macrofite o da bassa alcalinità tale strategia non risulta applicabile (24, 25). In quest'ultimo caso una possibilità percorribile sarebbe quella di aggiungere la sostanza chimica capace di inattivare il fosforo in concomitanza con una soluzione tampone (26). È comunque però da sottolineare come le implicazioni ecologiche dell'aggiunta di allume (possibili fenomeni di tossicità per pesci e invertebrati) non siano state pienamente esplorate e, in realtà, non se ne conoscano casi effettivi di utilizzo in larga scala (27, 28).

Approcci alternativi per attuare strategie finalizzate al *capping* in modo da ridurre apporti interni di fosforo in laghi eutrofici includono l'impiego di calcite (29), argille modificate (30) e minerali di ferro (31). Altri prodotti naturali come *allophane* (32) e prodotti a base di zeoliti modificate (26) sono stati testati per le loro proprietà di legare il fosforo. Ci sono anche le opzioni relative alla rimozione del sedimento tramite dragaggio o aspirazione. Inoltre è possibile procedere ad una riduzione dell'accumulo di fosforo nel sedimento tramite la rimozione dell'acqua a livello ipolimnico durante l'estate o la rimozione delle carpe. Il successo di questi metodi varia enormemente da lago a lago ma, in ogni caso, i costi e le implicazioni pratiche risultano proibitivi in grossi invasi o laghi. È comunque generalmente riconosciuto il fatto che queste ultime tecniche siano di scarsa efficacia in casi in cui l'entità degli apporti esterni possa essere ancora ridotta (12).

4.1.3. Modifiche idrodinamiche

Sul fronte delle azioni preventive più eco compatibili, il sistema più attuabile è quello delle manipolazioni idrogeologiche poiché possono ridurre gli effetti legati ad aumenti del tempo di residenza dell'acqua, fattore questo estremamente importante sotto il profilo ambientale e legato alla insorgenza di fioriture algali, all'aumento dei fabbisogni di acqua e al riscaldamento climatico. Queste misure hanno l'effetto di disturbare consistentemente l'habitat dei cianobatteri e il loro sistema di controllo del galleggiamento (33). Tuttavia, la diffusione di aria e la miscelazione meccanica, l'uso del *down-flow*, e i sistemi con ruote a pala possono essere utilizzati solo per piccoli corpi idrici e richiedono continui e significativi apporti energetici per lunghi periodi (34). L'areazione è inoltre una misura interessante ma, utilizzata in maniera intermittente, causa lo sviluppo rapido di bloom algali nel corso dei periodi in cui gli areatori sono spenti (35). Molta attenzione deve essere posta a quelle situazioni in cui l'utilizzo di applicazioni che destratificano la colonna d'acqua trasferisce così i nutrienti dalla zona ipolimnica ricca di nutrienti all'epilimnio. Tali casi potrebbero stimolare la formazione di fioriture (36). Una recente sperimentazione che prevede l'utilizzo di mixer lenti a energia solare che miscelano l'acqua dell'epilimnio su porzioni consistenti del lago (0,3-0,9 km²) ha dimostrato l'esistenza di una via efficace per promuovere la soppressione dei bloom da cianobatteri. Tale approccio si è inoltre dimostrato come sostenibile sia sotto il profilo ecologico che ambientale (27, 28). In ogni caso, prima di mettere in campo piani di prevenzione su larga scala, è sempre preferibile condurre esperimenti pilota che dovrebbero prevedere al loro interno anche valutazioni di impatto ambientale che aiutino a comprendere i potenziali effetti sul biota e sul ciclo dei nutrienti. Questo per effettuare una corretta analisi sulla insorgenza di potenziali conseguenze inattese o non volute. Andrebbe inoltre effettuata una verifica delle necessità energetiche e dei costi da sostenere.

4.1.4. Biocontrollo e biomanipolazione

Le misure di mitigazione o prevenzione di tipo biologico sono molto difficili da gestire e i potenziali errori sono poi, conseguentemente, molto difficili da rimediare. Le attività che prevedono l'impiego di agenti con potenziale potere di biocontrollo spaziano dal parassitismo specifico fino al rilascio extracellulare di prodotti aspecifici che promuovono la lisi cellulare. Una grande varietà di organismi "naturali" è quindi potenzialmente disponibile per il controllo biologico dei cianobatteri. Tra questi vi sono virus, batteri, funghi, actinomiceti e protozoi (37). Questi organismi provocano la lisi delle cellule e dovrebbero essere usati per prevenire la formazione di fioriture massive ed evitare il rilascio di tossine in larga scala nel corso di bloom stabili.

La biomanipolazione richiede invece modifiche della struttura della catena alimentare, che, a causa della sua complessità e fragilità, rende questa una opzione estremamente complessa nell'ottica di raggiungere il desiderato obiettivo di eliminare i cianobatteri. La maggior parte dei casi documentati di biomanipolazione in laghi ha comportato sostanzialmente l'aggiunta o la rimozione di pesci. La rimozione di pesci bentivori e onnivori può influenzare in maniera significativa sia direttamente che indirettamente il livello di *internal loading* dei nutrienti. Molti studi hanno mostrato un incremento di macrofite e una riduzione dei fenomeni di bioperturbazione dei sedimenti a valle della rimozione dei pesci. Questa riduzione nei nutrienti conduce a un ridotto livello di fitoplancton. Gli effetti complessivi della rimozione di pesce sono anche dipendenti dalla profondità del lago e dalle dimensioni relative delle zone pelagiche

e litorali. Gli effetti della rimozione di pesce possono anche portare ad un incremento della popolazione di zooplancton e una conseguente pressione sulla popolazione di fitoplancton (4). Quest'ultimo processo viene, comunque, generalmente considerato meno efficace rispetto all'abbattimento dell'*internal loading* nella riduzione della comunità di cianobatteri (38).

4.1.5. Attività di monitoraggio

I bacini utilizzati ai fini della produzione di acqua potabile dovrebbero essere monitorati con una certa regolarità lungo l'anno in quei casi in cui si siano manifestati fenomeni di bloom da cianobatteri. Questo sarebbe principalmente da applicare in casi di climi caldi e in zone temperate per alcuni corpi idrici popolati da alcune taxa come, per esempio, *Planktothrix*. La ispezione dei siti dovrebbe idealmente comprendere anche i dati meteorologici includendo quelli delle precedenti 24 ore (es. direzione e velocità del vento) e ogni area posta sottovento dovrebbe essere oggetto di una attenta ispezione. Andrebbe verificata la riduzione di visibilità nelle aree litorali, la decolorazione della superficie del lago e l'accumulo di alghe a livello di linea di costa. La frequenza dell'ispezione in sito e dei campionamenti dovrebbero essere incrementati durante lo sviluppo di una popolazione di cianobatteri o quando ci si trovi in presenza di fioriture persistenti. Ai fini della prevenzione l'ispezione *in situ* dovrebbe identificare e censire ogni potenziale sorgente di nutrienti oppure registrare cambi significativi nell'utilizzo del territorio che possano essere di aiuto nella interpretazione dei dati (39).

Le attività di campionamento dovrebbero essere preferibilmente contestuali ad attività ispettive. Per tracciare il trend di sviluppo della popolazione algale si dovrebbero prendere campioni in diversi punti del corpo idrico. Questi punti dovrebbero essere rappresentativi dell'intero corpo idrico (per esempio anche delle parti più profonde), dei punti in cui è più probabile il contatto con esseri umani e animali e in prossimità del punto di captazione dell'acqua. La usuale eterogeneità nella distribuzione spaziale dei bloom algali richiede spesso campionamenti orizzontali e verticali (integrati o discreti) per tener conto di tale mancanza di uniformità.

In alcuni casi le analisi dei campioni dovrebbero, a seconda dei casi e degli obiettivi del monitoraggio, includere: la analisi dei nutrienti (azoto totale e inorganico e fosforo), la identificazione e quantificazione delle alghe (conteggio delle cellule o quantificazione della clorofilla-a), e, in caso di conteggi algali elevati, l'analisi della tossina. In quei casi in cui i campioni vengano prelevati con continuità lungo l'intero arco dell'anno (settimanalmente o quindicinalmente), la possibilità che siano notati cambi significativi nella popolazione di cianobatteri presenti e, di conseguenza, possano essere adottate azioni appropriate, è ovviamente più alta. Recentemente sono state introdotte sonde estremamente utili nella identificazione e quantificazione dei livelli di cianobatteri (così come quelli di clorofilla-a e di altri gruppi di alghe). Tali strumenti, per quanto da utilizzare con attenzione, possono affiancare le misure classiche in quanto sono abbastanza rapidi e possono essere utili per condurre indagini su larga scala consentendo di tracciare i movimenti della massa algale in acqua (3, 39) (*vedi anche sez. 3.2*).

4.1.6. Controllo dei bloom algali

In aggiunta alla comprensione delle cause e della prevenzione delle fioriture da cianobatteri, è anche importante fare dei brevi cenni sulle tecniche di gestione dei bloom una volta che essi siano già in corso. Esistono molte strategie potenziali per mitigare il rischio associato con

fioriture di alghe tossiche. Esse possono essere divise essenzialmente in strategie di tipo fisico e di tipo chimico. Bisogna però tenere in considerazione che tali approcci sono spesso validi per corpi idrici di dimensioni modeste e che le procedure di mitigazione e controllo del rischio sono attività caratterizzate da un orizzonte temporale di breve periodo. In questo senso esse non rimuovono il rischio che il bloom si ripeta e, quindi, esse vanno affiancate alle opportune misure di prevenzione all'interno di un più generale piano di management del corpo idrico. Comunque, soprattutto nel caso di trattamenti di tipo chimico, non esistono certezze sugli effetti ambientali e la maggior parte dei test effettuati sono stati condotti in assenza di tossine. Tutte queste considerazioni sono ancor più vere per quei casi in cui il corpo idrico è destinato a fornire acqua per usi potabili.

4.1.7. Procedure fisiche

Ove praticabile, uno dei sistemi più diffusi tra quelli afferenti a questa tipologia, è quello di prelevare l'acqua ad una profondità scelta strategicamente in base alla distribuzione della massa algale nel corpo idrico. Questo soprattutto in caso di schiume superficiali o fioriture subsuperficiali. Questo metodo è estremamente efficace a patto che le infrastrutture *in situ* siano già progettate per prelevare acqua in punti differenti della colonna d'acqua e consenta quindi di aggirare il problema evitando almeno parzialmente il grosso della massa algale. Se tale opportunità non esiste e, ovviamente, solo in caso di sistemi idrici di dimensioni molto piccole, si potrebbe far ricorso a misure temporanee quali la installazione di linee volanti di prelievo dell'acqua grezza o l'uso di tecniche di *bank-filtration* (40). La scelta di una profondità di prelievo deve tenere in considerazione il movimento diurno (guidato da fattori fisiologici e da cambiamenti passivi della profondità) ma anche la relazione tra accumulo della popolazione di cianobatteri e le condizioni meteorologiche (direzione e velocità del vento). In invasi termicamente mesotrofici, una certa attenzione deve essere posta al manifestarsi di possibili fenomeni di accumuli metalimnici di *Planktothrix rubescens* (es. tra lo strato di acqua calda in superficie e quello più freddo in profondità). Comunque l'uso di risorse e tecnici competenti è un fattore chiave nella identificazione precisa delle specie all'origine del bloom, nella sua localizzazione e nella predizione dei suoi movimenti basati sulla specifica specie e sulle condizioni meteorologiche prevalenti.

In sistemi caratterizzati da una sostanziale abbondanza di acqua e nei quali è presente una fonte consistente di acqua a monte del corpo idrico interessato dalla fioritura, è stato dimostrato come l'aumento della velocità di flusso dell'acqua sia in grado di ridurre l'incidenza o l'entità delle fioriture principalmente a causa dell'abbassamento del tempo di residenza dell'acqua nell'invaso (effetto meccanico sommato all'incremento della diluizione dei nutrienti e delle cellule). Questo effetto è anche legato alla destratificazione della colonna d'acqua (6). L'acqua usata per flussare i sistemi idrici andrebbe valutata preventivamente sotto il profilo dei contenuti di nutrienti. L'effetto legato al loro trasporto nel corpo idrico ricevente richiederebbe quindi una modellizzazione prima della effettiva implementazione di tale misura. Inoltre bisogna prevedere anche un attento monitoraggio a valle del corpo idrico (6).

In qualche caso l'uso di barriere fisiche può risultare utile per prevenire il movimento dei cianobatteri verso il punto di prelievo dell'acqua ove questo sia situato in prossimità della superficie stessa. Queste strutture normalmente funzionano sino a profondità di circa 1 metro e non eliminano completamente la contaminazione. Sono da intendersi quindi come misure temporanee di contenimento e di emergenza.

4.1.8. Procedure chimiche

Il potenziale impatto ambientale conseguente all' utilizzo di sostanze chimiche per contenere i fenomeni di fioritura da alghe tossiche non è stato pienamente investigato ed esiste la concreta possibilità che tale approccio conduca ad effetti indesiderati. Per esempio gli alghicidi comunemente disponibili per prevenire, sopprimere e porre fine a fioriture algali costituiscono comunque un rischio per la salute e possono avere un impatto negativo sull'ecosistema acquatico.

Inoltre gli alghicidi possono causare la lisi cellulare e il conseguente rilascio di tossine nell'acqua. Questo, ovviamente, innalza la percentuale di rischio peggiorando la situazione. Alcuni alghicidi di uso molto comune come il solfato di rame sono tossici per tutta la flora e fauna per cui in molti casi il loro uso non è raccomandabile (41). Studi per caratterizzare il livello e gli effetti degli alghicidi nei confronti della catena alimentare acquatica (che include anche i pesci consumati dalla popolazione umana) non sono mai stati condotti (42, 43). Il rame stesso si può accumulare nei sedimenti in grande quantità e causare tossicità nei confronti degli invertebrati bentonici (44). Inoltre, così come sta accadendo con i batteri nei confronti degli antibiotici, anche i cianobatteri stanno sviluppando una certa resistenza specifica nei confronti del solfato di rame (45). Quindi l'uso di queste sostanze andrebbe considerato come l'ultima risorsa disponibile rispetto a misure più sostenibili. In alternativa, l'uso di alcuni composti di origine naturale quali i sottoprodotti della lavorazione della paglia di orzo, sta mostrando qualche potenzialità in funzione di una certa tossicità selettiva (46). Il *Department of Agriculture* statunitense sta conducendo delle ricerche per sviluppare nuove metodologie di controllo fra cui l'uso di un composto alghicida derivato da una pianta denominata *Lolium perenne* (*ryegrass*) per rimuovere selettivamente le cianofitocoe dalle comunità fitoplanctoniche (1).

Anche l'aggiunta di coagulanti è stata utilizzata per rimuovere le cellule algali e, al contempo, far precipitare il fosforo (esempi comuni sono argilla, allume e ferro cloruro). Ma, ancora una volta, le conseguenze ambientali della coagulazione di cellule di cianobatteri non sono state chiaramente acclarate. C'è, quindi, ancora bisogno di molti studi per valutare l'effettivo impatto della coagulazione sull'abbattimento delle concentrazioni di cellule e delle loro tossine. Inoltre va valutata la risposta di tale tecnica in relazione alle diverse specie di cianobatteri per ogni tipo di coagulante, all'effetto sugli organismi presenti nei sedimenti e alle conseguenze dell'accumulo di materiale organico derivante dalla sedimentazione delle cellule e del coagulante stesso sulle condizioni di ossigenazione dello strato bentonico. Infine non sono chiari i livelli di dosaggio minimi di coagulante necessari (47-49).

La applicazione di strati liquidi sul corpo idrico, proposta e sperimentata di recente, potrebbe contribuire a ridurre la trasmittanza dell'acqua e, quindi, a limitare l'attività fotosintetica e lo sviluppo dei cianobatteri. Questo metodo ha però il difetto di avere effetti indiscriminati sull'intera popolazione algale e in generale sullo stato ecologico del corpo idrico.

4.1.9. Conclusioni

Ai fini di una gestione efficace delle risorse di acqua dolce, in casi in cui si siano manifestati fenomeni anche limitati di fioriture algali da cianofitocoe, è di fondamentale importanza un monitoraggio continuo in maniera tale da poter avere indicazioni tempestive sulla potenziale insorgenza di condizioni che portino nel breve a bloom algali consistenti. Questo può aiutare a guadagnare tempo per la messa in campo di azioni preventive e di mitigazione del rischio.

Idealmente questo richiederebbe anche la comprensione delle specifiche dinamiche che regolano le interazioni tra gli apporti di nutrienti derivanti da differenti utilizzi del territorio e eventuali cambiamenti avvenuti nel corso del tempo. In questo modo si può cercare di capire quali azioni correttive siano eventualmente più percorribili. La strategia di riduzione degli apporti di nutrienti provenienti da sorgenti puntuali esterne dovrebbe essere rinforzata anche grazie all'ausilio della costante opera delle agenzie ambientali. Le attività mirate alla riduzione o cessazione di apporti esterni di nutrienti, in molti casi, distendono i loro effetti solo nel lungo periodo principalmente a causa dell'effetto ciclico legato al contributo significativo dovuto all'*internal loading*. È però anche vero che ogni sforzo teso alla riduzione degli apporti interni sarà comunque vanificato in assenza di riduzioni a carico degli apporti esterni. Quindi entrambe le fonti di nutrienti vanno comunque ridotte contemporaneamente per consentire un più veloce miglioramento della qualità ambientale del sistema eutrofizzato. La riduzione degli apporti interni è una attività costosa o comunque a tratti ancora pionieristica soprattutto per quanto riguarda le potenziali ricadute ambientali ma alcune nuove applicazioni sembrano indicare vie promettenti da sfruttare in futuro. La riduzione dei tempi di residenza dell'acqua (incrementando e agevolando i flussi) potrebbe aiutare nella prevenzione dei fenomeni ma, a causa dell'incremento della popolazione umana, risulta probabilmente come una opzione poco applicabile nel concreto. Data la situazione attuale riguardante le fioriture da alghe tossiche, la mitigazione dei rischi assume quindi una importanza notevole. Le procedure di tipo fisico rappresentano la opzione migliore soprattutto ai fini della salvaguardia dell'ambiente acquatico tuttavia, per essere portate avanti, necessitano di moltissime risorse e richiedono tempistiche elevate e l'allestimento di infrastrutture di un certo rilievo. Le procedure di tipo chimico possono invece avere un certo potenziale legato anche alla rapidità dei risultati ma esiste un bisogno urgente di intensificare gli sforzi per capire quanto siano impattanti per l'ambiente. In ogni caso appare evidente come, in presenza di *bloom* da cianobatteri, le pratiche di gestione della situazione siano potenzialmente molto costose e sostanzialmente applicabili solo in sistemi idrici di dimensioni ridotte. Appare quindi urgente trovare soluzioni praticabili e sostenibili per cercare di diminuire gli apporti di nutrienti e limitare il più possibile il manifestarsi di *bloom* algali.

Bibliografia

1. Lopez CB, Jewett EB, Dortch Q, Walton BT, Hudnell HK. *Scientific assessment of freshwater harmful algal blooms*. Washington, DC: Interagency Working Group on Harmful Algal Blooms, Hypoxia, and Human Health of the Joint Subcommittee on Ocean Science and Technology; 2008.
2. Carpenter SF. Phosphorus control is critical to mitigating eutrophication. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2008;105(32):11039-40.
3. Utkilen H, Fastner J, Jamie Bartram J. Chapter 11. Fieldwork: site inspection and sampling. 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. Disponibile all'indirizzo: http://www.who.int/water_sanitation_health/resourcesquality/toxycyanchap11.pdf; ultima consultazione 20/12/11.
4. Reynolds CS. The ecological basis for the successful biomanipulation of aquatic communities. *Archiv für Hydrobiologie* 1994;139:1-33.
5. Bartram J, Burch M, Falconer IR, Jones G, Kuiper-Goodman T. Situation assessment, planning and management. 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. 179-209.

6. Berger PS, Brooks J, Evens TJ, Gobler CJ, Graham J, Hyde J, Karner D, O'Shea D, Paul V, Paerl H, Pehler M, Rosen BH, Santelmann M, Tester P, Westrick J. Causes, Prevention, and Mitigation Workgroup Report. In: Hudnell HK (Ed.). *Cyanobacterial harmful algal blooms: state of the science and research needs*. New York: Springer; 2008. p. 185-215.
7. Schindler DW, Hecky RE, Findlay, DL, Stainton MP, Parker BR, Paterson MJ, Beaty KG, Lyng M, Kasian SEM. Eutrophication of lakes cannot be controlled by reducing nitrogen input: Results of a 37-year whole-ecosystem experiment. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2008;105:11254-8.
8. Codd GA, Poon GK. Cyanobacterial toxins. In: Rogers LJ, Gallon JR (Ed.). *Biochemistry of the algae and cyanobacteria*. Oxford, England: Clarendon Press; 1988. p. 283-96.
9. Bragazza L, Freeman C, Jones T, Rydin H, Limoens J, Fenner N, Ellis T, Gerdol R, Hájek M, Hájek T, Iacumin P, Kutnar L, Tahvanainen T, Toberman T. Atmospheric nitrogen deposition promotes carbon loss from peat bogs. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2006;103(51):19386-9.
10. Paul VJ. Global warming and cyanobacterial harmful algal blooms. In: Hudnell HK (Ed.). *Cyanobacterial harmful algal blooms: state of the science and research needs*. Triangle Park, NC (USA): Springer; 2007. p. 239-57.
11. Wetzel RG. *Limnology. Lake and river ecosystems*. San Diego: Academic Press; 2001.
12. Schindler DW. Recent advances in the understanding and management of eutrophication. *Limnology and Oceanography* 2006;51:356-63.
13. Smolders AJP, Lamers LPM, Lucasseu ECHET, van der Velde G, Roelofs JGM. Internal eutrophication: how it works and what to do about it-a review. *Chemistry and Ecology* 2006;22:93-111.
14. Gächter R, Wehrli B. Ten years of artificial mixing and oxygenation: no effect on the internal phosphorus loading of two eutrophic lakes. *Environmental Science and Technology* 1998;32(23):3659-65.
15. Graneli W. Internal phosphorus loading in Lake Ringsjon. *Hydrobiologia* 1999;404:19-26.
16. Steinman AD, Havens KE, Aumen NG, James RT, Jin KR, Zhang J, Rosen B. Phosphorus in Lake Okeechobee: sources, sinks, and strategies. In: Reddy KR, O'Connor GA, Schelske CL (Ed.). *Phosphorus biogeochemistry of subtropical ecosystems: Florida as a case example*. New York: CRC/Lewis Publ.; 1999. p. 527-44.
17. Moss B. The Water Framework Directive: total environment or political compromise? *Science of Total Environment* 2008;400:32-41.
18. Shearer JA, Fee EJ, Debruyne ER, Declercq DR. Phytoplankton primary production and light attenuation responses to the experimental acidification of a small Canadian Shield lake. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 1987;44:83-90.
19. Jeppesen E, Sondergaard M, Kronvang B, Jensen JP, Svendsen LM, Lauridsen TL. Lake and catchment management in Denmark. *Hydrobiologia* 1999;395/396:419-32.
20. Sondergaard MJ, Jensen JP, Jeppesen E. Retention and internal loading of phosphorus in shallow eutrophic lakes. *The Scientific World Journal* 2001;1:427-442.
21. Cooke GD, Welch EB, Peterson SA, Newroth PR. *Restoration and management of lakes and reservoirs*. 2nd ed. Boca Raton (FL): Lewis Publishers; 1993.
22. Cooke GD, Welch EB, Peterson SA, Nichols SA. *Restoration and management of lakes and reservoirs*. 3rd ed. Boca Raton (FL): CRC Press; 2005.
23. Kennedy RH, Cooke GD. Control of lake phosphorus with aluminum sulfate. Dose determination and application techniques. *Water Research Bulletin* 1982;18:389-95.

24. Welch EB, Schriever GD. Alum treatment effectiveness and longevity in shallow lakes. *Hydrobiologia* 1994;275(276):423-31.
25. Hickey CW, Gibbs MM. Lake sediment phosphorus release management: decision support and risk assessment framework. *Journal of Marine Freshwater Research* 2009;43:819-56.
26. Gibbs MM, Özkundakci D. Effects of a modified zeolite on P and N processes and fluxes across the lake sediment–water interface using core incubations. *Hydrobiologia* 2011;661:21-35.
27. Hudnell HK, Jones C, Labisi B, Lucero V, Hill DR, Eilers J. Freshwater harmful algal bloom (FHAB) suppression with solar powered circulation (SPC). *Harmful Algae* 2010;9:208-17.
28. Hudnell HK. The state of U.S. freshwater harmful algal blooms assessments, policy and legislation. *Toxicon* 2010;55:1024-34.
29. Berg U, Neumann T, Donnert D, Nüsch R, Stüben D. Sediment capping in eutrophic lakes: efficiency of undisturbed barriers to immobilize phosphorus. *Applied Geochemistry* 2004;19:1759-71.
30. Robb M, Greenop B, Goss Z, Douglas G, Adeney JA. Application of PhoslockTM, an innovative phosphorus binding clay, to two Western Australian waterways: preliminary findings. *Hydrobiologia* 2003;494:237-43.
31. Yamada H, Kayama M, Saito K, Hara M. Suppression of phosphate liberation from sediment by using iron slag. *Water Research* 1987;21:325-33.
32. Yuan G, Wu L. Allophane nanoclay for the removal of phosphorus in water and waste water. *Science and Technology of Advanced Materials* 2007;8:60-2.
33. Huisman J, Sharples J, Stroom JM, Visser PM, Kardinaal WEA, Verspagen JMH, Sommeijer B. Changes in turbulent mixing shift competition for light between phytoplankton species. *Ecology* 2004;85(11):2960-70.
34. Elliott JA, Irish AE, Reynolds CS. The effects of vertical mixing on a phytoplankton community: a modelling approach to the intermediate disturbance hypothesis, *Freshwater Biology* 2001;46:1291-7.
35. Johnk KD, Huisman J, Sharples J, Sommeijer B, Visser PM, Stroom JM. Summer heatwaves promote blooms of harmful cyanobacteria. *Global Change Biology* 2008;14:495-512.
36. Singleton VL, Little JC. Designing hypolimnetic aeration and oxygenation systems – a review. *Environmental Science and Technology* 2006;40:7512-20.
37. Sigeo DC, Glenn R, Andrews MJ, Bellinger EG, Butler RD, Epton HAS, Hendry RD. Biological control of cyanobacteria: principles and possibilities. *Hydrobiologia* 1999;395/396:161-72.
38. Horppila J, Peltonen H, Malinen T, Luokkanen E, Kairesalo T. Top-down or bottom-up effects by fish: issues of concern in biomanipulation of lakes. *Restoration Ecology* 1998;6(1):20-8.
39. Codd GA, Chorus I, Burch M. Chapter 10. Design of monitoring programs. 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.
40. Hiscock KM, Grischek T. Attenuation of groundwater pollution by bank filtration. *Journal of Hydrology* 2002;266:139-44.
41. Paerl HW. Nutrient and other environmental controls of harmful cyanobacterial blooms along the freshwater-marine continuum. In: Hudnell HK (Ed.). *Cyanobacterial harmful algal blooms: state of the science and research needs*. New York: Springer Press; 2008. p. 218-37.
42. Sanchez W, Palluel O, Meunier L, Coquery M, Porcher JM, Aït-Aïssa S. Copper-induced oxidative stress in three-spined stickleback: relationship with hepatic metal levels. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 2005;19:177-83.
43. Oliveria-Filho EC, de Lopes RM, Paumgartten FJR. Comparative study on the susceptibility of freshwater species to copper-based pesticides. *Chemosphere* 2004;56:369-74.

44. Roman YE, Schamphelaere KAC, De Nguyena LTH, Janssen CR. Chronic toxicity of copper to five benthic invertebrates in laboratory-formulated sediment: sensitivity comparison and preliminary risk assessment. *Science of Total Environment* 2007;387:128-40.
45. García-Villada L, Rico M, Altamirano M, Sánchez-Martín L, López-Rodas V, Costas E. Occurrence of copper resistant mutants in the toxic cyanobacteria *Microcystis aeruginosa*: characterization and future implications in the use of copper sulphate as algacide. *Water Research* 2004;438:2207-13.
46. Barrett PRF, Littlejohn JW, Curnow J. Long-term algal control in a reservoir using barley straw. *Hydrobiologia* 1999;415:309-13.
47. Chow CWK, House J, Velzeboer RMA, Drikas M, Burch MD, Steffensen DA. The effect of ferric chloride flocculation on cyanobacterial cells. *Water Research* 1998;32(3):808-14.
48. Pietsch J, Bornmann K, Schmidt W. Relevance of intra- and extracellular cyanotoxins for drinking water treatment. *Acta hydrochimica et hydrobiologica* 2002;30(1):7-15.
49. Ribau Teixeira M, João Rosa M. Comparing dissolved air flotation and conventional sedimentation to remove cyanobacterial cells of *Microcystis aeruginosa* Part I: The key operating conditions. *Separation and Purification Technology* 2006;52:84-94.

4.2. TRATTAMENTI PER LA RIMOZIONE DI CIANOBATTERI E LORO METABOLITI

Enrico Veschetti (a), Pier Paolo Abis (b), Lorenza Meucci (c), Franca Palumbo (d)

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

(b) Acquedotto Pugliese SpA, Bari

(c) Società Metropolitana Acque Torino SpA, Torino

(d) Laboratori Iren Acqua Gas, Genova

4.2.1. Introduzione

Nel caso in cui, nonostante l'adozione di misure preventive, si verifichi una fioritura algale potenzialmente tossica nel bacino idrografico di approvvigionamento, si rende necessaria l'attuazione di un'adeguata strategia di contenimento del livello di tossine che potrebbero essere rilasciate nell'acqua potabile in distribuzione. Tale strategia deve essere elaborata a partire da una o più opzioni di seguito elencate:

- utilizzo totale o parziale di una fonte alternativa di approvvigionamento non contaminata da cianobatteri;
- spostamento del punto di presa al fine di minimizzare la captazione di strati fortemente contaminati da cianobatteri;
- trattamento dell'acqua per rimuovere i cianobatteri e/o le loro tossine.

La Tabella 1 riporta le procedure attualmente impiegate nel trattamento dell'acqua captata (1-3).

Tabella 1. Quadro sinottico dei trattamenti per la rimozione dei cianobatteri e dei loro metaboliti

Trattamenti	Efficacia relativa nella rimozione di				
	C	MC	S	CYN	ANA-a
Coagulazione e flocculazione	+	-	-	-	-
Flottazione	++	-	-	-	-
Microstacciatura	++	-	-	-	-
Filtrazione lenta:					
<i>attraverso la sponda di un fiume</i>	+++	+	+	+	+
<i>su sabbia</i>	+++	+	-	-	-
Microfiltrazione	++	-	-	-	-
Ultrafiltrazione	+++	-	-	-	-
Nanofiltrazione	N/A	++	++	++	++
Osmosi inversa	N/A	+++	+++	+++	+++
PAC	N/A	++++	++++	++++	++++
GAC	N/A	++++	++++	++++	++++
Clorazione	++	+++	++	+++	-
Disinfezione con:					
<i>monocloramina</i>	-	-	-	-	-
<i>biossido di cloro</i>	-	-	-	-	-
<i>perossido di idrogeno</i>	-	-	-	-	-
<i>permanganato di potassio</i>	-	+	+	+	+
Ozonizzazione	++	+++	+	+++	+++
Irraggiamento UV	-	-	-	-	-
Trattamenti biologici	+	+	+	+	+

C: cianobatteri; **MC:** microcistine; **S:** saxitossine; **CYN:** cilindrospermopsina; **ANA-a:** anatoxina A

- inefficace, + poco efficace, ++ moderatamente efficace, +++ efficace, ++++ molto efficace; N/A: non applicabile

4.2.2. Rimozione dei cianobatteri

Ciascuna cellula cianobatterica può contenere al suo interno un livello significativo di tossina che può essere rilasciata in acqua nel caso in cui la parete cellulare subisca danni. Dal momento che la tossina disciolta non viene facilmente rimossa dai trattamenti convenzionali di potabilizzazione, il modo più efficace per ridurre la sua concentrazione totale in acqua è quello di rimuovere le cellule intatte. Ciò può essere effettuato selezionando solo quei processi in grado di abbattere il livello di cianobatteri senza provocare la lisi cellulare.

Di seguito saranno esaminati i principali trattamenti di potabilizzazione in relazione alla loro efficacia nella rimozione di cellule algali.

4.2.2.1. Preossidazione

Questo trattamento è sconsigliato in presenza di cianobatteri potenzialmente tossici. Infatti, nonostante sia in grado di migliorare la coagulazione di cellule algali può causare danni di entità variabile alle pareti cellulari. Nel caso in cui non sia possibile evitare il suo utilizzo, la concentrazione residua di ossidante aggiunto dovrebbe essere tale da garantire la totale distruzione della tossina rilasciata dalla lisi cellulare. Questo effetto può essere raggiunto solo per alcune specie di cianobatteri e dipende dalla natura chimica del disinfettante impiegato.

4.2.2.2. Microstacciatura

La microstacciatura consiste nel far passare l'acqua da trattare attraverso reti metalliche, lamiere forate o teli di plastica, in genere supportati da un cilindro metallico rotante, con pulizia automatica attuata con vari dispositivi. Le aperture di passaggio possono essere dell'ordine della decina di micron (20-40 μm) per cui il trattamento risulta più efficiente della grigliatura fine.

La microstacciatura consente la rimozione di solidi biologici e minerali dall'acqua superficiale. Può essere impiegata, previa valutazione dell'efficacia, come pretrattamento prima della filtrazione lenta su sabbia e della coagulazione. È in grado di rimuovere le alghe multicellulari o filamentose, ma risulta meno efficace nell'eliminazione di specie unicellulari.

4.2.2.3. Filtrazione lenta

Attraverso la sponda di un fiume

È un processo semplice ed efficiente, largamente impiegato in alcune parti del mondo. L'acqua viene prelevata da un corso superficiale utilizzando pozzi trivellati a circa 20-200 m dalla riva; si sfrutta la capacità filtrante della sponda, costituita da sabbia, ghiaia e pietrisco, in grado di trattenere il particolato sospeso in acqua. Molti contaminanti solubili vengono rimossi per adsorbimento o a seguito di processi biologici degradativi che si instaurano nel biofilm presente nei primi centimetri del letto filtrante. In tali condizioni è possibile abbattere significativamente la presenza di cianobatteri e di alcune tossine in soluzione, soprattutto quando il tempo di percorrenza dell'acqua dal fiume al pozzo è sufficientemente lungo (fino ad alcuni mesi). Al contempo il mescolamento del permeato con acque sotterranee di diversa origine determina la diluizione delle tossine esocellulari non trattenute.

Su sabbia

È in grado di trattenere quasi completamente le cellule algali e, per azione del biofilm, alcune tossine extracellulari. L'efficacia del trattamento può essere in parte compromessa da fenomeni di ricrescita algale che si possono instaurare, nel corso del tempo, al di sopra del letto filtrante. In generale le prestazioni raggiungibili risultano influenzate dai seguenti parametri:

- *Torbidità dell'acqua in ingresso*: valori superiori a 10 NTU (*Nephelometric Turbidity Unit*) possono causare l'ostruzione del letto filtrante in tempi rapidi di esercizio e sono responsabili della ricrescita algale.
- *Velocità di filtrazione*: determina la perdita di carico del letto filtrante e influenza la qualità dell'eluato. Al fine di garantire il raggiungimento di prestazioni costanti, è necessario controllare la velocità di flusso in modo da prevenire rapide fluttuazioni superiori al 20% del valore di esercizio.
- *Raschiatura superficiale della sabbia*: consiste nel rimuovere lo strato di Schmutzdecke e i primi due centimetri di sabbia mediante raschiatura meccanica. Il livello del letto deve essere successivamente ripristinato aggiungendo sabbia pulita. Al termine di questa operazione è necessario attendere un periodo di maturazione del letto filtrante (3-4 giorni), durante il quale la velocità di flusso deve essere incrementata gradualmente a partire da 0,1 m/h scartando l'eluato prodotto o inviandolo in testa ad un altro filtro.

4.2.2.4. Trattamenti chimico-fisici convenzionali

Coagulazione e flocculazione

Il comportamento dei cianobatteri durante il processo di coagulazione-flocculazione è influenzato notevolmente dalla tipologia e dalla forma delle cellule algali presenti: un'elevata motilità e una geometria allungata e filamentosa possono compromettere la coagulazione dei fiocchi. Allo stato attuale sono reperibili in letteratura indicazioni contrastanti sui tipi di coagulante e di polielettrolita più efficaci nella rimozione dei cianobatteri. Ciò implica la necessità di ottimizzare le condizioni sperimentali mediante *jar test* di laboratorio e successive verifiche in impianto. Occorre inoltre valutare l'entità della lisi cellulare causata dall'agitazione meccanica dopo l'aggiunta dei reagenti.

Una volta confinati nel flocculato i cianobatteri perdono la loro vitalità, muoiono e possono rilasciare le tossine intracellulari nell'acqua circostante. Ciò può avvenire entro 24 ore dal trattamento, per cui è opportuno isolare il fango e il suo supernatante dall'impianto fino alla completa degradazione delle tossine.

Flottazione ad aria o gas disciolti

È un trattamento efficace nella rimozione di elevati contenuti algali, soprattutto nel caso in cui siano presenti specie con vacuoli gassosi. L'efficienza del processo (55-100%) dipende dal tipo di alga ed è influenzata dalle condizioni operative che devono essere ottimizzate. Tale soluzione necessita però di ampi spazi a disposizione per essere implementata in scala reale.

4.2.2.5. Filtrazione su membrana

In generale le cellule cianobatteriche e i loro filamenti hanno dimensioni non inferiori ad 1 μm per cui possono essere efficacemente rimosse impiegando membrane per micro e ultrafiltrazione (Figura 1).

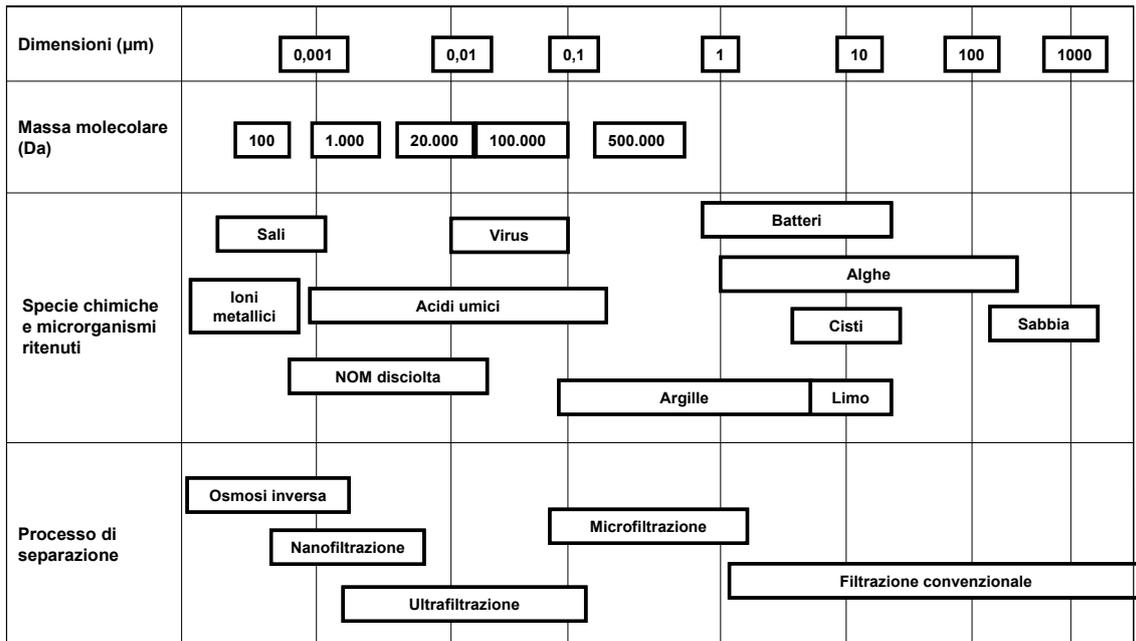


Figura 1. Efficienza dei processi di filtrazione

La distribuzione dimensionale dei loro pori varia in funzione del produttore (0,1-3 μm per la microfiltrazione; 0,002-0,2 μm per l'ultrafiltrazione) e deve essere attentamente selezionata al fine di garantire la massima resa. Sia la micro che l'ultrafiltrazione non sono però in grado di trattenere meccanicamente le tossine rilasciate da cellule algali danneggiate dal flusso attraverso la membrana e dal gradiente di pressione applicato. Frequenti controlavaggi della membrana riducono sensibilmente il rischio del rilascio di tossine dalla massa algale che si concentra in prossimità della sua superficie. Rispetto ai sistemi pressurizzati quelli a membrana sommersa consentono un ulteriore contenimento di tale rischio dal momento che viene evitato il pompaggio dell'acqua a monte della membrana e che il gradiente di pressione risulta più contenuto. Non è comunque da sottovalutare il fatto che, in caso di bloom algali importanti, filtrazioni spinte possano comportare fenomeni di *clogging* con conseguenti aumenti dei gradienti di pressione e difficoltà di esercizio della stazione di filtrazione.

4.2.3. Rimozione delle cianotossine

Sebbene, in caso di fioritura algale, le tossine potenzialmente veicolate dall'acqua captata siano prevalentemente in forma intracellulare, non è possibile escludere la concomitante presenza di una frazione solubile rilasciata a seguito di danni indotti alla parete cellulare e/o all'instaurarsi di fenomeni degradativi della massa algale. In tal caso, oltre ai trattamenti di rimozione dei cianobatteri, è necessario approntare procedure specifiche idonee al loro contenimento.

Di seguito saranno esaminati i principali processi di potabilizzazione in relazione alla loro efficacia nella rimozione di cianotossine extracellulari.

4.2.3.1. Trattamenti chimico-fisici

Adsorbimento su carbone attivo

Il carbone attivo è un materiale poroso caratterizzato da un elevato sviluppo superficiale. È disponibile in due forme: in polvere (*Powdered Activated Carbon*, PAC) e granulare (*Granular Activated Carbon*, GAC). Il primo, costituito da particelle con diametro compreso tra 10 e 100 µm, può essere aggiunto prima della coagulazione o durante la sedimentazione. Viene rimosso dall'acqua intrappolato nella massa dei fiocchi o attraverso il successivo trattamento di filtrazione. Il suo impiego può essere limitato al periodo della fioritura algale in modo da contenere i costi di esercizio. Al termine del trattamento viene smaltito con i fanghi o l'acqua di controlavaggio. Il principale svantaggio dell'uso del PAC deriva dal fatto che il tempo di contatto è troppo basso per sfruttare completamente la capacità totale di adsorbimento del carbone. Inoltre il dosaggio immediatamente prima o durante la coagulazione può ridurre la sua efficacia a seguito dell'interazione con i fiocchi. In generale il sito più idoneo all'immissione del carbone è rappresentato da una vasca di contatto a monte della coagulazione o dalla condotta che collega il punto di presa all'impianto di trattamento. Nella scelta della tipologia di PAC, del punto di immissione e della dose raccomandata per la rimozione delle cianotossine occorre considerare anche la competizione con la sostanza organica naturale (*Natural Organic Matter*, NOM), la cui concentrazione in acqua è normalmente di tre ordini di grandezza superiore a quella dei microcontaminanti da rimuovere. Dal momento che ogni corso d'acqua ha un diverso contenuto di NOM e una composizione controllata da fattori specifici del sito di captazione (es. il tipo di vegetazione e di suolo presenti nonché le condizioni climatiche prevalenti) appare evidente come sia possibile fornire solo indicazioni operative del tutto generali da ottimizzare con adeguate prove di laboratorio. In Tabella 2 sono elencate alcune raccomandazioni utili alla rimozione di microcistine (MC), saxitossine cilindrospermopsina (CYN) e anatosina-a (ANA-a) con l'aggiunta di PAC quando il contenuto di carbonio organico disciolto (*Dissolved Organic Carbon*, DOC) non supera 5 mg/L. Ovviamente tali indicazioni possono variare sensibilmente in casi in cui l'immissione del PAC avvenga a valle di altri processi di trattamento.

Tabella 2. Indicazioni generali sul dosaggio di PAC nella rimozione di cianotossine da acque con DOC ≤ 5 mg/L per tempi di contatto di 60 min

Tossina	Tossina nell'acqua greggia (µg/L)	Dosaggio del PAC (mg/L)	Tipologia di PAC
MC-LR	1-2 2-4	12-15 15-25	a, c
MC-LA	1-2 2-4	30-50 nr	a, c
MC-YR	1-2 2-4	10-15 15-20	a, c
MC-RR	1-2 2-4	8-10 10-15	a, c
CYN	1-2 2-4	10-20 20-30	a, c
Saxitossina	5-10 STX eq.	30-35	b
ANA-a	1-2 2-4	12-15 15-25	a, c

a: Carbone vegetale da legno, attivato chimicamente; b: carbone vegetale da legno o noce di cocco, attivato con il vapore; c: carbone minerale con elevato numero di mesopori, attivato con il vapore; nr: non raccomandato.

Il carbone attivo granulare, nel quale il diametro delle particelle risulta compreso tra 0,4 e 2,5 mm, è generalmente impiegato tra il trattamento convenzionale e la post-disinfezione o, eventualmente, nella filtrazione primaria in sostituzione della sabbia o dell'antracite o anche in aggiunta alla sabbia stessa. Fornisce una barriera costante ed efficace nei confronti di contaminazioni inattese da tossine e sostanze in grado di alterare le proprietà organolettiche dell'acqua. Il GAC è impiegato all'interno di adsorbitori a letto fisso realizzati installando serbatoi *ad hoc* o convertendo filtri rapidi a gravità preesistenti. Durante la filtrazione su GAC il letto tende progressivamente a saturarsi dall'ingresso all'uscita dell'adsorbitore formando un fronte di adsorbimento che avanza progressivamente nel tempo. Quando il fronte raggiunge l'uscita del letto si registra la caratteristica curva di *breakthrough*. Il tempo necessario alla saturazione del GAC dipende dal tipo di carbone impiegato, dalla concentrazione e dalla natura delle sostanze organiche presenti in acqua e dal tempo di residenza nel letto vuoto. Al decrescere della velocità di flusso si osserva un incremento dell'efficienza di adsorbimento e la conseguente riduzione dell'ampiezza del fronte di adsorbimento. Quando il filtro a carbone attivo non è più in grado di trattenere le cianotossine, il GAC deve essere rigenerato termicamente o sostituito. Come nel caso del PAC, la capacità adsorbente del GAC dipende dalle caratteristiche chimiche e chimico-fisiche dell'adsorbente impiegato e delle tossine da rimuovere, nonché dal metodo applicato nell'attivazione del carbone. Prima di scegliere un particolare carbone attivo è utile effettuare test comparativi di efficacia per la rimozione delle tossine presenti all'ingresso dell'impianto.

Tutti gli adsorbitori a carbone sviluppano attività biologica che può essere esaltata mediante la preozonizzazione o incrementando il tempo di residenza. Lo strato biologicamente attivo è in grado di ridurre le tossine e le altre sostanze organiche biodegradabili determinando un incremento della vita del filtro a carbone. Gli effetti benefici dell'azione biologica si riducono sensibilmente quando la temperatura dell'acqua scende al di sotto di 10°C o quando il tempo di residenza è inferiore a 10 min. L'attività biologica produce però un'incipiente biomassa che deve essere controllata con frequenti controlavaggi. Ciò può ridurre la vita operativa del GAC a seguito dell'abrasione meccanica delle particelle.

Filtrazione su membrana

Le membrane filtranti sono barriere fisiche in grado di trattenere microinquinanti con diametro idrodinamico superiore alla dimensione dei pori. Altri fattori, quali le interazioni elettrostatiche e l'accumulo di materiale sulla loro superficie, possono alterare la permeabilità. La Figura 1 (*vedi pag. 127*) mostra la massa molecolare e le dimensioni delle particelle trattenute in funzione della dimensione dei pori delle membrane più comuni. Le MC sono normalmente ritenute dalle membrane impiegate nell'osmosi inversa e nella nanofiltrazione, mentre le saxitossine, le anatossine e la CYN sono rimosse solo dalle membrane per osmosi inversa. Tuttavia anche quest'ultime possono consentire la permeazione delle tossine più piccole nel caso in cui siano presenti pori più larghi o che l'integrità della membrana risulti compromessa. In generale, comunque, i trattamenti a membrana sono difficilmente applicabili agli impianti di grandi dimensioni a causa della complessità gestionale.

4.2.3.2. Trattamenti chimici

Clorazione

Il cloro è un ossidante in grado di reagire con molti composti organici incluse le tossine algali e la NOM. La specie più reattiva è l'acido ipocloroso, la cui concentrazione in acqua è funzione del pH. Quando il cloro è impiegato nella rimozione delle tossine algali si ha un effetto

competitivo tra le tossine e le sostanze che compongono la NOM, difficilmente prevedibile a causa della composizione variabile di quest'ultima.

Le MC sono abbastanza reattive con il cloro per la presenza di un doppio legame coniugato e di gruppi amminoacidi nella loro struttura. La reattività delle singole tossine varia in funzione dei gruppi amminoacidi presenti. Per le quattro MC più comuni l'ordine di reattività è il seguente: MC-YR > MC-RR > MC-LR > MC-LA. La temperatura ha uno scarso effetto sulla velocità di reazione.

Le saxitossine sono meno reattive delle MC a causa dell'assenza di siti molto sensibili all'azione ossidante del cloro.

Dai pochi dati disponibili in letteratura, si evince che la CYN è molto più suscettibile alla clorazione delle MC, mentre l'ANA-a è del tutto inerte all'azione del cloro.

I risultati migliori nell'ossidazione di MC, saxitossine e CYN si raggiungono disinfettando con 3 mg/L di cloro a pH < 8 se la concentrazione residua del disinfettante non è inferiore a 0,5 mg/L dopo 30 min di contatto.

Disinfezione con monoclorammina

La monoclorammina è un ossidante più debole del cloro e dell'ozono in grado di reagire con le MC solo a dosaggi molto elevati a seguito di tempi di contatto prolungati. I pochi dati sperimentali disponibili per le altre tossine suggeriscono una scarsa azione barriera nei loro confronti.

Disinfezione con biossido di cloro

In generale alle concentrazioni normalmente impiegate in post disinfezione il biossido di cloro è inefficace nei confronti delle tossine algali. Il suo impiego, opportunamente modulato, può però essere utile per minimizzare la formazione di altri sottoprodotti.

Ozonizzazione

L'ozono, come il cloro, è un ossidante estremamente reattivo capace di attaccare le strutture molecolari senza alcuna discriminazione. La molecola reagisce con i composti organici presenti in acqua e, soprattutto a pH > 8, si decompone spontaneamente in radicali idrossilici estremamente reattivi. La NOM interagisce con l'ozono agendo sia come iniziatore che come inibitore della reazione a catena di formazione dei radicali $\cdot\text{OH}$. Nel processo di ozonizzazione anche l'alcalinità ha un ruolo importante, dal momento che lo ione carbonato si comporta come un inibitore della suddetta reazione, riducendo la reattività dell'ozono ma incrementando il suo tempo di emivita. Quando l'ozono viene impiegato in combinazione con il perossido di idrogeno, la formazione di radicali idrossilici viene incrementata determinando un aumento complessivo del potenziale redox dell'ossidante.

Le MC hanno strutture molecolari suscettibili alla forte azione ossidante esercitata dalla molecola di ozono e dai radicali idrossilici: mantenendo una concentrazione residua di 0,3 mg/L di ozono per almeno 5 min si avrà un abbattimento della loro concentrazione a valori inferiori al limite di rivelabilità cromatografico. In presenza di DOC superiore a 5 mg/L sono in genere necessari dosaggi più elevati di disinfettante a causa dell'effetto competitivo della NOM.

Le saxitossine sono meno sensibili all'ossidazione delle MC: nelle condizioni operative efficaci per la rimozione di quest'ultime, la concentrazione delle saxitossine viene ridotta al massimo del 20%. Tale risultato potrebbe migliorare operando a pH più alcalini a causa dell'incremento della formazione di radicali $\cdot\text{OH}$.

I pochi dati disponibili sull'ozonizzazione della CYN suggeriscono la possibilità di ottenere buone rese di rimozione nelle condizioni operative raccomandate per il trattamento delle MC.

L'impiego di ozono in tali condizioni determina anche una significativa riduzione della concentrazione dell'ANA-a.

In generale le condizioni operative consigliate per l'ossidazione di MC, CYN e ANA-a sono le seguenti: pH > 7, concentrazione residua di ozono non inferiore a 0,3 mg/L per almeno 5 min di contatto. In ogni caso occorre valutare l'impatto potenziale dell'utilizzo dell'ozono nella formazione di sottoprodotti indesiderabili quali, ad esempio, i bromati.

Disinfezione con perossido di idrogeno

Il perossido di idrogeno è scarsamente efficace quando impiegato da solo. In combinazione con ozono o irraggiamento UV si decompone in radicali ossidrilici fortemente ossidanti. Al momento non sono disponibili informazioni sufficienti sulle condizioni ottimali di impiego.

Disinfezione con permanganato di potassio

Il permanganato di potassio è in grado di ridurre la concentrazione di MC, CYN e ANA-a, ma i pochi dati attualmente disponibili non consentono di stabilire il dosaggio efficace.

Irraggiamento UV

L'irraggiamento UV è in grado di degradare la MC-LR e la CYN a dosaggi troppo elevati o in presenza di catalizzatori come l'ossido di titanio o i pigmenti cianobatterici. Analogamente al trattamento di ozonizzazione, la presenza di perossido di idrogeno promuove la formazione di radicali idrossilici incrementando l'azione ossidativa dei raggi UV.

4.2.3.3. Trattamenti biologici

Sia le MC che la CYN sono estremamente sensibili al trattamento di rimozione biologica anche a velocità di flusso prossime a quelle impiegate nella filtrazione rapida su sabbia. Tutti i filtri a carbone attivo granulare funzionano anche come filtri biologici dopo alcune settimane dalla loro messa in esercizio garantendo in tal modo l'eliminazione delle tossine biodegradabili.

Occorre tuttavia osservare che solo particolari specie di alcuni microrganismi sono in grado di degradare le tossine algali quando presenti in numero sufficiente nei biofiltri.

Inoltre è richiesto un periodo di acclimatazione del biofilm, detto fase di latenza, durante il quale le tossine entranti non subiscono alcun processo degradativo. Infine i trattamenti di disinfezione che possono precedere la filtrazione tendono ad inibire la formazione del biofilm a seguito della riduzione dell'attività microbica. Per questi motivi, al momento, la filtrazione biologica non viene considerata come una barriera efficace alle cianotossine tranne che nella filtrazione lenta attraverso la sponda di un fiume praticata da alcuni Paesi europei.

Bibliografia

1. Global Water Research Coalition and Water Quality Research Australia. Chapter 5. Treatment options. In: Newcombe G (Ed.). *International guidance manual for the management of toxic cyanobacteria*. London (UK): Global Water Research Coalition; 2009. p. 50-67

2. Newcombe G, House J, Ho L, Baker P Burch M. Treatment strategies. In: Water Quality Research Australia (Ed.). *Management strategies for cyanobacteria (blue-green algae): a guide for water utilities*. Adelaide (SA): Water Quality Research Australia; 2010. p. 60-78.
3. Harrington GW, Swank R. Chapter 16. Control of cyanotoxins in drinking water treatment, In: American Water Works Association (Ed.). *Algae: source to treatment*, Denver: AWWA; 2010. p. 377-394. (AWWA Manual M57)

4.3. PRODOTTI DI DEGRADAZIONE DELLE CIANOTOSSINE

Sara Bogialli (a), Emanuele Ferretti (b)

(a) Dipartimento di Scienze Chimiche, Università degli Studi di Padova, Padova

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

Per una corretta valutazione del rischio associato alla presenza di cianobatteri nelle acque da destinare e destinate al consumo umano, è necessario prendere in considerazione i possibili prodotti di degradazione che vengono generati negli impianti di potabilizzazione in seguito ai trattamenti con agenti chimico-fisici e biologici. La disinfezione con cloro e la caratterizzazione dei relativi prodotti di trasformazione, è attualmente il processo di ossidazione più investigato.

Ad oggi, le informazioni analitiche e tossicologiche relative alla degradazione che le cianotossine possono subire negli impianti di potabilizzazione sono alquanto scarse (1, 2) e riguardano principalmente l'identificazione di composti organici ottenuti in esperimenti di laboratorio a seguito di clorazione di microcistine (MC) (3, 4), quasi esclusivamente MC-LR, cilindrospermopsina (CYN) (10-13) e anatosina-a (ANA-a) (5). Gli studi più esaustivi prevedono l'uso della spettrometria di massa per l'identificazione di questi composti di trasformazione (Tabella 1), eventualmente abbinata alla spettrofotometria e a studi di tossicità *in vitro* e *in vivo* (6, 7).

Tabella 1. Prodotti di degradazione delle cianotossine dopo disinfezione con cloro e tossicità ad essi associata, individuata in studi di laboratorio riportati dalla letteratura scientifica

Cianotossina di origine	Sottoprodotto	Formula molecolare	m/z [M+H] ⁺	Tossicità associata (metodo)	Rif.
MC-LR	Monocloro-MC (3 isomeri)	C ₄₉ H ₇₃ N ₁₀ O ₁₂ Cl	1029,52	Tossicità epatica ridotta associata a MC-LR residua ^a (protein fosfatasi)	
	Diidrossi-MC (8 isomeri)	C ₄₉ H ₇₆ N ₁₀ O ₁₄	1029,56	100 volte < MC-LR (protein fosfatasi). Tossicità epatica ridotta associata a MC-LR residua ^a (protein fosfatasi e <i>mouse-bioassay</i>)	4, 9
	Monocloro-idrossi-MC (5 isomeri)	C ₄₉ H ₇₅ N ₁₀ O ₁₃ Cl	1047,53		9
	Monocloro-diidrossi-MC (>10 isomeri)	C ₄₉ H ₇₅ N ₁₀ O ₁₄ Cl	1063,52		9
	Dicloro-diidrossi-MC (7 isomeri)	C ₄₉ H ₇₄ N ₁₀ O ₁₄ Cl ₂	1097,48		9
	Tricloro-idrossi-MC (6 isomeri)	C ₄₉ H ₇₃ N ₁₀ O ₁₃ Cl ₃	1115,45		9
CYN	5-cloro-cilindrospermopsina	C ₁₅ H ₂₀ N ₅ O ₇ SCl	450,08	DL ₅₀ >10000 µg/kg Tossicità epatica	10, 11,13
	Acido cilindrospermico	C ₁₂ H ₁₉ N ₃ O ₇ S	350,10	DL ₅₀ >10000 µg/kg Non citotossici ^a	10, 13
	Composto incognito	C ₁₃ H ₁₈ N ₄ O ₇ S	375,10	Non citotossici ^a	13

^a somministrato come miscela di prodotti di trasformazione

4.3.1. Microcistine

Attualmente si ritiene che le concentrazioni di MC siano sostanzialmente ridotte in seguito a trattamenti con cloro negli impianti di potabilizzazione (3). Tuttavia, è stata osservata una diversa reattività nei confronti del cloro delle quattro più diffuse varianti di MC, secondo l'ordine MC-YR>MC-RR>MC-LR>MC-LA (8), suggerendo l'ipotesi che nel processo siano coinvolti i due differenti amminoacidi che caratterizzano le diverse varianti.

Sono stati identificati 6 diversi sottoprodotti di clorazione, relativi alla MC-LR, la sola variante usata come riferimento normativo. Il primo composto, la diidrossi-MC derivante dall'ossidazione del gruppo dienico coniugato presente nella molecola originale, presenta 8 isomeri con identico m/z dello ione pseudomolecolare, pari a 1029 Th (thompson), così come identificato in spettrometria di massa (9, 4). È possibile monitorare la degradazione della MC-LR ad opera del processo di clorazione per via spettrofotometrica, poiché il composto di partenza presenta un massimo di assorbimento a lunghezze d'onda pari a 240 nm, mentre la diidrossi-MC a 260 nm (4, 9). Un secondo composto, la monocloro-MC, presenta lo stesso m/z della Diidrossi-MC, pertanto è possibile differenziarlo solo con spettrometria di massa ad alta risoluzione. In seguito a reazione con biossido di cloro, è stato ottenuto un prodotto di degradazione avente ione pseudomolecolare con m/z 1047 Th, identificato inizialmente come la forma idrata della diidrossi-MC (10). Successivi studi condotti utilizzando HClO come ossidante (4), hanno proposto invece per questo composto la struttura corrispondente alla monoclorodrossi-MC, rilevata anch'esso in diverse forme isomeriche. A partire dalla diidrossi-MC tramite ulteriori reazioni di ossidazione, è stata identificata la presenza di monocloro-diidrossi-MC (ione pseudomolecolare avente m/z 1063 Th), di dicloro-diidrossi-MC (ione pseudomolecolare avente m/z 1097 Th) e di tricloro-idrossi-MC (ione pseudomolecolare avente m/z 1115 Th) (4).

Dal punto di vista della valutazione del rischio, l'ossidazione con cloro di MC è generalmente associata ad un minore potenziale tossico, valutato sia tramite bio-saggio su topo (3), che tramite inibizione della protein fosfatasi, su miscele di composti di degradazione (11). Queste osservazioni sperimentali sono coerenti con il fatto che le reazioni di ossidazione vedono coinvolto l'amminoacido ADDA, responsabile della tossicità delle MC (12). Benché sia stata sperimentata una ridotta tossicità a livello epatico, non è da escludere un meccanismo di azione che veda coinvolti altri organi bersaglio.

4.3.2. Cilindrospermopsina

Gli effetti del processo di ossidazione della CYN sono stati riportati in letteratura da diversi autori (6, 7) prendendo in considerazione quasi esclusivamente la clorazione. Non sono disponibili dati sui prodotti di degradazione in seguito ad ossidazione con permanganato di potassio e clorammina, in quanto non sono considerate efficaci nel rimuovere questa tossina nelle acque destinate al consumo umano (5).

Composti di degradazione della CYN dovuti a clorazione sono stati monitorati in studi di laboratorio per via spettrofotometrica e hanno evidenziato la scomparsa del caratteristico picco di assorbimento della CYN a 262 nm in favore di composti isomerici con λ_{max} pari a 305 nm, identificati come composti monoclorurati della CYN. La formazione di due isomeri dell'acido cilindrospermico con ione pseudomolecolare avente rapporto m/z pari a 350,10 è stata osservata da due autori (6, 7) e potrebbe essere imputabile alla successiva clorazione della 5-clorocilindrospermopsina. In Figura 1 sono riportate le formule di struttura dei due composti di

trasformazione della CYN identificati in letteratura. Dal punto di vista tossicologico, è stato valutato il potenziale tossicologico tramite mouse assay (6, 7) e con test di citotossicità su cellule umane (7). I valori di DL_{50} dei due composti esaminati sono risultati almeno 50 volte inferiori al DL_{50} stimato per la CYN (200 $\mu\text{g}/\text{kg}$). La miscela di tre sottoprodotti di clorazione della CYN non è inoltre risultata citotossica in uno studio recente (7). La generale diminuzione di tossicità è stata imputata all'alterazione del meccanismo di azione espletato dal gruppo uracile (13). In Tabella 1 (vedi pag. 133) sono riportate le principali informazioni disponibili sui prodotti di trasformazione delle cianotossine desumibili dai dati di letteratura.

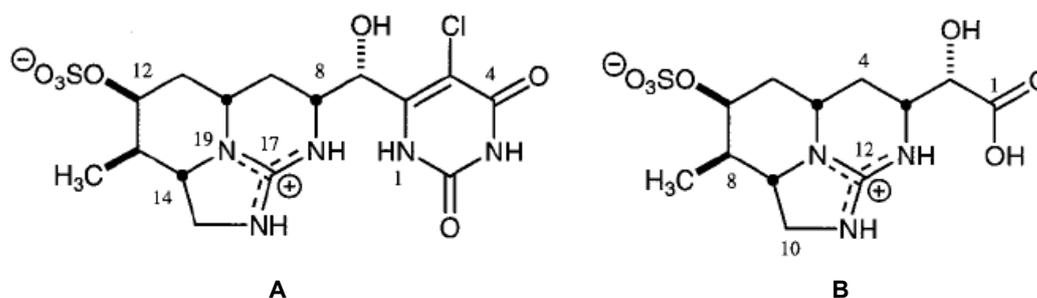


Figura 1. Struttura chimica dei due principali prodotti di trasformazione della cilindrospermopsina: A) 5-cloro-cilindrospermopsina; B) acido cilindrospermico

4.3.3. Anatossina

L'ANA-a ha mostrato scarsa reattività nei confronti del cloro (5, 14) della clorammina e del permanganato di potassio (5), di conseguenza ad oggi non sono ancora stati condotti estensivi studi sui suoi prodotti di degradazione.

Bibliografia

1. Westrick JA, Szlag DC, Southwell BJ, Sinclair J. A review of cyanobacteria and cyanotoxins removal/ inactivation in drinking water treatment. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 2010;397:1705-14.
2. Merel S, Clément M, Thomas O. State of the art on cyanotoxins in water and their behavior towards chlorine. *Toxicon* 2010;55:677-91.
3. Nicholson BC, Rositano J, Burch MD. Destruction of cyanobacterial peptide hepatotoxins by chlorine and chloramine. *Water Research* 1994;28:1297-303.
4. Merel S, Lebot B, Clement M, Seux R, Thomas O. Ms identification of microcystin-LR chlorination by-products. *Chemosphere* 2009;74:832-9.
5. Rodríguez E, Sordo A, Metcalf JS, Acero JL. Kinetics of the oxidation of cylindrospermopsin and anatoxin-a with chlorine, monochloramine and permanganate. *Water Research* 2007;41:2048-56.

6. Banker R, Carmeli S, Hadas O, Teltsch B, Porat R, Sukenik A. Identification of cylindrospermopsin in *Aphanizomenon ovalisporum* (Cyanophyceae) isolated from Lake Kinneret, Israel. *Journal of Phycology* 1997;33:613-6.
7. Merel S, Clement M, Mourot A, Fessard V, Thomas O. Characterization of cylindrospermopsin chlorination. *Science of Total Environment* 2010;408:3433-42.
8. Ho L., Onstad G., Gunten UV., Rinck-Pfeiffer S, Craig K, Newcombe G. Differences in the chlorine reactivity of four microcystin analogues. *Water Research* 2006;40:1200-9.
9. Tsuji K, Watanuki T, Kondo F, Watanabe MF, Nakazawa H, Suzuki M, Uchida H, Harada KI. Stability of microcystins from cyanobacteria - IV. Effect of chlorination on decomposition. *Toxicon* 1997;35:1033-41.
10. Kull TPJ, Backlund PH, Karlsson KM, Meriluoto JAO., Oxidation of the cyanobacterial hepatotoxin microcystin-LR by chlorine dioxide: Reaction kinetics, characterization, and toxicity of reaction products. *Environmental Science and Technology* 2004;38:6025-31.
11. Rodríguez EM, Acero JL, Spoo L, Meriluoto J. Oxidation of MC-LR and -RR with chlorine and potassium permanganate: Toxicity of the reaction products. *Water Research* 2008;42:1744-52.
12. 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.
13. Banker R, Carmeli S. Uracil moiety is required for toxicity of the cyanobacterial hepatotoxin cylindrospermopsin. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A* 2001;62:281-88.
14. Rodríguez E, Onstad GD, Kull TPJ, Metcalf JS, Acero JL, von Gunten U. Oxidative elimination of cyanotoxins: Comparison of ozone, chlorine, chlorine dioxide and permanganate. *Water Research* 2007;41:3381-93.

APPENDICE A
Metodo analitico LC/MS/MS
per la determinazione di microcistine
in acque grezze e trattate da destinare a consumo umano

Sara Bogialli (a), Luca Lucentini (b), Anna Milandri (c),
Federica Nigro Di Gregorio (b,d), Valentina Fuscoletti (b)

(a) *Dipartimento di Scienze Chimiche, Università degli Studi di Padova, Padova*

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

(c) *Fondazione Centro Ricerche Marine, Cesenatico*

(d) *Dipartimento di Chimica e Tecnologie del Farmaco,
Università degli Studi di Roma, Roma*

A.0. Generalità e definizioni

L'utilizzo di acque superficiali da destinare al consumo umano può comportare alcune problematiche di carattere sanitario legate alla presenza di cianobatteri. Questi ultimi, noti anche come alghe verde-azzurre, sono batteri fotosintetici Gram-negativi, caratterizzati da un'elevata variabilità morfologica (forma unicellulare, coloniale, filamentosa) e dimensionale (da organismi unicellulari con diametro < 1 µm a forme filamentose di lunghezza fino a qualche mm).

La presenza e proliferazione di cianobatteri è frequente in bacini lacustri, bacini di stoccaggio artificiale e serbatoi naturali che presentino condizioni caratterizzate da un'elevata irradiazione e temperatura, bassa turbolenza, alta concentrazione di nutrienti.

La rilevanza igienico-sanitaria dei fenomeni di diffusione di cianobatteri in acque da destinare a consumo umano è connessa alla capacità, da parte di alcune specie, di produrre metaboliti tossici (cianotossine) potenzialmente trasferibili all'uomo anche attraverso il consumo di acqua contaminata. Più di cinquanta specie di cianobatteri sono riconosciute come tossiche, tra i generi maggiormente coinvolti nella produzione di cianotossine figurano *Microcystis*, *Nodularia*, *Planktothrix*, *Anabaena*, *Aphanizomenon* e *Cylindrospermopsis*.

Le cianotossine ad oggi identificate, si differenziano in base al loro meccanismo d'azione in:

- epatotossine (microcistine e nodularine), hanno la capacità di inibire le fosfatasi PP1 e 2A, con conseguente iperfosforilazione proteica a livello del citoscheletro degli epatociti; l'ingestione sistematica di tali tossine è correlata a fenomeni di infiammazione e degenerazione degli epatociti;
- neurotossine (anatotossine e saxitossine), agiscono sul sistema neuromuscolare, bloccando la trasmissione nervosa attraverso differenti meccanismi;
- citotossine (cilindrospermopsina), agiscono a livello di diversi organi bersaglio come inibitori della sintesi proteica;
- dermatotossine (lyngbyatossina A, aplysiatossina e lipopolisaccaridi), causano irritazione della pelle e delle mucose inibendo la sintesi proteica.

Le cianotossine presenti in un corpo idrico sono principalmente contenute all'interno delle cellule produttrici (frazione intracellulare di tossine); tuttavia elevate concentrazioni di tossine possono essere rilasciate in acqua soprattutto a seguito di senescenza e lisi cellulare (frazione extracellulare o libere libera di tossine).

Il rischio associato alla presenza di cianotossine nelle acque destinate al consumo umano può essere notevolmente ridotto mediante rimozione o filtrazione delle biomasse algali presenti nelle acque, mentre l'utilizzo di trattamenti con agenti ossidanti (es. cloro od ozono) responsabili di lisi cellulare potrebbe aumentare il rilascio degli agenti tossici in forma libera all'interno del corpo idrico e di conseguenza il rischio di contaminazione per l'uomo. Tuttavia gli stessi trattamenti di potabilizzazione che vengono effettuati prima della distribuzione sono generalmente efficaci per una sostanziale rimozione sia delle cellule sia delle cianotossine presenti.

Tra le cianotossine, le microcistine (MC) rappresentano le tossine più ampiamente distribuite e maggiormente implicate negli episodi di carattere sanitario riscontrati finora.

Le MC sono eptapeptidi monociclici a basso peso molecolare caratterizzati dalla presenza di un aminoacido idrofobico, l'ADDA (acido 3-ammino, 9-metossi, 2,6,8-trimetil, 10-fenildeca, 4,6-dienico). I numerosi congeneri di MC, caratterizzati da proprietà tossicologiche notevolmente diverse, si differenziano fondamentalmente a livello di due amminoacidi sui quali è anche basata la nomenclatura delle MC.

Sebbene ad oggi siano stati identificati più di 80 congeneri di MC, la WHO ha stabilito una concentrazione limite provvisoria per le acque destinate al consumo umano solo per la MC-LR, il composto ritenuto più diffuso e tossico, i cui amminoacidi sostituenti sono rispettivamente leucina e arginina. Sulla base dei dati tossicologici disponibili (*Tolerable Daily Intake*, TDI di 0,04 µg/kg pc/giorno) la WHO ha fissato per la MC-LR un valore guida di 1,0 µg/L. In considerazione della scarsa attendibilità di un approccio indiretto per la sorveglianza delle cianotossine nel corpo idrico basato sul controllo di parametri quali nutrienti e/o densità di cianobatteri, numerosi Paesi anche all'interno dell'UE, prevedono il monitoraggio delle microcistine nelle acque, con un valore di parametro per la MC-LR basato sulle indicazioni della WHO.

Per la determinazione delle MC nelle acque sono attualmente disponibili metodi immunologici (cfr. metodo ISS.BGA.044.revXX in Rapporti ISTISAN 07/31), principalmente utilizzati per fini di screening e metodi di conferma basati sull'accoppiamento cromatografia liquida-spettrometria di massa.

A.1. Campo di applicazione

Il metodo è applicabile per l'estrazione di microcistine (Dem-MC-RR, MC-RR, MC-YR, Dem-MC-LR, MC-LR, MC-LA, MC-LY, MC-LF, MC-LW) da acque da destinare e destinate al consumo umano, incluse le acque di sorgente, le acque di piscina e quelle utilizzate per la produzione di acque per dialisi, secondo le definizioni riportate nelle normative vigenti.

Gli analiti sono determinati mediante cromatografia liquida a fase inversa accoppiata alla spettrometria di massa tandem (LC-MS/MS).

Il limite di rivelabilità è compreso nell'intervallo 0,002-0,025 µg/L.

A.2. Principio del metodo

Il campione d'acqua, del volume di 0,5 L, è sottoposto ad estrazione in fase solida (SPE) utilizzando come materiale adsorbente 0,5 g di CarboGraph 4, un *Graphitized Carbon Black*, per la preconcentrazione degli analiti.

Come standard di processo è utilizzato la nodularina.

Gli analiti estratti sono successivamente separati, identificati e quantificati mediante un sistema LC/MS tandem a triplo quadrupolo, equipaggiato con una interfaccia elettrospray a pressione atmosferica (ESI). La misura si basa sull'intensità dei segnali ionici relativi a due transizioni ione pseudo-molecolare > ione frammento degli analiti.

La determinazione di MC nei campioni di acqua prevede l'impiego di procedure di preparazione del campione differenti a seconda della componente di analiti da determinare, in particolare:

- estrazione e analisi della frazione totale di tossine. Questo tipo di estrazione prevede la lisi cellulare mediante cicli di congelamento-scongelo del campione (procedura estrattiva A) per liberare il contenuto intracellulare di tossine
- estrazione e analisi della frazione extracellulare o libera (procedura estrattiva B).

A.3. Prelievo e conservazione dei campioni

A.3.1. Bianco campione

Per "bianco campione" si intende un campione costituito dalla stessa matrice avente caratteristiche analoghe al campione oggetto di indagine.

I bianchi campione, che devono essere privi degli analiti, possono essere ottenuti utilizzando:

- acqua di rubinetto previa rimozione dei residui di agenti disinfettanti, in particolare il cloro, che agiscono come ossidanti nei confronti delle MC e dello standard di processo, abbattendone i contenuti; la rimozione del cloro residuo può essere ottenuta per trattamento con una soluzione di sodio tiosolfato (preparata disciogliendo 1 g di sodio tiosolfato in 100 mL di acqua deionizzata), aggiungendo 100 µL di tale soluzione di sodio tiosolfato per ogni litro di acqua da trattare;
- acque superficiali;
- acqua deionizzata.

I bianchi campione possono essere utilizzati:

- per verifica della specificità del metodo;
- per controlli di qualità;
- per preparazione di campioni contaminati artificialmente.

A.3.2. Raccolta dei campioni

Seguire quanto indicato in ISS.PGA.901.rev00 (in Rapporti ISTISAN 07/31).

Il prelievo dei campioni da sottoporre ad analisi deve essere eseguito utilizzando come contenitori bottiglie di polietilene o vetro scuro (A.4.1.1, A.4.1.14) lavate con acqua ultrapura (A5.1.1) esente da tracce dell'analita.

Nel caso di prelievi da cisterne, pozzi o invasi, il campionamento deve essere eseguito prelevando un volume pari a 1 L ad una profondità compresa tra 0 e 1 m.

Campionamenti di acqua possono essere effettuati anche all'interno dei sistemi di distribuzione o da rubinetti di utenza; in questi casi è necessario tenere presente che i trattamenti delle acque (quali sedimentazioni, filtrazioni, flocculazioni e/o disinfezioni, in particolare la presenza di cloro libero residuo nelle acque distribuite) possono inficiare le prestazioni dello standard di processo.

A.3.3. Conservazione dei campioni

A.3.3.1. Analisi del contenuto totale di tossine

Conservare i campioni in bottiglie di polietilene o vetro (A.4.1.1, A.4.1.14) e sottoporli ad almeno un ciclo di congelamento e scongelamento ($-18\pm 3^{\circ}\text{C}$) al fine di favorire la lisi.

A.3.3.2. Analisi del contenuto extracellulare di tossine

Conservare i campioni in bottiglie di polietilene o vetro (A.4.1.1, A.4.1.14) al buio e alla temperatura di $1-10^{\circ}\text{C}$ per prevenire la degradazione degli analiti dovuta all'azione di luce e agenti microbiologici. In queste condizioni la conservazione è limitata ad un tempo massimo di 24 h.

A.4. Vetreria, materiali e attrezzature di base

A.4.1. Attrezzature di uso comune di laboratorio

- A.4.1.1.** Bottiglie in polietilene da 1 L resistenti al congelamento idonei anche per il trasferimento del campione al sistema di estrazione SPE (A.4.1.10).
- A.4.1.2.** Filtri a fascia nera.
- A.4.1.3.** Filtri di fibra di vetro del tipo Whatman MN-GF5 di diametro adeguato al sistema filtrante, diametro pori $\leq 0,45 \mu\text{m}$ o analoghi.
- A.4.1.4.** Matracci tarati in vetro di classe A di idoneo volume (0,01 L, 0,05 L, 0,1 L, 0,5 L, 1 L).
- A.4.1.5.** Microsiringhe in vetro.
- A.4.1.6.** Pipette in vetro tarate di classe A.
- A.4.1.7.** Vial in vetro con tappo a vite da 1,5 mL.
- A.4.1.8.** Bagno ad ultrasuoni.
- A.4.1.9.** Sistema di filtrazione in vetro o materiale plastico autoclavabile o monouso completo di pompa da vuoto.
- A.4.1.10.** Sistema per estrazione SPE, per estrazioni singole o multiple, completo di pompa da vuoto, sistema di regolazione del flusso manometri e accessori.
- A.4.1.11.** Sistema di evaporazione sotto flusso di argon o di azoto.
- A.4.1.12.** Cartucce per estrazioni SPE da 8 cc, contenenti 0,5 g di Carbograph 4.
- A.4.1.13.** Beuta in FEP-Teflon o in vetro da 1 L.
- A.4.1.14.** Bottiglie in vetro scuro da 1L.
- A.4.1.15.** Beuta in FEP- Teflon o in vetro da 50 mL.
- A.4.1.16.** Provette o vials per il recupero dell'eluato, preferibilmente in FEP-Teflon o in vetro, da 10-20 mL.
- A.4.1.17.** Agitatore magnetico.

A.4.1.18. Vials per la conservazione degli standard analitici, preferibilmente in FEP-Teflon o in vetro scuro, di idoneo volume.

A.4.1.19. Filtri per siringa in PTFE da 13 mm di diametro e 0,45 µm di porosità

Tutta la vetreria e i contenitori, ad esclusione di quelli monouso, prima del loro impiego devono essere accuratamente lavati con detergenti per vetreria e risciacquati in sequenza con acqua di rubinetto, acqua Milli-Q esente da tracce da analiti (A.5.1.1), acetone (A.5.1.6) e metanolo (A.5.1.4).

A.5. Reagenti e materiali di riferimento

A.5.1. Reagenti e standard

Tutti i reagenti utilizzati sono di grado RS (per HPLC) o superiore e i materiali di riferimento al più elevato grado di purezza disponibile in commercio.

A.5.1.1 Acqua ultrapura (resistenza ≥ 18 MΩ/cm, TOC ≥ 2 ng/L), esente da tracce di analita.

A.5.1.2 Acetonitrile.

A.5.1.3 Acido formico concentrato (46 M).

A.5.1.4 Metanolo.

A.5.1.5 Acido trifluoroacetico (TFA) concentrato, 13 M.

A.5.1.6 Acetone.

A.5.1.7 Diclorometano.

A.5.1.8 Acido cloridrico al 37%, grado tecnico.

A.5.1.9 Azoto o argon ultrapuro.

A.5.1.10 Standard di processo per microcistine: utilizzare nodularina 1 mg ALEXIS® (La Jolla, CA,USA) o prodotto analogo.

A.5.1.11 Analiti: MC-LW 25µg; MC-LF 25 µg; MC-LY 25 µg; MC-LA 100 µg; MC-YR 25 µg; MC-LR 500 µg; MC-RR 250 µg; ALEXIS® BIOCHEMICALS (La Jolla, CA,USA) o prodotto analogo.

A.5.1.12 Analiti: dem-MC-RR 8 µg/mL, dem-MC-LR 7 µg/mL DHI (Horsholm, Denmark) o ALEXIS® BIOCHEMICALS (La Jolla, CA,USA) o prodotto analogo.

A.5.1.13 Tiosolfato di sodio.

A.5.2. Soluzioni

A.5.2.1. Soluzioni di reagenti

A.5.2.1.1 **Miscela acqua:acetonitrile, 70:30 (v/v):** prelevare 700 mL di acqua ultrapura (A.5.1.1) e 300 mL di acetonitrile (A.5.1.2), riunire in una beuta (A.4.1.13) e miscelare accuratamente.

A.5.2.1.2 **Miscela diclorometano:metanolo, 80:20 (v/v) 10 mM TFA:** prelevare 400 mL di diclorometano (A.5.1.7) e 100 mL di metanolo (A.5.1.4), riunire in una beuta (A.1.13), miscelare accuratamente e aggiungere 335 µL di TFA (A.5.1.5) con una microsiringa (A.4.1.5). Conservare la soluzione in frigorifero ad una temperatura di 5±3°C in bottiglie in vetro scuro (A.4.1.14) per evitare l'esposizione alla luce.

A.5.2.1.3 **Soluzione acquosa 1M di acido formico:** prelevare un volume di acido formico (A.5.1.3) pari a 1 mL tramite pipetta di vetro (A.4.1.6), trasferire quantitativamente in un pallone tarato da 50 mL (A.4.1.4) e portare a volume con acqua ultrapura (A.5.1.1).

A.5.2.1.4 **Soluzione acquosa 1M di acido cloridrico:** prelevare un volume di acido cloridrico (A.5.1.8) pari a 8 mL tramite idonea pipetta di vetro (A.4.1.6), trasferire quantitativamente in un pallone tarato da 100 mL (A.4.1.4) e portare a volume con acqua ultrapura (A.5.1.1).

A.5.2.1.5 Soluzione acquosa 0,01 M di acido cloridrico: prelevare un volume di soluzione acquosa 1M di acido cloridrico (A.5.2.1.3) pari a 10 mL tramite idonea pipetta di vetro (A.4.1.6), trasferire quantitativamente in un pallone tarato da 1 L (A.4.1.4) e portare a volume con acqua ultrapura (A.5.1.1).

A.5.2.2. Soluzioni standard di lavoro

Per la preparazione di soluzioni primarie di standard devono essere utilizzati materiali certificati di cianotossine al più elevato grado di purezza disponibile in commercio.

Il reperimento di standard di microcistine è sottoposto a regolamentazione internazionale sulla commercializzazione di agenti biologici che costituiscono un rischio per l'operatore; tale regolamentazione prevede l'assunzione di responsabilità nell'acquisto e utilizzo e una dichiarazione di destinazione d'uso e comporta generalmente tempi di approvvigionamento dell'ordine di alcuni mesi.

A.5.2.2.1 Soluzione primaria dello standard di processo, Nodularina (250 µg/mL)

A.5.2.2.1.1 Solubilizzare il materiale standard di Nodularina (A.5.1.10) in un vial (A.4.1.18) con un volume di Metanolo (A.5.1.4) pari a 4 mL prelevato con idonea pipetta (A.4.1.6), ottenendo una soluzione alla concentrazione di 250 µg/mL.

A.5.2.2.1.2 Agitare la soluzione (A.5.2.2.1.1) per un arco di tempo pari a 15 minuti utilizzando un agitatore magnetico (A.4.1.17).

Dopo la preparazione, la soluzione è conservata a $-18\pm 3^{\circ}\text{C}$ ed è stabile per almeno 3 mesi.

A.5.2.2.2 Soluzione primaria degli analiti

Solubilizzare il materiale standard (*standard stock solution*) di ciascun analita (A.5.1.11) in un vial (A.4.1.18) con un volume di metanolo (A.5.1.4) pari a quanto indicato in colonna B della Tabella A1 prelevato con idonea pipetta (A.4.1.6), ottenendo delle soluzioni a concentrazioni differenti secondo quanto riportato in colonna C. Il materiale standard degli analiti dem-MC-RR e dem-MC-LR (A.5.1.12) non richiede solubilizzazione con metanolo, in quanto viene fornito già in soluzione. Dopo la preparazione, le soluzioni sono conservate a $-18\pm 3^{\circ}\text{C}$ e risultano stabili per almeno 3 mesi.

Tabella A1. Composizione della soluzione primaria degli analiti

A		B	C
Microcistina	Volume di solubilizzazione mL	Concentrazione finale soluzione standard primaria (A.5.2.2.2), µg/mL	
MC-RR	4	62	
MC-LA	4	25	
MC-LR	4	125	
MC-YR	4	25	
MC-LF	4	6	
MC-LW	4	6	
MC-LY	4	6	
dem-MC-RR	-	8*	
dem-MC-LR	-	7*	

*concentrazione indicata dal produttore

A.5.2.2.3 Soluzione secondaria di lavoro di Nodularina (5 µg/mL)

Prelevare con idonea microsiringa (A.4.1.5) 200 µL della soluzione primaria di standard di processo (A.5.2.2.1), trasferire in un matraccio da 10 mL (A.4.1.4) e portare a volume con metanolo (A.5.1.4), ottenendo una soluzione alla concentrazione di 5 µg/mL.

Dopo la preparazione la soluzione è conservata a $5\pm 3^{\circ}\text{C}$ ed è stabile per almeno 3 mesi.

A.5.2.2.4 Soluzione secondaria di riferimento composta degli analiti (1 µg/mL)

Si preleva un'ideale aliquota da ogni soluzione primaria (A.5.2.2.2), secondo lo schema riportato in Tabella A2, colonna B, tramite idonee microsiringhe (A.4.1.5). Si riuniscono le aliquote e si diluisce in opportuno volume di metanolo (A.5.1.4), riportato in colonna C, per ottenere la soluzione secondaria di riferimento composta a concentrazione opportuna (*working standard solution*).

Tabella A2. Composizione della soluzione di riferimento composta

A	B	C	D	E
Microcistina	Concentrazione soluzione primaria di riferimento (A.5.2.2.2) µg/mL	Volume soluzione primaria da prelevare (A.5.2.2.2) µL	Volume finale soluzione secondaria (A.5.2.2.4) mL	Concentrazione soluzione secondaria (A.5.2.2.4) µg/mL
MC-RR	62	24	1,5	1
MC-LA	25	60	1,5	1
MC-LR	125	12	1,5	1
MC-YR	25	60	1,5	1
MC-LF	6	280	1,5	1
MC-LW	6	280	1,5	1
MC-LY	6	280	1,5	1
dem-MC-RR	8*	185	1,5	1
dem-MC- LR	7*	210	1,5	1

* concentrazione indicata dal produttore

A.6. Procedura estrattiva (SPE)**A.6.1. Preparazione del campione di prova per acque superficiali****A.6.1.1. Procedura estrattiva A per l'estrazione del contenuto totale (intracellulare + extracellulare) di tossine**

- A.6.1.1.1** Prelevare una aliquota di 0,5 L di campione (A.3.2).
- A.6.1.1.2** Sottoporre il campione ad almeno un ciclo di congelamento e scongelamento al fine di favorire la lisi cellulare. È possibile eventualmente sonicare (A.4.1.8) il campione per ottenere il totale scongelamento.
- A.6.1.1.3** Aggiungere lo standard di processo, Nodularina, alla concentrazione di 1 µg/L, prelevando con una microsiringa (A.4.1.5), 100 µL della soluzione secondaria di lavoro (A.5.2.2.3) pari a 500 ng dello standard di processo.
- A.6.1.1.4** Se necessario, cioè laddove si valuti che la torbidità/presenza di particolato potrebbe occludere le colonnine per SPE durante l'estrazione, filtrare i campioni di acqua con filtri a fascia nera (A.4.1.2), utilizzando un sistema di filtrazione sotto vuoto (A.4.1.9) altrimenti procedere al punto (A.6.1.1.5).
- A.6.1.1.5** Raccogliere il filtrato in un recipiente idoneo per l'estrazione SPE (A.4.1.1).
- A.6.1.1.6** In presenza di un evidente residuo di filtrazione, lavare il particolato trattenuto dal filtro con 10 mL di metanolo (A.5.1.4) al fine di rimuovere eventuali analiti trattenuti in esso. La miscela è trasferita nel campione.

- A.6.1.1.7** Lavare una cartuccia (A.4.1.12) per estrazione SPE in successione con due volumi (circa 12 mL) di diclorometano/metanolo (80:20, v/v) 10 mM TFA (A.5.2.1.2) e un volume (circa 6 mL) di metanolo (A.5.1.4).
- A.6.1.1.8** Attivare la cartuccia con due volumi (circa 12 mL) di una soluzione acquosa 0,01 M HCl (A.5.2.1.5) ed eliminare il residuo con un volume (circa 6 mL) di acqua MQ (A.5.1.1).
- A.6.1.1.9** Far passare il campione (A.3.2) attraverso la cartuccia ad un flusso non superiore a 10 mL/min, scartando il percolato.
- A.6.1.1.10** Lavare la cartuccia con 6 mL di acqua ultrapura (A.5.1.1) sempre con un flusso non superiore a 10 mL/min.
- A.6.1.1.11** Asciugare completamente la cartuccia SPE dall'acqua, tramite l'ausilio di una pompa da vuoto (A.4.1.10). Far passare 0,5 mL di metanolo (A.5.1.4) per eliminare ogni residuo di acqua con l'ausilio di una sistema da vuoto (A.4.1.10).
- A.6.1.1.12** Eluire lentamente (a goccia a goccia) gli analiti trattenuti dalla fase stazionaria in successione con 1 mL di metanolo (A.5.1.4) e 6 mL di miscela di diclorometano/metanolo (80:20, v/v) acidificata con 10 mmol/L di TFA (A.5.2.1.2) in una provetta o vial da 10 mL (A.4.1.16).
- A.6.1.1.13** Evaporare l'eluato (A.6.1.1.12) sotto moderato flusso di gas inerte azoto o argon (A.5.1.9) rimuovendo totalmente la fase liquida.
- A.6.1.1.14** Riprendere il residuo (A.6.1.1.13) con 1 mL di miscela acqua-acetonitrile 70:30 (A.5.2.1.1).
- A.6.1.1.15** Qualora la soluzione si presenti torbida, filtrare con filtri in PTFE (A.4.1.19)
- A.6.1.1.16** Prelevare una aliquota dell'estratto ricostituito (A.6.1.1.14) con microsiringa (A.4.1.5) e sottoporre ad esame mediante LC/MS/MS.

A.6.1.2. Procedura estrattiva B per l'estrazione della frazione di tossine extracellulari o libere

- A.6.1.2.1** Prelevare una aliquota di 0,5 L di campione conservato secondo quanto indicato al punto A.3.2.
- A.6.1.2.2** Aggiungere al campione (A.6.1.2.1) lo standard di processo, Nodularina, alla concentrazione di 1 µg/L, prelevando con una microsiringa (A.4.1.5), 100 µL della soluzione secondaria di lavoro (A.5.2.2.3) pari a 500 ng dello standard di processo.
- A.6.1.2.3** Filtrare i campioni di acqua utilizzando un sistema di filtrazione sotto vuoto (A.4.1.9) con filtri in fibra di vetro (A.4.1.3).
- A.6.1.2.4** Raccogliere il filtrato in un recipiente idoneo per l'estrazione SPE (A.4.1.1).
- A.6.1.2.5** Procedere con l'estrazione come descritto in precedenza nella procedura estrattiva A (A.6.1.1.6-A.6.1.1.16).

A.6.2. Preparazione del campione di prova per acque sottoposte a trattamento di potabilizzazione

A.6.2.1. Procedura estrattiva A per l'estrazione del contenuto totale (intracellulare + extracellulare) di tossine

- A.6.2.1.1** Prelevare una aliquota di 0,5 L di campione (A.3.2).
- A.6.2.1.2** Sottoporre il campione ad almeno un ciclo di congelamento e scongelamento al fine di favorire la lisi cellulare. È possibile eventualmente sonicare (A.4.1.8) il campione per ottenere il totale scongelamento.
- A.6.2.1.3** In caso di presenza di cloro libero (metodo ISS.BHD.033.rev00 in Rapporti ISTISAN 07/31) in concentrazione superiore a 0,5 mg/L, aggiungere tiosolfato di sodio in concentrazione pari a circa 18 mg/L (A.5.1.13).
- A.6.2.1.4** Procedere con l'estrazione come descritto in precedenza nella procedura estrattiva A (A.6.1.1.3-A.6.1.1.16)

A.6.2.2. Procedura estrattiva B per l'estrazione della frazione di tossine extracellulari o libere

- A.6.2.2.1** Prelevare una aliquota di 0,5 L di campione conservato secondo quanto indicati al punto A.3.2.
- A.6.2.2.2** In caso di presenza di cloro libero (metodo ISS.BHD.033.rev00 in Rapporti ISTISAN 07/31) in concentrazione superiore a 0,5 mg/L, aggiungere tiosolfato di sodio in concentrazione pari a circa 18 mg/L (A.5.1.13).
- A.6.2.2.3** Procedere con l'estrazione come descritto in precedenza nella procedura estrattiva A (A.6.1.2.2-A.6.1.2.5)

A.6.3. Preparazione del bianco campione

- A.6.3.1** Trasferire 0,5 L di campione di acqua ultrapura in recipiente idoneo per l'estrazione SPE (A.4.1.1).
- A.6.3.2** Procedere secondo quanto descritto ai punti A.6.1.1.7-A.6.1.1.16.

A.6.4. Preparazione dei campioni per la curva di taratura

- A.6.4.1** Predisporre un numero di recipienti idonei per l'estrazione SPE (A.4.1.1, A.4.1.4) pari ai livelli di taratura considerati e, in ciascun recipiente, trasferire 0,5 L di bianco campione (A.6.3).
- A.6.4.2** Aggiungere a ciascun bianco campione (A.6.3) con una microsiringa (A.4.1.5) o una pipetta (A.4.1.6), un volume di soluzione secondaria di riferimento composta (A.5.2.2.4), secondo lo schema riportato in Tabella A3 tale da ottenere il livello di concentrazione prefissato per ogni livello di taratura. Ad esempio, per una taratura a 5 livelli (colonna A) possono essere prestabiliti campioni per la taratura aventi concentrazioni teoriche pari a 0,1 µg/L, 1 µg/L, 2,5 µg/L, 5 µg/L, 10 µg/L (colonna B) prelevando un volume di soluzione secondaria di riferimento composta (A.5.2.2.4) pari al valore riportato in colonna C.
- A.6.4.3** Procedere secondo quanto descritto ai punti A.6.1.1.7-A.6.1.1.16.

Tabella A3. Composizione dei campioni per la curva di taratura

A	B	C
Livello di taratura	Concentrazione corrispondente nel campione* (µg/L)	Prelievo da soluzione secondaria di riferimento composta (A.5.2.2.4) (mL)
1	0,1	0,05
2	1,0	0,50
3	2,5	1,25
4	5,0	2,50
5	10,0	5,00

* valore teorico ottenuto per calcolo sulla base della procedura estrattiva adottata nel metodo

A.7. Analisi LC/MS tandem

A.7.1. Strumentazione analitica e accessori

Cromatografo liquido accoppiato allo spettrometro di massa a triplo quadrupolo, (LC/MS/MS o LC-MS tandem), eventualmente preceduto da sistema automatico di iniezione (autocampionatore), costituito in sequenza da:

- A.7.1.1** Pompa HPLC adatta a gestire microflussi ed eluizione in gradiente binaria equipaggiata di sistema di iniezione a valvola, utilizzando microsiringhe con loop interno da almeno 50 μ L.
- A.7.1.2** Compartimento di termostatazione per la colonna.
- A.7.1.3** Colonna a fase inversa C-18 (150 x 2,1 mm I.D. 5 μ m) o analoghe.
- A.7.1.4** Analizzatore di massa a triplo quadrupolo equipaggiato con sorgente ESI a pressione atmosferica del tipo TIS (*Turbo Ion Spray*) o analogo; il sistema TIS/MS/MS è fatto operare in modalità positiva, utilizzando aria come gas di nebulizzazione, di desolvatazione e nella cella di collisione e azoto come curtain gas.
L'utilizzo di sorgenti di differenti tipologie può comportare la necessità di un processo di ottimizzazione dei parametri fisici e strumentali.
- A.7.1.5** Sistema di acquisizione ed elaborazioni dati.

A.7.2. Fasi mobili

Le separazioni LC/MS/MS sono realizzate in gradiente binario utilizzando come fasi mobili le seguenti soluzioni:

- A.7.2.1** **Soluzione di acido formico 10 mM in acqua ultrapura:** prelevare un volume di soluzione acquosa 1 M di acido formico (A.5.2.1.3) pari a 10 mL tramite idonea pipetta di vetro (A.4.1.6), trasferire quantitativamente in un pallone tarato da 1 L (A.4.1.4) e portare a volume con acqua ultrapura (A.5.1.1).
- A.7.2.2** **Soluzione di acido formico 10 mM in acetonitrile:** prelevare un volume di soluzione acquosa 1 M di acido formico (A.5.2.1.3) pari a 10 mL tramite idonea pipetta di vetro (A.4.1.6), trasferire quantitativamente in un pallone tarato da 1 L (A.4.1.4) e portare a volume con acetonitrile (A.5.1.2).

A.7.3. Determinazione LC/MS su campioni di prova

A.7.3.1. Operazioni preliminari

Attivare l'apparecchiatura e predisporla al funzionamento secondo le procedure operative specifiche o le indicazioni fornite dai manuali d'uso. In particolare:

- ottimizzare i parametri funzionali dello spettrometro di massa e assicurare la corretta calibrazione delle masse;
- assicurarsi che lo strumento raggiunga l'equilibrio e scegliere un fondo scala compatibile con la concentrazione degli ioni da determinare

A.7.3.2. Condizioni operative preliminari

Per le determinazioni in LC/MS tandem predisporre la valvola di iniezione, o in alternativa, un autocampionatore in modo da iniettare nel sistema un volume fisso pari a 50 μ L dell'estratto concentrato e impostare le condizioni strumentali idonee allo scopo riportate, a titolo di esempio, in Tabella A4.

Tabella A4. Esempio di condizioni strumentali (mass-spettrometriche e cromatografiche)

Analita	MRM (<i>m/z</i>)*					
Condizioni MS**		DP	FP	EP	CXP	CE
MC-RR	520>135,5	60	400	10	8	40
	520>127	60	400	10	8	60
MC-LR	995,5>135,5	60	400	10	8	100
	995,5>137,5	60	400	10	8	125
MC-LA	910,5>135,5	55	400	10	9	80
	910,5>776,5	55	400	10	21	25
MC-YR	1045,5>135,5	60	400	10	9	100
	1045,5>213,5	60	400	10	15	84
MC-LF	986,5>478,5	60	400	10	13	30
	986,5>852,5	60	400	10	13	30
MC-LW	1025,5>446,5	30	400	10	13	30
	1025,5>891	30	400	10	13	30
MC-LY	1002,5>135,5	40	400	10	13	90
	1002,5>868	40	400	10	13	30
Dem-MC-RR	513>135,5	60	400	10	8	42
	135,5>127,5	60	400	10	8	60
Dem-MC-LR	981,5>135,5	60	400	10	8	95
	981,5>70	60	400	10	8	125
Nodularina (standard di processo)	825>135,5	60	400	10	8	80
Condizioni LC						
LC	Colonna:	a fase inversa C-18 (150 x 2.1 mm I.D. 5 µm) Altima (Alltech) o analoga.				
	Fase mobile:	fase A: acetonitrile 10 mM acido formico; fase B: acqua 10 mM acido formico.				
	Gradiente (<i>t in min</i>):	$t_0 \rightarrow A = 35\%$; $t_{15} \rightarrow A = 70\%$; $t_{16} \rightarrow A = 100\%$; $t_{20} \rightarrow A = 35\%$; $t_{29} \rightarrow A = 35\%$.				
	Temperatura colonna:	40°C				

* Transizione ione precursore > ione frammento

** Condizioni del TIS: voltaggio 5500 V; Curtain gas flow 10 u.a.; Nebulizer gas flow 12 u.a.; Turbo-gas flow 30 u.a.; CAD flow 6 u.a.

MRM: Multiple Reaction Monitoring; DP: Declustering Potential; FP: Focusing Potential; EP: Entrance Potential; CXP: potenziale di uscita dalla cella di collisione; CE: Collision Energy; u.a.: unità arbitrarie

A.7.3.3. Costruzione della curva di taratura

- A.7.3.3.1** Analizzare i diversi campioni di taratura (A.6.4.), iniettando una aliquota da 50 µL di ciascuna soluzione (A.6.1.1.16) per ciascun livello di taratura prefissato.
- A.7.3.3.2** Analizzare mediante LC/MS tandem, e tabulare il valore del rapporto tra l'area prodotta dalla somma dei segnali relativi alle due transizioni ione precursore>ione prodotto selezionate per ciascun analita e l'area prodotta dal segnale relativo alla transizione ione precursore>ione prodotto per lo standard di processo ($A_{\text{analita}}/A_{\text{standard di processo}}$) in corrispondenza di ogni livello di concentrazione per ciascun analita.
- A.7.3.3.3** Con l'ausilio di un programma dedicato (o di idonee espressioni matematiche) determinare con il metodo dei minimi quadrati, per l'intervallo lineare della curva individuato per es. con il metodo dei residui, l'equazione della retta di taratura $Y = a \cdot X + b$ dove $Y = A_{\text{analita}}/A_{\text{standard di processo}}$, $X =$ concentrazione di ciascun analita espressa in µg/L, $a =$ coefficiente angolare a valore noto, $b =$ intercetta sull'asse delle Y, a valore noto. Data la variabilità conseguente alla dipendenza dalle condizioni cromatografiche verificare periodicamente la validità dell'equazione corrispondente alla retta di taratura, ricavata con il metodo dei minimi quadrati, processando e analizzando due suoi punti.

- A.7.3.3.4** Il coefficiente di correlazione “ r^2 ”, nell’intervallo lineare della curva di taratura, deve essere $\geq 0,98$.
- A.7.3.3.5** Memorizzare i dati di taratura nel metodo cromatografico residente sul sistema di gestione (A.7.1.5).

A.7.3.4. Controllo del bianco

Secondo quanto predisposto nell’ambito delle procedure di controllo qualità (ISS.PGA.903.revXX in Rapporti ISTISAN 07/31) controllare una aliquota di bianco campione non addizionato dallo standard di processo sottoponendola alla stessa procedura analitica prevista per il campione, allo scopo di individuare gli eventuali interferenti presenti nel tracciato cromatografico nell’intorno del tempo di ritenzione degli analiti da ricercare.

A.7.3.5. Identificazione dell’analita

L’identificazione degli analiti deve basarsi sul tempo di ritenzione e sui segnali ionici relativi alle transizioni ione precursore>ione frammento. I dati sull’identificazione degli analiti devono essere ottenuti per confronto in identiche condizioni sperimentali tra il tempo di ritenzione cromatografico relativo per la/le transizione/i diagnostica/che riferite al campione in esame e il tempo di ritenzione cromatografico relativo per la/le transizione/i diagnostica/che riferite all’ultima soluzione di riferimento/curva di taratura.

Per acquisizioni in MRM (*Multiple Reaction Monitoring*), dovranno essere anche osservati i rapporti tra le transizioni diagnostiche. In Figura A1 è riportato un cromatogramma rappresentativo ottenuto dall’analisi LC-MS tandem di un campione bianco e addizionato di una miscela delle microcistine selezionate e dello standard di processo, la nodularina.

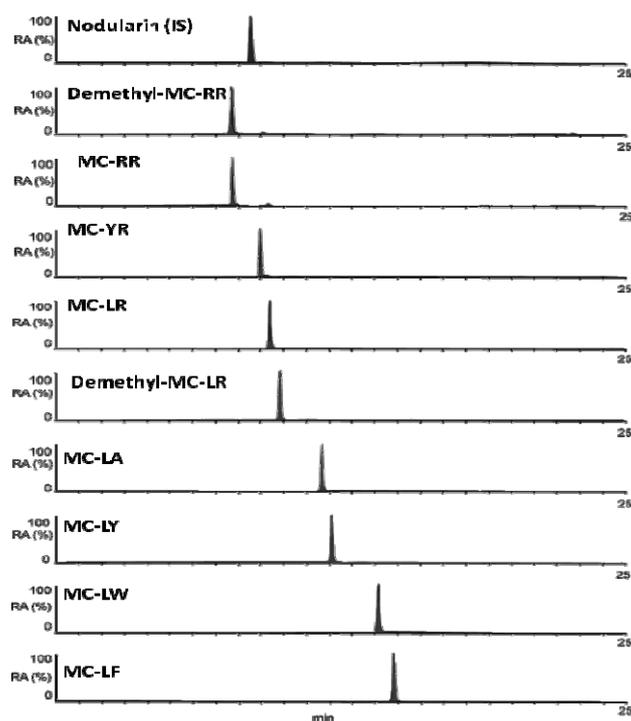


Figura A1. Cromatogramma rappresentativo risultante da un’iniezione di 0,5 L di un campione bianco contaminato con 0,1 $\mu\text{g/L}$ di una miscela delle microcistine selezionate e 1 $\mu\text{g/L}$ dello standard di processo, determinato tramite LC-MS/MS in modalità MRM

A.7.3.6. Analisi quantitativa in LC/MS

- A.7.3.6.1** Analizzare ciascuna aliquota di estratto oggetto di indagine (A.6.1; A.6.2. A.6.3; A.6.4).
- A.7.3.6.2** Dedurre il valore incognito della concentrazione X di ciascun analita nel campione di prova mediante un programma dedicato oppure sostituendo nella equazione della retta di taratura (A.7.3.3.3) il valore della Y ottenuto sperimentalmente per il campione processato.
- A.7.3.6.3** Il valore della Y nel campione di prova deve sempre cadere all'interno dell'intervallo di linearità o riportato in esso per opportuna diluizione del campione.
- A.7.3.6.4** microgrammi per litro ($\mu\text{g/L}$), vengono riportati con una cifra significativa per concentrazioni $\geq 100 \mu\text{g/L}$, con due cifre significative per concentrazione comprese tra 1-100 $\mu\text{g/L}$ e con tre cifre significative per concentrazioni $< 1 \mu\text{g/L}$.

A.8. Prestazioni del metodo

Le caratteristiche di prestazione del metodo ottenute mediante prove intra-laboratorio indicano valori di esattezza, espressa come recupero percentuale, superiori allo 85% e una precisione, intesa come riproducibilità intra-laboratorio ed espressa come deviazione standard relativa, inferiore al 25% per tutti gli analiti oggetto di indagine. Il limite di rivelabilità è compreso nell'intervallo 0,002-0,025 $\mu\text{g/L}$.

A.9. Misure di sicurezza

Le sostanze possono essere assorbite dall'organismo per inalazione, attraverso la cute e per ingestione. Utilizzare idonee misure di protezione individuale (protezione respiratoria, protezione delle mani, protezione degli occhi, protezione della pelle e del corpo).

Effettuare tutte le operazioni descritte in sezione A.5 e A.6 sotto cappa chimica.

APPENDICE B

Metodi per la determinazione delle alghe

Emanuela Viaggiu (a), Simonetta Della Libera (b),
Roberta Congestri (a), Giuseppe Morabito (c)

- (a) Dipartimento di Biologia, Università degli Studi di Roma Tor Vergata, Roma*
*(b) Dipartimento di Ambiente e Connessa Prevenzione Primaria,
Istituto Superiore di Sanità, Roma*
(c) Istituto Studio Ecosistemi, Consiglio Nazionale delle Ricerche, Pallanza

B.0. Generalità e definizioni

Gli aspetti di sintesi di seguito presentati si riferiscono al parametro Alghe rilevato con il metodo ISS A 007A rev. 00 (in Rapporti ISTISAN 07/5).

Cianobatteri e alghe fitoplanctoniche, che vivono in sospensione nella colonna d'acqua, rivestono particolare interesse per la valutazione della qualità delle acque destinate alla potabilizzazione. Particolare rilievo assume la determinazione numerica e tassonomica delle specie di cianobatteri e microalghe potenzialmente tossiche e/o capaci di produrre sostanze odorigene, nonché la sorveglianza sulla periodicità dei fenomeni di fioritura (bloom). Infatti, con adeguate condizioni ambientali, cianobatteri e microalghe possono sviluppare quantità ingenti di biomassa che, in molti casi, determina uno scadimento rapido della qualità delle acque. In aggiunta alcune microalghe e numerosi cianobatteri sono in grado di produrre diverse categorie di tossine. Oltre alle tossine, i cianobatteri possono essere produttori di una grande varietà di sostanze, molte delle quali sono dotate di proprietà odorose acute e persistenti, che possono rendere l'acqua potabilizzata inaccettabile per gli utenti. È stato più volte evidenziato che i trattamenti convenzionali di potabilizzazione delle acque (coagulazione/filtrazione, filtrazione su sabbia, clorazione) sono in grado di rimuovere soltanto basse percentuali di tossine algali disciolte. L'ozono e il carbone attivo granulare sembrano invece avere una elevata efficacia nella rimozione delle cianotossine. Per acque sottoposte a trattamento di potabilizzazione è altresì importante rilevare la presenza di alghe con tendenza alla flottazione, particolarmente difficili da rimuovere nel processo di chiariflocculazione. Per un approfondimento ulteriore dei sistemi di trattamento delle acque ai fini della rimozione delle tossine prodotte dai cianobatteri si rimanda alla sez. 4.2.

Pertanto, per le acque destinate al consumo umano è di fondamentale importanza rivolgere particolare attenzione, soprattutto, al riconoscimento e alla determinazione dei cianobatteri tossici ai fini del controllo e del monitoraggio della qualità delle risorse idriche e della conseguente salvaguardia della salute dell'uomo.

Per quel che concerne l'identificazione e la tassonomia delle alghe e dei cianobatteri presenti nelle acque destinate al consumo umano, e quindi intendersi acque dolci, si rimanda all'ultimo paragrafo dove si riportano testi o siti internet da visitare per un approfondimento di questo argomento.

Nel DL.vo n. 31 del 2001 e successive modifiche e integrazioni, al paragrafo Avvertenza dell'Allegato I, è prevista la determinazione qualitativa del parametro con riferimento ad un litro di campione di acqua, equivalente al volume minimo da analizzare, così come stabilito dal DL.vo n. 27 del 2002. Tuttavia, il metodo di seguito riportato fornisce la possibilità di ottenere anche risultati quantitativi. Ai sensi dell'attuale normativa, le alghe nelle acque superficiali sono utilizzate per stabilire la qualità ecologica. Tuttavia, qualora acque superficiali fossero destinate al consumo umano, ne sarebbe auspicabile l'assenza.

B.1. Campo di applicazione

La procedura analitica ISS A 007A rev. 00 (in Rapporti ISTISAN 07/5) viene utilizzata per la determinazione di alghe nelle acque da destinare e destinate al consumo umano ed eventualmente nelle acque di piscina.

B.2. Principio del metodo

Nonostante la normativa richieda soltanto una determinazione qualitativa della presenza di alghe, con il metodo di seguito riportato viene data la possibilità di quantificare il numero di cellule algali eventualmente presenti. La metodica di seguito descritta fa sempre riferimento al conteggio eseguito con il microscopio invertito su campioni preparati facendo sedimentare un opportuno volume in camere di sedimentazione realizzate per l'uso. Il principio è derivato dal metodo di Utermöhl (1958) (1) che consente di contare le microalghe presenti nel campione d'acqua.

La manipolazione di campioni per analisi biologiche, in generale, può esporre l'operatore al rischio di contatto con organismi patogeni, quindi si raccomanda di seguire le norme di sicurezza previste dal DL.vo 626/1994 e, prima e dopo l'esecuzione dell'osservazione microscopica, procedere alla disinfezione degli oculari del microscopio con disinfettante diluito in acqua.

B.3. Strumentazione e vetreria

Oltre alla normale attrezzatura di laboratorio è necessario avere a disposizione:

- Pipette Pasteur in vetro
- Parafilm
- Microscopio ottico invertito corredato di obiettivi 4x, 10x, 20x, 40x, 60x;
- Micrometro oculare
- Camere di sedimentazione
- Microscopio ottico a luce trasmessa

Si possono usare camere cilindriche in plexiglass fisse da 5, 10 e 25 mL o camere combinate. Quest'ultime sono rappresentate da un cilindro di sedimentazione con capacità di 5, 10, 25, 50, 100 mL accoppiato ad una base cava metallica dove si va ad alloggiare un fondo di vetro di spessore pari a quello di un vetrino coprioggetto, che permette l'osservazione del materiale al microscopio invertito. Poiché con la camera fissa il cammino ottico della luce dal condensatore attraverso la colonna d'acqua del campione è da 1 a 5 cm la risoluzione all'invertoscopia risulta essere meno nitida, pertanto si consiglia la camera combinata, con un cammino ottico <0,5 cm, che consentirà una migliore visione delle cellule sedimentate.

Durante il periodo di sedimentazione, le camere possono essere coperte con capsule di Petri adatte alla camera utilizzata.

La scelta della capacità maggiore o minore delle camere è dettata rispettivamente dalla maggiore o minore presunta presenza numerica di alghe nel campione esaminato.

B.3.1. Pulizia delle camere di sedimentazione

Per maggiore precisione, si descrive l'operazione di pulizia delle camere di sedimentazione.

Riempire la camera di una soluzione acquosa di disinfettante (B.4.2) e lasciarla in contatto con il disinfettante per alcune ore, preferibilmente 3-4 ore; quindi lavare accuratamente la superficie della camera, particolarmente il fondo e la porzione interna che è stata a contatto con il campione di acqua, con detergente cremoso non abrasivo, spugnetta non abrasiva e acqua di rubinetto. Sciacquare con acqua di rubinetto, risciacquare con acqua distillata e mettere ad asciugare in stufa per alcune ore.

In alternativa, è possibile, dopo il risciacquo con acqua distillata, asciugare la camera con carta assorbente e metterla in stufa fino a completa asciugatura. Si tenga presente che eventuali residui algali possono rimanere adesi alle superfici interne delle pareti della camera di sedimentazione col rischio di contaminare il campione della successiva analisi.

Prima di utilizzare la camera per un nuovo campione, è bene verificare al microscopio invertito che il fondo sia perfettamente pulito, prima con l'obiettivo 4x, poi, se necessario, con gli obiettivi a maggiore ingrandimento. Nel caso che la camera sia stata asciugata con carta assorbente, saranno visibili sul fondo alcuni filamenti di carta dall'aspetto caratteristico, che, tuttavia, non interferiranno con la lettura del campione.

B.4. Reagenti e prodotti di consumo

B.4.1. Fissazione

B.4.1.1. Reattivo di Lugol

La soluzione di Lugol è indicata per fissare campioni d'acqua che verranno impiegati per l'analisi quantitativa previa sedimentazione degli stessi. Tale fissativo non è adatto a mantenere tutto il popolamento algale per periodi molto lunghi ma può essere impiegato per fissare campioni destinati alla sedimentazione e quindi alla conta delle cellule in quanto risulta essere meno tossico di altri fissativi. In ogni caso, è consigliabile il suo utilizzo con le dovute precauzioni e possibilmente sotto cappa chimica. Per la preparazione della soluzione occorre sciogliere 10 gr di ioduro di potassio (KI) in 100 mL di acqua distillata e aggiungere 5 g di iodio (I) sciolti precedentemente in 10 mL di acido acetico glaciale come indicato in Tabella B.1.

Tabella B1. Composizione del Lugol

Composizione	
Iodio	5 g
Ioduro di potassio	10 g
Acido acetico glaciale	10 mL
Acqua distillata	100 mL

B.4.1.2. Formaldeide

Questo fissativo è indicato per campioni concentrati, raccolti con il retino o mediante la filtrazione in modo da conservare il materiale a lungo termine. Le concentrazioni finali a cui far riferimento sono di aldeide formica pari a circa 0,8–1,6% corrispondente a volumi di 40-80 mL per litro di campione e per campioni molto ricchi in biomassa si può arrivare a concentrazioni finali più elevate di fissativo anche fino al 4% di aldeide formica. Per ridurre al minimo i danni al materiale è preferibile versare la formalina nella bottiglia prima del campionamento. L'impiego di questo fissativo richiede particolari attenzioni e cautele a causa dell'elevata tossicità del reagente e pertanto occorre maneggiare i campioni sotto cappa e utilizzare guanti protettivi. Il campione una volta fissato va agitato delicatamente per diverse volte in modo da assicurare una completa fissazione.

B.4.2. Soluzione disinfettante

Possono essere utilizzati agenti disinfettanti tipo Desogen o Citrosil al 3% in acqua per la disinfezione degli oculari del microscopio e delle camere di sedimentazione.

B.4.3. Detergente e accessori

Detergente cremoso non abrasivo e spugnetta non abrasiva per la pulizia dei cilindri e delle camere di sedimentazione; risciacquare con acqua deionizzata e successivamente usare carta assorbente per asciugare la camera.

B.5. Procedura

B.5.1. Volume da analizzare

Il volume da sedimentare dipende dalla densità degli organismi nel campione.

Il numero delle particelle deve garantire una sedimentazione indipendente di ogni particella (non si devono formare aggregati).

Con troppe particelle la sedimentazione potrebbe non essere uniforme e il conteggio risulterebbe difficoltoso, mentre con un numero troppo scarso di organismi si rischia un elevato errore di conteggio.

Si può fare una valutazione di massima preparando un sub-campione a concentrazioni diverse.

Come suggerimento generale, sedimentare 10 mL risulta soddisfacente per la maggior parte delle situazioni, quando si lavora su acque superficiali.

In campioni di acque che hanno subito processi di trattamento per la rimozione delle particelle algali, è probabile che la concentrazione fitoplanctonica sia molto bassa. È quindi necessario far sedimentare volumi elevati di campione: in questo caso, 1 L di campione proveniente dall'impianto di trattamento può essere lasciato sedimentare in un cilindro per due giorni previa fissazione. Al termine del periodo, la parte superiore del campione può essere delicatamente rimossa per aspirazione, fino a raggiungere un volume finale del campione da analizzare di circa 100 mL.

Comunque si consiglia di prelevare almeno 1 L di campione proprio garantire l'analisi in laboratorio di una quantità sufficiente di campione.

B.5.2. Campionamento

Per il controllo delle acque destinate al consumo umano sarebbe opportuno eseguire delle indagini a livello dei punti di presa dell'invaso interessato e presso l'impianto di trattamento delle acque per valutare al meglio il protocollo da seguire nel caso di comparsa di alghe tossiche. È opportuno munirsi di bottiglie di plastica scure, pulite e non necessariamente sterili per il trasferimento dei campioni dal punto di raccolta al laboratorio. Dalla bottiglia di campionamento trasferire il campione in un contenitore idoneo (bidone di volume appropriato). Il bidone non va riempito completamente, perché è necessario lasciare un volume libero sufficiente al mescolamento del campione. Il campionamento al lago in corrispondenza dei punti di presa dell'acqua prevede l'utilizzo di bottiglie Niskin per la stima del numero di individui in volumi noti di acqua prelevata a profondità definite lungo un profilo verticale. In aggiunta alla raccolta di campioni d'acqua si consiglia di prelevare il fitoplancton mediante l'utilizzo di retini di maglia compresa tra 10 e 40 µm per analisi e approfondimenti qualitativi utili per l'identificazione degli organismi algali (osservazione caratteri tassonomici chiave, analisi morfometriche delle cellule).

Al potabilizzatore bisognerebbe munirsi di bottiglie di plastica da 1 L scure e prelevare campioni d'acqua prima dell'entrata del trattamento, all'uscita dell'impianto e in un punto della distribuzione idrica. Parte del campione d'acqua prelevato all'entrata potrà essere filtrato in laboratorio con filtri in policarbonato di porosità pari a 5 µm per analisi di tipo qualitativo come già descritto precedentemente. Il filtrato potrà essere risospeso in 1-2 mL di tampone fosfato 0,2 M pH 6,7 oppure in un piccolo volume della stessa acqua filtrata e successivamente fissato con formaldeide (per la concentrazione vedere B.4.1.2.).

B.5.3. Utilizzo del campione fresco

L'impiego di materiale fresco è necessario per osservare e riconoscere microorganismi che potrebbero subire alterazioni in seguito al processo di fissazione. Per esempio le colonie del cianobatterio *Microcystis* sp., dopo fissazione con Lugol, si disgregano quasi completamente e in questo modo risulterà difficile l'osservazione e il riconoscimento della colonia. Proprio la forma e la grandezza della colonia è un importante carattere diagnostico per l'identificazione di questo organismo anche a livello di specie. Il materiale fresco può provenire dal retinato se il campione è raccolto al lago oppure dal filtrato (vedi B.5.2.) se l'acqua è stata raccolta al potabilizzatore. È però fondamentale sottolineare che il campione

fresco non può essere utilizzato per la sedimentazione. Il campione destinato alla sedimentazione deve essere necessariamente fissato, preferibilmente in Lugol, per permettere a tutti gli organismi di depositarsi sul fondo della camera onde evitare una sottostima dei popolamenti presenti. Infatti, alghe provviste di flagelli o strutture che facilitano il galleggiamento rimarrebbero in sospensione nella camera di sedimentazione se non fossero trattate con un fissativo.

B.5.4. Preparazione del campione fissato

La fissazione del campione è necessaria quando si passa al conteggio mediante l'impiego della camera di sedimentazione e osservazione all'invertoscopio. Omogeneizzare il contenuto, capovolgendo diverse volte il bidone. Trasferire il volume opportuno in una bottiglietta di vetro trasparente: evitare il vetro colorato, che non permette di apprezzare la colorazione del campione, se fissato in Lugol. In ogni contenitore lasciare lo spazio sufficiente al mescolamento del campione (circa 20% del volume). Meglio preparare un campione fissato in formalina, uno in Lugol e uno non fissato per un'analisi qualitativa preliminare, che può essere d'aiuto per la determinazione. È possibile fissare il campione aggiungendo reattivo di Lugol (B.4.1.1) a goccia a goccia fino a che l'acqua non assumerà una colorazione "cognac" oppure tenendo conto della concentrazione consigliata al paragrafo B.4.1. Dopo l'aggiunta del Lugol, per la volatilità dei componenti, è necessario coprire i contenitori (bottiglia di prelievo o camera di sedimentazione) e sigillare bene con il parafilm se il campione è contenuto nella bottiglia o, in alternativa, conservare sotto cappa chimica.

È importante sottolineare che la creazione di sub-campioni introduce errori nella distribuzione del fitoplancton e per questo è fondamentale mescolare il campione ogni volta che avviene un suo trasferimento in un contenitore successivo.

B.5.5. Conservazione dei campioni

I campioni dovrebbero essere conservati al buio, in un luogo fresco e asciutto possibilmente a 4°C. La conservazione dei campioni dipende dal fissativo impiegato, con la formalina si hanno tempi più lunghi rispetto agli altri fissativi. È consigliato, perciò, osservare i campioni entro tempi brevi proprio per evitare il deterioramento del materiale in essi contenuti.

B.5.6. Centratrice del microscopio

Per maggiore precisione, si descrive la procedura corretta per la centratrice del microscopio. L'operazione consiste nel mettere a fuoco e centrare il condensatore in modo che la luce che lo attraversa formi l'immagine nella giusta posizione sopra il preparato; in questo modo si ottengono le migliori condizioni di risoluzione e di contrasto. In teoria l'operazione sarebbe da ripetere ad ogni cambio di obiettivo e/o di oculare, ma in pratica è consigliabile eseguirla periodicamente, per mantenere nel tempo le stesse condizioni di lavoro. La procedura prevede le seguenti fasi:

- mettere a fuoco il preparato con l'obiettivo 10x;
- chiudere completamente il diaframma di campo e aprire il diaframma di apertura; nel campo ottico sarà visibile il campo luminoso nella minima estensione consentita;
- alzare al massimo il condensatore ed, agendo sulle apposite manopole, regolarne la posizione in modo da centrare il campo luminoso del diaframma al centro del campo ottico;
- regolare in altezza il condensatore finché i bordi dell'immagine del diaframma di campo non diventano nitidi;
- riaprire parzialmente il diaframma di campo in modo da ottenere un campo luminoso di diametro leggermente inferiore al campo ottico;
- regolare, infine, il diaframma di apertura prima chiudendolo lentamente fino a percepire nell'immagine una variazione di contrasto, quindi riaprendolo leggermente.

Prima e dopo l'esecuzione dell'osservazione microscopica, procedere alla disinfezione degli oculari con un agente disinfettante al 3% in acqua (B.4.2) per evitare la trasmissione di eventuali infezioni oculari da un operatore all'altro.

B.5.7. Screening del campione

Volendo eseguire uno screening del campione prima del conteggio degli organismi, si consiglia di applicare la procedura di seguito descritta.

Lo screening è utile per la valutazione dell'omogenea distribuzione del materiale sedimentato al fine di effettuare la conta mediante l'ausilio di obiettivi a maggiore risoluzione.

Per la fase di screening utilizzare l'obiettivo 4x e osservare tutto il fondo della camera di sedimentazione; questo ingrandimento consente di osservare ogni volta un campo microscopico di 16 riquadri (4 x 4).

Mettere a fuoco i campi per verificare che la sedimentazione sia completata e per rilevare l'eventuale presenza di alghe flottanti annotando l'osservazione nel responso analitico.

Annotare la presenza nel campione di materiale inerte (es. sabbia, carbone, ecc.) o di residui vegetali osservabili nel campo microscopico inquadrato valutandoli come:

- 1 assenti
- 2 rari (1-2)
- 3 alcuni (2-10)
- 4 numerosi (10-20)
- 4 abbondanti (30-100)
- 5 eccessivi (maggiori di 100)

Annotare sul referto la valutazione complessiva della qualità del campione.

B.5.7.1. Esame microscopico

Per quel che riguarda il riconoscimento dei cianobatteri, i campioni possono essere osservati al microscopio ottico a luce trasmessa documentando il materiale osservato con immagini digitali e in epifluorescenza utilizzando un microscopio munito di un set di filtri tra cui quello di eccitazione a 546 nm e di sbarramento a 580 nm. L'impiego della microscopia in epifluorescenza permettere di discriminare in modo selettivo i cianobatteri da tutto il resto del popolamento algale grazie alla presenza di pigmenti fotosintetici quali le ficobiliproteine che possono essere eccitate a determinate lunghezze d'onda emettendo una fluorescenza distinguibile rispetto a quella che potrebbero emettere gli altri pigmenti fotosintetici come per esempio la clorofilla-a.

Si possono utilizzare dei fluorocromi specifici, come ad esempio il DAPI (4',6-Diamidino-2-fenilindolo cloridrato), per la localizzazione del DNA nei filamenti di cianobatteri presenti nei popolamenti e l'analisi microscopica viene effettuata in epifluorescenza utilizzando un microscopio corredato di un set di filtri di eccitazione a 300-440 nm e di emissione a 457-470 nm.

L'osservazione al microscopio invertito permette, non solo il riconoscimento del popolamento algale, ma contemporaneamente permette di stimare anche la quantità di organismi presenti nel campione. L'identificazione dipenderà fortemente dagli obiettivi presenti e quindi di conseguenza dagli ingrandimenti a cui si potrà arrivare e dal tipo di microalga in esame.

Inoltre, per garantire che il campione mantenga una distribuzione casuale e omogenea nel fondo della camera dopo la sedimentazione occorre ridurre al minimo il rischio di agitazione del campione e per questo bisogna avere cura che la camera di sedimentazione sia preferibilmente tenuta vicino al microscopio e appoggiata su di una superficie piana. Per lo stesso motivo, verificare che il microscopio sia perfettamente livellato.

B.5.8. Sedimentazione

Nella fase di sedimentazione è difficile a priori decidere se il campione è sufficientemente denso o viceversa troppo abbondante. Per far sì che nella camera di sedimentazione la popolazione algale sia rappresentativa rispetto a quella presente nella bottiglia occorre mescolare il contenuto capovolgendo almeno 50 volte la bottiglia. Il mescolamento del campione va fatto lentamente proprio per evitare di danneggiare le cellule o le colonie algali. Parte del contenuto della bottiglia si versa nel cilindro di sedimentazione avendo cura di non formare molte bolle e arrivando fino alla massima capienza della camera stessa, dopo di che si chiude la camera mediante un coprioggetto. Il campione viene lasciato sedimentare nella camera fino a quando si può ritenere che la popolazione algale sia scesa completamente sul fondo e questo è dipendente dall'altezza dei cilindri di sedimentazione impiegati.

Nel caso di acque grezze e con elevato contenuto di alghe, mettere a sedimentare un volume non inferiore ai 5 mL, utilizzando camere più piccole e lasciando sedimentare per un periodo minimo di 1 ora e non superiore alle 24 ore. Considerando che per ogni centimetro di altezza della camera occorre 1 ora di sedimentazione, indicativamente sono sufficienti 12 ore per iniziare il conteggio. Per evitare però che sub-campioni con volumi troppo ridotti siano poco rappresentativi del contenuto algale effettivamente presente sarebbe più opportuno diluire il campione iniziale con acqua non deionizzata, fissarlo in Lugol e procedere per la sedimentazione.

B.5.9. Conteggio delle cellule algali

Il conteggio viene effettuato con obiettivi 10x o 20x; per l'identificazione può essere necessario l'ausilio di obiettivi a risoluzione maggiore.

Si consiglia di procedere come di seguito descritto.

Il conteggio delle cellule algali sul fondo della camera di sedimentazione può essere eseguito sull'intera superficie della camera stessa. Tale procedimento però richiede molto tempo, soprattutto quando c'è la necessità di analizzare molti campioni, e perciò sarebbe opportuno ridurre l'area totale di conta. Pertanto si può procedere seguendo una conta per transetti o per campi casuali.

Nel caso si proceda per una conta a transetti questa si realizzerà procedendo nella conta delle cellule algali presenti in ogni campo visivo lungo il diametro dell'intera camera di sedimentazione. L'utilizzo di griglie millimetriche poste sul fondo della camera può guidare l'operatore nella corretta esecuzione della linea lungo il diametro della camera e permettere il calcolo dell'area del transetto. È necessario percorrere almeno due transetti tenendo conto che il campo visivo posto al centro della camera deve essere letto una sola volta. Questo approccio però può sottostimare il campione presente ai margini della camera di sedimentazione (2).

Rimanendo nel metodo di conta secondo l'approccio del transetto si può percorrere una linea Z sul fondo della camera, in questo caso la linea obliqua da seguire verrà disegnata secondo un percorso a 'scalini': si scende di un campo visivo e ci si sposta di lato orizzontalmente. È importante calcolare l'area totale della camera di sedimentazione e l'area del campo visivo per rapportare poi il numero di cellule contate nei campi a quello totale presente nell'intera camera. Tale metodo tiene conto della distribuzione del campione sia al centro che ai margini della camera.

La conta degli organismi algali mediante campi casuali (metodo "Sichtfeld") prevede di posizionare la camera in modo che, una volta osservato un campo, si passa a quello successivo senza vedere attraverso il microscopio proprio per evitare che si operi una selezione o scelta dei campi da osservare. Si può calcolare l'area di Sichtfeld come l'area delimitata da un perimetro ottenuto mediante l'applicazione di una griglia oppure se ciò non fosse possibile allora si può prendere in considerazione l'area descritta dall'intero campo visivo. Il valore di conta finale viene espresso come numero di cellule per mL di campione e pertanto è necessario annotare il numero di aree/campi di Sichtfeld contati, l'area di Sichtfeld e quella dell'intera camera nonché il volume della camera stessa (3).

Altri metodi di conteggio e l'impiego di camere di conta adeguate alla determinazione quantitativa degli organismi algali sono riportati nelle "Metodologie di studio del Plancton marino", ISPRA, Manuali e linee guida 56/2010 e in un lavoro di Rott *et al.*, 2007 (4).

Per l'identificazione può essere utile avvalersi della misura delle dimensioni delle singole alghe presenti, da effettuarsi con l'uso del micrometro oculare e dell'ausilio dei manuali per l'identificazione indicati in bibliografia.

Contare il numero di cellule algali/mL presenti nel campione utilizzando un foglio di calcolo predisposto od applicando la formula descritta in B.5.10.

B.5.9.1. Precisione del conteggio

Il prelievo di un campione d'acqua da un ambiente naturale di solito molto eterogeneo ha associato un errore che può essere più o meno elevato. In seguito, ogni passaggio compiuto per la preparazione di una o più frazioni del campione iniziale da fissare e di una o più ulteriori frazioni per il conteggio, comporta un certo errore. L'accumulo di tutti gli errori influirà, ovviamente, sulla stima della densità della popolazione ottenibile attraverso il conteggio. Tenendo conto di ciò, la precisione del conteggio, per quanto importante di per sé, non è necessario che sia maggiore di quanto giustificato dalla precisione che si ottiene nel campionamento e nelle successive manipolazioni.

La stima della precisione del conteggio può darci una indicazione riguardo alla differenza tra la densità media della popolazione da cui deriva il nostro campione e la densità media calcolata a partire dal numero di organismi conteggiati. Il numero di organismi contati rappresenta dunque il punto chiave della nostra stima: maggiore è questo numero e maggiore sarà la precisione del conteggio.

Peraltro, nella maggior parte dei casi, solamente una frazione dell'area di base della camera di sedimentazione viene esaminata: diventa dunque importante anche il modo in cui le alghe si distribuiscono sul fondo della cameretta. È importante che gli organismi abbiano una distribuzione omogenea e casuale: questo si ottiene preparando il campione per il conteggio secondo la procedura descritta in precedenza (B.5.7.1 e B.5.8).

Se seguiamo queste precauzioni possiamo calcolare la precisione del nostro conteggio utilizzando le equazioni più comuni, la cui applicabilità si basa sull'assunzione che le cellule siano distribuite sul fondo della cameretta secondo una distribuzione di Poisson o secondo una distribuzione normale. Ricordiamo che per densità superiori a 50 cellule la distribuzione di Poisson approssima la distribuzione normale standardizzata.

Supponiamo ora di contare l'intero campione: per popolazioni fino a 50 cellule il livello di precisione ottenibile nel conteggio, sulla base del numero di individui contati, si può ottenere da tabelle o grafici dei limiti fiduciali della distribuzione di Poisson (Tabella B2). Per valori superiori a 50 individui si fa riferimento alla distribuzione normale standardizzata. In questo caso l'intervallo di variazione per la media vera basata su un conteggio di X individui è dato da:

$$X \pm z_{\alpha} \sqrt{X}$$

e la precisione relativa da:

$$z_{\alpha} (100\%) / \sqrt{X}$$

dove z_{α} rappresenta la variabile standardizzata per un certo livello di probabilità α .

Tabella B2. Esempi di intervalli di variazione della media in relazione al numero di individui contati ($\alpha = 0,05$)

N. individui	Intervallo della media	Errore relativo (%)	Distribuzione
5	2-12	60-140	Poisson
10	5-18	50-80	Poisson
50	40-70	20-40	Poisson
100	100 ± 20	20	Normale Standardizzata (z=1,96)
200	200 ± 28	14	Normale Standardizzata (z=1,96)
400	400 ± 39	10	Normale Standardizzata (z=1,96)
800	800 ± 55	7	Normale Standardizzata (z=1,96)

È interessante osservare che ogni volta che raddoppia il numero di cellule contate l'errore relativo non viene dimezzato: di questo si deve tenere conto per ottimizzare lo sforzo di conteggio.

Quando invece si conta una frazione del campione, per esempio un certo numero di campi oculari, oppure una serie di subcampioni si fa riferimento alla distribuzione del t di Student. L'uso della statistica t assume che la popolazione sia normalmente distribuita: se la distribuzione non è normale si può fare un errore più o meno grave, che tuttavia può essere ridotto aumentando il numero n di subcampioni o campi esaminati. Infatti al crescere di questi la distribuzione di t approssima la curva normale standardizzata. In particolare quando $n > 30$ la distribuzione di t e quella di z sono praticamente coincidenti. Dunque la statistica t va usata quando $n < 30$, la popolazione è normalmente distribuita e non si conoscono la sua media μ e la sua varianza σ^2 , ma si conosce o può essere calcolata una varianza s^2 .

Facendo riferimento alla distribuzione di t , l'intervallo della media vera della popolazione e il suo errore relativo sono dati rispettivamente dalle equazioni:

$$\bar{X} \pm t_{(\alpha)(n-1)} \sqrt{s^2 / n}$$

$$\frac{t_{(\alpha)(n-1)} \sqrt{\bar{X} / n}}{\bar{X}} (100\%)$$

dove \bar{X} rappresenta la media degli individui contati nei diversi campi o subcampioni, s^2 la varianza e n il numero di campi o subcampioni. Con densità medie uguali, il parametro $t_{(\alpha)(n-1)}$ è una funzione del numero di campioni, dunque l'errore relativo si riduce aumentando il numero di campioni o di campi esaminati (Tabella B3).

Tabella B3. Esempi di errore relativo in funzione del numero di subcampioni o campi oculari esaminati, ipotizzando una densità media di 50 individui

N. campioni o campi	Errore relativo (%)	$t_{0,05}$	Gradi di libertà
2	127	12,71	1
3	35	4,30	2
5	18	2,78	4
10	10	2,26	9
30	5	2,05	29

B.5.9.2. Determinazione dei valori di densità e biovolume algali

Una volta terminato il conteggio, la densità può essere espressa in individui per millilitro o per litro, tenendo conto della frazione di campione conteggiato e del volume sedimentato. La frazione di campione esaminato si ricava conoscendo il numero totale di campi ottici contenuti nell'area di base della camera di sedimentazione. Questo numero si ottiene, a sua volta, sapendo quale è l'area di base della camera e quale è l'area di un singolo campo ottico. Si ricorda che l'area di un campo varia a seconda dell'ingrandimento utilizzato e di conseguenza la frazione di campione esaminato, anche se il numero di campi è lo stesso. L'area di un campo ottico può essere calcolata con l'uso di un oculare micrometrico.

In molti casi può essere utile stimare il biovolume delle alghe: infatti, non è detto che densità e biovolume si corrispondano, potendo essere presenti con alte densità cellule piccole o, viceversa, cellule grandi con densità più scarse. Il biovolume di una comunità algale è, infatti, spesso correlato con parametri ecofisiologici della comunità stessa, come il contenuto in pigmenti, il tasso di crescita e i rapporti trofici con altri livelli della rete alimentare acquatica. Il volume cellulare di una specie algale può essere molto variabile secondo le stagioni, della latitudine o del tipo di ambiente. Sarebbe quindi opportuno misurare il volume delle specie algali ogni volta che si conta un nuovo campione. In pratica, poiché le misure da effettuare sulle cellule algali per stimare il loro biovolume richiedono molto tempo, si preferisce effettuare qualche decina di misure per ogni specie, nell'arco di un certo periodo di tempo (un anno è l'intervallo migliore), calcolando poi un valore medio di biovolume. Tale valore può essere

mantenuto valido, per le specie sviluppatesi nell'ambiente in cui sono state effettuate le misurazioni, per un periodo di due o tre anni. In generale è meglio non utilizzare misure che si trovano in letteratura, di solito comprese in un ampio intervallo di variazione.

Il biovolume algale viene dunque calcolato assimilando le alghe a forme geometriche semplici. Qualora le cellule avessero una forma complessa, il biovolume si ottiene scomponendo le cellule in parti paragonabili a solidi semplici e calcolando i singoli volumi di questi. Per questo ultimo aspetto si può far riferimento al lavoro di Hillebrand *et al.*, 1999 (5).

B.5.9.3. Misurazione con il micrometro oculare del materiale osservato

Volendo determinare le dimensioni (in μm) degli elementi algali individuati, procedere moltiplicando il numero delle tacche misurate col micrometro oculare per i coefficienti micrometrici (i coefficienti micrometrici si ottengono dal rapporto fra il micrometro-oculare e il micrometro-oggetto), considerando che a ogni obiettivo corrisponde un coefficiente micrometrico.

B.5.10. Calcolo delle cellule algali

Calcolare il numero medio di cellule algali presenti (N .) per mL applicando la seguente formula e riportando il numero a 1000 mL di campione:

$$N./\text{mL} = N_i \times A/a \times 1/N_c \times 1/V$$

dove: N_i numero totale di cellule contate nelle aree considerate

A area totale della camera di sedimentazione in mm^2

a area del campo microscopico in mm^2

N_c numero di campi contati

V volume del campione sedimentato in mL

Nel caso di un conteggio effettuato su transetti o campi casuali N_i rappresenta le unità algali conteggiate in tutti i campi ottici o i transetti esaminati e N_c il numero dei campi ottici esaminati. Nel caso di un conteggio per transetti, calcolare quanti sono i campi compresi in un transetto.

B.6. Casi di studio

Si riportano nei paragrafi successivi alcuni protocolli operativi da seguire nei casi di presenza di cianobatteri potenzialmente tossici nei campioni. In questi esempi si fa riferimento a procedure che utilizzano telecamere o camere digitali per l'acquisizione di immagini dei campi ottici, permettendo di eseguire sia conteggi sia analisi morfometriche degli organismi algali in maniera automatica mediante l'utilizzo di software di analisi d'immagine specifici e che, non solo agevolano il lavoro dell'operatore, ma aumentano il grado di correttezza della conta. Si consiglia di integrare questi metodi con la seguente bibliografia: Bernard *et al.*, 2007 (6); Congestri *et al.*, 2000, 2003 (7, 8); Ernst *et al.*, 2006 (9); Walker & Kumagai 2000 (10); Walsby & Avery, 1996 (11).

B.6.1. *Planktothrix rubescens*

In laboratorio, un campione di 1L di acqua prelevata dal lago a profondità nota o all'impianto di trattamento delle acque, è fissato in soluzione di Lugol e un'aliquota di 25 mL viene sedimentata e osservata dopo 24 ore in camera di conta al microscopio rovesciato per la determinazione quantitativa delle specie di cianobatteri tossigenici.

Una parte del campione deve essere concentrata come descritto nel paragrafo B.5.2. Il materiale fissato in glutaraldeide 2,5% in tampone fosfato 0,2 M, pH 6,7, verrà utilizzato per le osservazioni in microscopia ottica e per le analisi morfometriche secondo le seguenti procedure (12). Per ciascun

campione vengono calcolate le dimensioni cellulari (lunghezza e larghezza della cellula) mediante microscopio ottico a luce trasmessa utilizzando un obiettivo ad immersione con ingrandimento 100x. Sono necessarie almeno 50 misure in modo da poter elaborare un valore medio di lunghezza della cellula, che poi permetterà di determinare il numero medio di cellule per filamento presente in ciascun campo visivo analizzato al microscopio invertito e ricavare, con le dovute proporzioni, il numero finale di cellule per litro d'acqua.

Al microscopio invertito vengono acquisite immagini digitalizzate mediante una macchina fotografica e utilizzando un obiettivo 20x si catturano immagini seguendo uno schema definito a "Z". Si parte dal centro del campione e ci si sposta al limite superiore del cilindro e di qui si scende di tre campi in basso per arrivare al margine sinistro. Le fotografie vengono così scattate da sinistra verso destra, saltando ogni volta un campo, fino al margine destro da cui si riparte in diagonale sino a incontrare nuovamente il limite sinistro e proseguire in linea orizzontale verso destra. Le immagini, trasferite su computer vengono analizzate con programma Adobe Photoshop per misurare la lunghezza dei filamenti in pixels che, dopo un'accurata calibrazione, vengono convertite in micrometri.

Per la conversione dei pixel in micrometri occorre prima acquisire immagini utilizzando un vetrino micrometrico agli stessi ingrandimenti impiegati per il lavoro di conta e successivamente, con l'ausilio di Adobe Photoshop, misurare una distanza tra due punti della scala millimetrica acquisita mediante la camera digitale. Tale distanza rappresenterà un riferimento e tutte le misure effettuate sulle immagini potranno essere rapportate alla misura di riferimento.

Una volta effettuata la calibrazione, utilizzando le immagini acquisite a 20x, occorrerà contare il numero di filamenti presenti in ciascun campo ed eseguire misure morfometriche della lunghezza dei filamenti. È consigliato misurare almeno 50 filamenti ma occorrerà aumentare il numero di misure se il campione è caratterizzato da una presenza abbondante di questo cianobatterio.

Dopo aver misurato la lunghezza dei filamenti e quella delle cellule (vedi sopra) si potrà calcolare la lunghezza media del filamento e quella della cellula. Con questi due valori si potrà calcolare il numero medio di cellule per filamento che, moltiplicato per il numero di filamenti contati, darà il numero di cellule presenti nei campi osservati. Successivamente occorrerà riportare questo numero di cellule al numero di cellule presenti nell'intera camera di sedimentazione (vedi B.5.8) e infine al volume di partenza ovvero al litro di campione.

B.6.2. *Microcystis* sp.

Questo cianobatterio è caratterizzato dalla presenza di cellule riunite a formare delle colonie che possono raggiungere dimensioni notevoli, ogni colonia può essere costituita da centinaia o anche migliaia di cellule. Proprio questa particolarità fa sì che le colonie si presentino come degli agglomerati di cellule difficilmente distinguibili tra di loro per essere enumerate singolarmente e inoltre la tridimensionalità della colonia non permette di stimare in modo accurato il numero di cellule presenti nel campione. Per poter contare questo organismo si può procedere con lo stesso approccio adottato per *Planktothrix rubescens* facendo ricorso all'analisi morfometrica.

Un metodo anche se ancora in una fase sperimentale viene proposto da Defrancesco *et al.*, 2002 (13) dove si possono contare le cellule facendo uso di una camera contaglobuli.

B.6.3. *Anabaena* sp. e *Aphanizomenon* sp.

Il conteggio del numero di cellule di questi cianobatteri può essere eseguito con le procedure descritte nei paragrafi precedenti, senza dover ricorrere all'analisi morfometrica dei filamenti perché la forma delle cellule che caratterizza ciascun filamento è ben distinguibile e facilmente misurabile.

B.7. Interferenze

Possono essere causa di interferenza nella lettura dei risultati la presenza di cristalli e altri materiali, artefatti dovuti alla fissazione o alla raccolta del campione in bottiglie contenenti tiosolfato di sodio; presenza di graffi e di bolle di aria sul fondo della camera di sedimentazione spesso sono dovuti ad errata pulizia della camera.

B.8. Espressione dei risultati

Riportare il risultato ottenuto come numero di cellule/L o mm³/L nel caso del calcolo del biovolume.

B.9. Riferimenti per la stesura dei metodi e per la tassonomia delle alghe

- Dvořák P, Hašler P. Occurrence and morphological variability of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Wolosz.) Seenayya et Subba Raju (Cyanophyta, Nostocales) near Olomouc in 2006. *Fottea* 2007;7:39-42.
- Ettl H, G Gartner. *Susswasserflora von Mitteleuropa: Bd. 10 Chlorophyta II; Tetrasporales, Chlorococcales, Gloeodendrales*. Stuttgart: Gustav Fischer Verlag; 1988.
- Ettl H. *Susswasserflora von Mitteleuropa: Bd. 3: Xanthophyceae (1. Teil)*. Stuttgart: Gustav Fischer Verlag; 1978.
- Ettl H. *Susswasserflora von Mitteleuropa: Bd. 9: Chlorophyta I; Phytomonadina*. Stuttgart: Gustav Fischer Verlag; 1983.
- John DM, Whitton BA, Brook AJ. *The freshwater algal flora of the British Isles. An identification guide to freshwater and terrestrial algae*. Cambridge: Cambridge University Press; 2002.
- Kadlubowska JZ. *Susswasserflora von Mitteleuropa: Bd. 16. Conjugatophyceae I; Chlorophyta VIII. Zygnemales*. Stuttgart: Gustav Fischer Verlag; 1984.
- Komárek J, Komárková J. Review of the European *Microcystis*-morphospecies (Cyanoprokaryotes) from nature. *Czech Phycology* 2002;2:1-24.
- Komárek J, Komárková J. Taxonomic review of the cyanoprokaryotic genera *Planktothrix* and *Planktothricoides*. *Czech Phycology* 2004;4:1-18.
- Komárek J, Komárková J. Diversity of *Aphanizomenon*-like cyanobacteria. *Czech Phycology* 2006;6:1-32.
- Komárek J, Zapomělová E. Planktic morphospecies of the cyanobacterial genus *Anabaena* = subg. *Dolichospermum* – 1. part: coiled types. *Fottea* 2007;7:1-31.
- Komárek J, Zapomělová E. Planktic morphospecies of the cyanobacterial genus *Anabaena* = subg. *Dolichospermum* – 2. part: straight types. *Fottea* 2008;8:1-14.
- Komárek J, Anagnostidis K. *Susswasserflora von Mitteleuropa : Bd. 19/2. Cyanoprokaryota 2. Teil: Oscillatoriales*. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag; 2005.
- Komárek J, Anagnostidis K. *Süßwasserflora von Mitteleuropa: Bd. 19/1 Cyanoprokaryota 1. Teil: Chroococcales*. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag; 2000.
- Krammer K, Lange-Bertalot H. *Susswasserflora von Mitteleuropa: Bd. 2/3. Bacillariophyceae: III: Centrales, Fragilariaceae, Eunotiaceae*. Stuttgart: Gustav Fischer Verlag; 1991.

- Krammer K, Lange-Bertalot H. *Susswasserflora von Mitteleuropa: Bd. 2/4. Bacillariophyceae: IV: Achnantheaceae, Kritische Ergänzungen zu Navicula (Lineolatae) und Gomphonema*. Stuttgart: Gustav Fischer Verlag; 1991.
- Krammer K, Lange-Bertalot H. *Susswasserflora von Mitteleuropa: Bd. 2/1. Bacillariophyceae: I Teil: Naviculaceae*. Stuttgart: Gustav Fischer Verlag; 1997.
- Krammer K, Lange-Bertalot H. *Susswasserflora von Mitteleuropa: Bd. 2/2. Bacillariophyceae: II: Bacillariaceae, Ephithemiaceae, Surirellaceae*. Stuttgart: Gustav Fischer Verlag; 1997.
- Krammer K, Lange-Bertalot H. *Susswasserflora von Mitteleuropa. Bd 2/5. Bacillariophyceae*. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag; 2000.
- Krause W. *Susswasserflora von Mitteleuropa: Bd. 18. Charales (Charophyceae)*. Stuttgart: Gustav Fischer Verlag; 1997.
- Socal G, Buttino I, Cabrini M, Mangoni O, Penna A, Totti C (Ed.). *Metodologie di studio del Plancton marino*. Roma: ISPRA; 2010 (Manuali e Linee Guida 56/2010).
- Mrozinska T. *Susswasserflora von Mitteleuropa: Bd. 14. Chlorophyta VI: Oedogoniophyceae: Oedogoniales*. Stuttgart: Gustav Fischer Verlag; 1985.
- Sournia A (Ed.). *Phytoplankton manual*. Paris: UNESCO; 1978 Disponibile al sito http://www.unesco.org/ulis/cgi-bin/ulis.pl?catno=30788&set=4BDD66DD_2_416&gp=0&lin=1&ll=1); ultima consultazione 7/12/2011.
- Popovsky J, Pfister LA. *Susswasserflora von Mitteleuropa: Bd. 6. Dinophyceae (Dinoflagellida)*. Jena: Gustav Fischer Verlag; 1990.
- CEN 230207 prEN15204. *Water quality – Guidance standard for the routine analysis of phytoplankton abundance and composition using inverted microscopy (Utermöhl technique)*. European Committee for Standardization; 2005.
- Rieth A. *Susswasserflora von Mitteleuropa: Bd. 4. Xanthophyceae. (2. Teil)*. Stuttgart: Gustav Fischer Verlag; 1980.
- Starmach K. *Susswasserflora von Mitteleuropa: Bd. 1. Chrysophyceae und Haptophyceae*. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag; 1985.
- Zapomělová E. Current taxonomic issues with planktonic representatives of the genus *Anabaena* (Cyanobacteria) with special reference to their morphological features; literary review. *Czech Phycology* 2006;6:33-47.

Bibliografia

1. Utermöhl H. Zur Vervollkommnung der quantitativen Phytoplankton-Methodik. *Mitt Int Ver. Theor. Angew Limnology* 1958;9:1-38.
2. Zingone A, Totti C, Sarno D, Cabrini M, Caroppo C, Giacobbe MG, Lugliè A, Nuccio C, Socal G. Chapter 21. Fitoplancton: metodiche di analisi quali-quantitativa. In: Socal G, Buttino I, Cabrini M, Mangoni O, Penna A, Totti C (Ed.). *Metodologie di studio del Plancton marino*. ISPRA; 2010. p. 213-237. (Manuali e Linee Guida 56/2010).
3. Chorus I, Lawton L, Marsalek B, Padisák J. Determination of cyanobacteria in the laboratory. In: Chorus I, Bartram J (Ed.). *Toxic cyanobacteria in water: A guide to their public health consequences, monitoring and management*. G. London: E & FN Spon; 1999. p. 347-67.
4. Rott E, Salmaso N, Hoehn E. Quality control of Utermöhl-based phytoplankton counting and biovolume estimates—an easy task or a Gordian knot? *Hydrobiologia* 2007;578:141-6.
5. Hillebrand H, Durselen CD, Kirschtel D, Pollinger U, Zohary T. Biovolume calculation for pelagic and benthic microalgae. *Journal of Phycology* 1999;35:403-24.

6. Bernard C, Baker P, Robinson B, Monis P. *Application of an image analysis system to enumerate and measure cyanobacteria*. Salisbury, Australia: Cooperative Research Centre for Water Quality and Treatment; 2007. (Research Report 31).
7. Congestri R, Federici R, Albertano P. Evaluating biomass of Baltic filamentous cyanobacteria by image analysis. *Aquatic Microbial Ecology* 2000;22:283-290.
8. Congestri R, Capucci E, Albertano P. Morphometric variability of the genus *Nodularia* (Cyanobacteria) in Baltic natural communities. *Aquatic Microbial Ecology* 2003;32:251-9.
9. Ernst B, Naser S, O'Brien E, Hoeger SJ, Dietrich DR. Determination of the filamentous cyanobacteria *Planktothrix rubescens* in environmental water samples using an image processing system. *Harmful algae* 2006;5:281-9.
10. Walker RF, Kumagai M. Image analysis as a tool for quantitative phycology: a computational approach to cyanobacterial taxa identification. *Limnology* 2000;1:107-15.
11. Walsby AE, Avery A. Measurement of filamentous cyanobacteria by image analysis. *Journal of Microbiological Methods* 1996;26:11-20.
12. Viaggiu E. *Population dynamics and production of toxic compounds by cyanobacteria in Lake Albano (Rome, Italy)*. [PhD Thesis in Evolutionary Biology and Ecology]. Rome: University of Rome Tor Vergata, 2009.
13. Defrancesco C, Costarossa S, Monauni C, Pellegrini G, Pozzi S. Un metodo sperimentale per il conteggio delle cellule di *Microcystis aeruginosa*: dati preliminari. *Biologia Ambientale* 2002;16:7-11.

GLOSSARIO

Ai fini delle presenti linee guida si applicano le seguenti definizioni.

Accuratezza: Scostamento tra il risultato di una prova e il valore di riferimento convenuto. L'accuratezza è determinata dall'esattezza e dalla precisione.

Acque destinate al consumo umano: Si definiscono tali le seguenti tipologie: 1) acque trattate o non trattate, destinate ad uso potabile, per la preparazione di cibi e bevande, o per altri usi domestici, a prescindere dalla loro origine, siano esse fornite tramite una rete di distribuzione, mediante cisterne, in bottiglie o in contenitori; 2) acque utilizzate in un'impresa alimentare per la fabbricazione, il trattamento, la conservazione o l'immissione sul mercato di prodotti o di sostanze destinate al consumo umano, escluse quelle, individuate ai sensi del DL.vo 31/2001 art. 11, comma 1, lettera e), la cui qualità non può avere conseguenze sulla salubrità del prodotto alimentare finale.

Acque interne: Tutte le acque superficiali correnti o stagnanti e tutte le acque sotterranee all'interno della linea di base che serve da riferimento per definire il limite delle acque territoriali.

Acque sotterranee: Tutte le acque che si trovano sotto la superficie del suolo nella zona di saturazione e a contatto diretto con il suolo o il sottosuolo.

Acque superficiali: Le acque interne, ad eccezione delle acque sotterranee; le acque di transizione e le acque costiere, tranne per quanto riguarda lo stato chimico, in relazione al quale sono incluse anche le acque territoriali.

Algoritmo: Procedura costituita da un insieme finito di operazioni semplici ordinate in sequenza per raggiungere un risultato determinato. Termine di uso comune nel campo dell'informatica (algoritmo di classificazione automatica, algoritmi di trasformazione di una immagine, ecc.).

Analisi del rischio: Processo costituito da tre componenti interconnesse: valutazione, gestione e comunicazione del rischio.

Analisi diretta: Determinazione dell'analita eseguita analizzando il campione senza ricorrere a tecniche di estrazione, purificazione e concentrazione. La semplice diluizione o modifica del pH è generalmente intesa come analisi diretta.

Analita: Sostanza che si deve rilevare, individuare e/o quantificare, nonché i derivati che emergono durante la sua analisi.

Assorbimento: Processo fisico nel quale una radiazione che colpisce un materiale viene assorbita e trasformata in un altro tipo di energia, spesso in energia termica

Autorità d'ambito: La forma di cooperazione tra comuni e province ai sensi dell'art. 9, comma 2, della legge 5 gennaio 1994, n. 36, e, fino alla piena operatività del servizio idrico integrato, l'amministrazione pubblica titolare del servizio.

Bacino idrografico: Il territorio nel quale scorrono tutte le acque superficiali attraverso una serie di torrenti, fiumi ed eventualmente laghi per sfociare al mare in un'unica foce, a estuario o delta.

Benthos (o bentos): Categoria ecologica che comprende gli organismi acquatici, sia d'acqua dolce sia marini, che vivono in stretto contatto con il fondo o fissati ad un substrato solido. Essa comprende tutte le alghe fanerogame acquatiche o piante acquatiche, animali che camminano o strisciano, animali sessili e tubicoli, ossia che vivono immersi nel fango con un'estremità che sporge.

C-18: Colonne analitiche per cromatografia liquida a fasi legate, costituite da catene alchiliche a 18 atomi di carbonio come fase stazionaria.

Capping: Realizzazione di uno strato di copertura superficiale.

- Carotenoidi:** Classe di pigmenti organici che si trovano negli organismi fotosintetici. Esistono oltre 600 tipi di carotenoidi conosciuti; vengono normalmente suddivisi in due classi: i caroteni (che sono idrocarburi, quindi privi di ossigeno) e le xantofille (che invece lo contengono). Sono pigmenti accessori che nella fotosintesi consentono di assorbire lunghezze d'onda differenti rispetto alla clorofilla e che proteggono quest'ultima dalla fotoossidazione.
- Clorofilla:** Pigmento di colore verde, presente nelle membrane dei cloroplasti delle cellule vegetali e negli organismi procarioti che realizzano la fotosintesi clorofilliana. La struttura della molecola è caratterizzata dalla presenza di un eterociclo porfirinico, al centro del quale è coordinato uno ione Mg.
- Contenuto extra cellulare di tossine:** Contenuto di tossine nel campione di acqua da attribuire alla sola frazione disciolta nell'acqua, o frazione libera.
- Contenuto intracellulare di tossine:** Contenuto di tossine nel campione di acqua da attribuire alla somma di frazione contenuta all'interno delle cellule (frazione intracellulare) e alla frazione disciolta nell'acqua (frazione extracellulare).
- Contenuto totale di tossine:** Contenuto di tossine nel campione di acqua da attribuire alla frazione contenuta all'interno delle cellule (frazione intracellulare).
- Corpo idrico artificiale:** Un corpo idrico superficiale creato da un'attività umana.
- Corpo idrico fortemente modificato:** Un corpo idrico superficiale la cui natura, a seguito di alterazioni fisiche dovute a un'attività umana, è sostanzialmente modificata, come risulta dalla designazione fattane dallo Stato membro in base alle disposizioni della Dir. 2000/60/CE allegato II.
- Corpo idrico sotterraneo:** Un volume distinto di acque sotterranee contenute da una o più falde acquifere.
- Corpo idrico superficiale:** Un elemento distinto e significativo di acque superficiali, quale un lago, un bacino artificiale, un torrente, fiume o canale, parte di un torrente, fiume o canale, acque di transizione o un tratto di acque costiere.
- Disco di Secchi:** Disco di colore bianco o a spicchi bianchi e neri, di diametro normalmente compreso tra 30 cm e 1 metro utilizzato per una stima della trasparenza delle acque lacustri e marine, valutando la profondità a cui diviene invisibile.
- Effetto matrice:** Variazione della risposta strumentale causata dalla presenza di composti organici e inorganici nel campione da analizzare e differenti dagli analiti da determinare.
- Esattezza:** Concordanza tra il valore medio ottenuto da un'ampia serie di risultati e un valore di riferimento accettato. L'esattezza viene in genere espressa come distorsione precisione.
- Estrazione:** Procedura di isolamento degli analiti dal resto della matrice. Spesso il processo è combinato con un arricchimento della concentrazione dell'analita da determinare.
- Eutrofizzazione (dal greco eutrophia):** Condizione di ricchezza di sostanze nutritive in un dato ambiente. Generalmente individua una sovrabbondanza di nitrati e fosfati in un ambiente acquatico.
- Falda acquifera:** Uno o più strati sotterranei di roccia o altri strati geologici di porosità e permeabilità sufficiente da consentire un flusso significativo di acque sotterranee o l'estrazione di quantità significative di acque sotterranee.
- Fattore limitante:** Elemento presente in minore quantità rispetto al fabbisogno degli organismi, che limita quindi la loro crescita.
- Ficobiline:** Pigmenti idrosolubili presenti nelle membrane fotosintetiche dei cianobatteri e nei cloroplasti delle alghe rosse e delle criptofite, dove svolgono la funzione di pigmenti accessori. Sono presenti nelle membrane fotosintetiche associate a proteine. Si dividono in ficoeritrine, di colore rosso e in ficocianine e alloficocianine di colore azzurro.

- Fitoplancton:** Insieme di organismi autotrofi presenti nel plancton dotati di capacità fotosintetica. Sono cianobatteri e microalghe, ovvero microrganismi in grado di sintetizzare sostanza organica a partire dalle sostanze inorganiche disciolte, utilizzando la radiazione solare come fonte di energia.
- Fiume:** Un corpo idrico interno che scorre prevalentemente in superficie ma che può essere parzialmente sotterraneo.
- Fluorescenza:** Proprietà di alcune sostanze di riemettere, a lunghezza d'onda maggiore e quindi a energia minore, le radiazioni elettromagnetiche ricevute. Un esempio di questo processo lo vediamo in tutti i materiali che contengono pigmenti fluorescenti, come ad esempio nell'inchiostro degli evidenziatori e vernici fluorescenti.
- Fosforo reattivo:** Concentrazione di fosforo misurata per via spettrofotometrica (metodo al molibdato) senza ossidazione del campione.
- Fosforo totale:** Concentrazione di fosforo presente nelle acque, misurata attraverso un'ossidazione del campione e successiva analisi spettrofotometrica. Comprende anche gran parte del fosforo organico disciolto e il fosforo presente negli organismi presenti nel campione.
- Gestione del rischio:** Processo, distinto dalla valutazione del rischio, consistente nell'esaminare alternative di intervento consultando le parti interessate, tenendo conto della valutazione del rischio e di altri fattori pertinenti e, se necessario, compiendo adeguate scelte di prevenzione e di controllo.
- Gestore:** Il gestore del servizio idrico integrato, così come definito dall'art. 2, comma 1, lettera o-bis) del DL.vo 11 maggio 1999, n. 152, e successive modifiche, nonché chiunque fornisca acqua a terzi attraverso impianti idrici autonomi o cisterne, fisse o mobili.
- Graphitized Carbon Black (GCB):** Materiale adsorbente utilizzato per cromatografia.
- HILIC (Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography):** Colonne analitiche per cromatografia liquida a fasi legate, costituite da fase stazionaria polare.
- HLB (Hydrophilic Lipophilic Balanced):** Materiale adsorbente utilizzato per cromatografia ed estrazione, costituito da polimeri con caratteristiche miste idrofiliche e lipofiliche.
- Impianto di distribuzione domestico:** Le condutture, i raccordi, le apparecchiature installati tra i rubinetti normalmente utilizzati per l'erogazione dell'acqua destinata al consumo umano e la rete di distribuzione esterna. La delimitazione tra impianto di distribuzione domestico e rete di distribuzione esterna, di seguito denominata punto di consegna, è costituita dal contatore, salva diversa indicazione del contratto di somministrazione.
- Inquinamento:** L'introduzione diretta o indiretta, a seguito di attività umana, di sostanze o di calore nell'aria, nell'acqua o nel terreno, che possono nuocere alla salute umana o alla qualità degli ecosistemi acquatici o degli ecosistemi terrestri che dipendono direttamente da ecosistemi acquatici, perturbando, deturpando o deteriorando i valori ricreativi o altri legittimi usi dell'ambiente.
- Inquinante:** Qualsiasi sostanza che possa inquinare, in particolare quelle elencate nell'allegato VIII della Direttiva 2000/60/CE.
- Interferente:** Composto della matrice che può interferire nell'estrazione o nella determinazione finale dell'analita, causando falsi positivi/negativi o inattendibilità della analisi quantitativa.
- Ione pseudo molecolare:** Ione registrato in spettrometria di massa e relativo alla massa molecolare del composto. Generalmente si tratta di ioni molecolari con aggiunta o perdita di un protone, del tipo $[M+H]^+$ oppure $[M-H]$.
- Ion-pairing:** Reagente che serve a migliorare la selettività della fase mobile (l'eluente organico) nell'analisi cromatografica. Si tratta di molecole che possiedono una carica opposta a quella dell'analita di interesse e una regione idrofobica che si lega alla fase stazionaria e che, combinandosi con gli ioni dell'eluente e pareggiando le cariche della fase stazionaria, migliora la separazione degli analiti.

Ipolimnio: Strato più profondo e più freddo di un lago.

Lago: Un corpo idrico superficiale interno fermo.

Limite minimo di rendimento: Contenuto minimo di analita in un campione che deve essere rilevato e confermato. Tale limite è volto ad armonizzare il rendimento analitico dei metodi per le sostanze per le quali non è stato stabilito un limite consentito

Litorale: Linea di confine tra la terra e l'acqua di un oceano, golfo, mare o grande lago.

Livello di interesse: Concentrazione della sostanza o dell'analita in un campione che è significativa per determinare la sua conformità alla legislazione.

LOAEL (*Lowest Observed Adverse-Effect Level*): Il più basso livello di dose (esposizione) in cui si osserva un effetto.

Matrice: Insieme di tutte le sue parti, incluse proprietà chimiche e fisiche e influenze reciproche, da analizzare e differenti dagli analiti.

Metalimnio o termoclino: Strato delle acque in cui si verifica un cambiamento di temperatura secondo un gradiente rapido fra lo strato caldo superficiale (*epilimnio*) e quello freddo sottostante (*ipolimnio*).

Metodi biochimici: Metodi di analisi che utilizzano come principio base di determinazione la misura dell'attività biologica di una sostanza tramite la misura delle reazioni biochimiche coinvolte.

Metodi di conferma: Metodi che forniscono informazioni complete o complementari atte ad identificare la sostanza in modo univoco e, se necessario, quantificarla al livello di interesse.

Metodi immunologici: Metodi di analisi che utilizzano come principio base di determinazione una interazione antigene-anticorpo.

Metodo di screening: Metodo utilizzato per rilevare la presenza di una sostanza o di una classe di sostanze al livello di interesse. Tali metodi consentono di analizzare un elevato numero di campioni in tempi brevi e vengono impiegati per vagliare campioni molto numerosi alla ricerca di potenziali risultati non conformi. Sono progettati specificamente per evitare falsi risultati conformi.

Metodo qualitativo: Metodo analitico che identifica una sostanza sulla base delle sue proprietà chimiche, biologiche o fisiche.

Metodo quantitativo: Metodo analitico che determina la quantità o la frazione di massa di una sostanza in modo che possa essere espressa come valore numerico di unità appropriate.

MIP (*Molecular Imprinted Polymer*): Materiale adsorbente utilizzato per estrazione, costituito da polimeri aventi cavità o siti di azione specificamente sviluppati per analiti o classe di analiti.

MS/quadrupolo/quadrupolo: Detector mass spettrometrico quadrupolare a bassa risoluzione, può essere a singolo e triplo.

NOAEL (*No Observed Adverse Effect Level*): Il più alto livello per il quale non si sono statisticamente verificati significativi aumenti di effetti negativi, per frequenza o severità, per la popolazione soggetta ai test, rispetto ad un'opportuna popolazione di riferimento.

NOEL (*No Observed Effect Level*): Il più alto livello per il quale non si sono statisticamente verificati significativi effetti per la popolazione soggetta ai test, rispetto ad un'opportuna popolazione di riferimento.

Orbitrap™: Detector mass spettrometrico ad alta risoluzione.

Pericolo: Una fonte di possibile danno fisico alle persone.

Periodo di piena circolazione: Periodo stagionale, normalmente in inverno, in cui la differenza di temperatura tra epilimnio e ipolimnio non è sufficiente a generare una differenza di densità tale da impedire alla forza del vento di rimescolare completamente le acque del lago. In laghi molto profondi o poco esposti al vento la circolazione può essere solo parziale, non interessando tutto

l'ipolimnio. Si noti che esistono laghi, detti meromittici, in cui uno strato profondo non si rimescola mai con le acque superficiali.

- Precisione:** Concordanza tra i risultati di prove indipendenti ottenuti in condizioni concordate (predeterminate). La misura della precisione è espressa, in genere, in termini di imprecisione e calcolata quale deviazione standard del risultato della prova. Una minore precisione è determinata da una deviazione standard più ampia.
- Pretrattamento:** Operazioni preliminari al trattamento del campione vero e proprio consistente in estrazione e purificazione. Sono esempi di pretrattamento: congelamento, essiccazione, filtrazione e modifica del pH.
- Proprietà ottiche apparenti (*Apparent Optical Properties, AOP*):** Proprietà che dipendono dal medium ma anche dalla struttura geometrica del campo di luce.
- Proprietà ottiche inerenti (*Inherent Optical Properties, IOP*):** Proprietà che dipendono solamente dal medium e risultano pertanto indipendenti dalle condizioni di luce al suo interno.
- Purificazione:** Processo di eliminazione di composti della matrice dall'estratto contenente gli analiti da determinare.
- Radiometro PAR:** Strumento per la misura dell'intensità della radiazione fotosinteticamente attiva, cioè della radiazione luminosa a lunghezze d'onda utilizzabili dalle clorofille. Convenzionalmente si considerano le lunghezze d'onda comprese tra 400 e 700 nm.
- Rapporto di Redfield:** Rapporto teorico ottimale tra carbonio, fosforo e azoto per la crescita delle alghe.
- Riflessione:** Processo per il quale la radiazione che colpisce la superficie di un materiale viene rinviata, tutta o in parte, nello stesso mezzo dall'interfaccia che separa i due mezzi considerati senza che avvenga un cambiamento nella frequenza della radiazione.
- Riproducibilità:** Precisione in condizioni di riproducibilità, ovvero condizioni alle quali si ottengono risultati di prove con lo stesso metodo su elementi di prova identici in laboratori differenti con differenti operatori che utilizzano apparecchiature differenti.
- Rischio:** Funzione della probabilità e della gravità di un effetto nocivo per la salute, conseguente alla presenza di un pericolo.
- Risposta spettrale:** La risposta di un materiale come funzione della lunghezza d'onda dell'energia elettromagnetica incidente, particolarmente in termini di energia misurabile emessa o riflessa.
- Robustezza:** Misura della capacità di una procedura analitica di non essere alterata da piccole (deliberate) variazioni dei parametri che, a priori, possono prevedibilmente influenzarne i risultati. Qualifica l'affidabilità della procedura durante il lavoro di routine.
- Saggio biologico:** Determinazione dell'attività o della quantità di materiale biologicamente attivo, mediante la misurazione dei suoi effetti su organismi viventi.
- Selettività:** Capacità di una tecnica analitica di non risentire della presenza d'interferenti o d'altri componenti diversi dall'analita in esame. Talvolta si usa il termine specificità per esprimere la stessa proprietà. La selettività di un metodo analitico nei confronti di due diversi analiti può essere espressa per mezzo del rapporto delle loro sensibilità.
- Sensibilità:** Rapporto tra la variazione del segnale (risponso) e la variazione dello stimolo (es. concentrazione) che l'ha prodotta. Nel caso dei diagrammi di calibrazione, la sensibilità è la pendenza della funzione di calibrazione: può essere costante o meno.
- Sensore:** Qualsiasi dispositivo che raccoglie l'energia elettromagnetica proveniente dalla scena e la converte in un segnale elettrico che porta informazioni relative alla scena stessa. Sotto questo termine, per assimilazione, viene anche designata la camera fotografica.
- Servizi idrici:** Tutti i servizi che forniscono alle famiglie, agli enti pubblici o a qualsiasi attività economica.

Sorveglianza sindromica: Sistemi di sorveglianza epidemiologica basati non sulla diagnosi di malattia, ma sulla presenza di un insieme di segni e sintomi, che costituiscono una sindrome. Questo tipo di sorveglianza è meno specifica ma allo stesso tempo è molto più sensibile, perché prende in considerazione anche tutti i casi di diagnosi incerta che altrimenti non verrebbero segnalati dai medici. Questi sistemi hanno quindi l'obiettivo di identificare precocemente potenziali minacce per la salute pubblica, in modo da mettere in atto una risposta rapida per ridurre morbilità e mortalità, e possono utilmente integrare le informazioni che derivano dalle sorveglianze dei casi di malattie già in vigore nella maggioranza delle nazioni.

Sottobacino: Il territorio nel quale scorrono tutte le acque superficiali attraverso una serie di torrenti, fiumi ed eventualmente laghi per sfociare in un punto specifico di un corso d'acqua (di solito un lago o la confluenza di un fiume).

SPE (Solid Phase Extraction): Tecnica di estrazione basata sulla cromatografia solido-liquida, che utilizza diversi materiali adsorbenti solitamente inseriti in cartucce.

Specificità: Capacità di un metodo di distinguere tra l'analita che si intende misurare e le altre sostanze. Tale caratteristica è prevalentemente una funzione della tecnica di misura descritta, ma può variare in base alla classe del composto o della matrice.

Spettrometro: Spettrometro in grado di misurare la densità del flusso raggianti delle linee di emissione o di assorbimento della sorgente su tutto lo spettro. Lo spettrometro realizza immagini di una scena simultaneamente in molte strettissime bande spettrali contigue. A ogni pixel, anziché pochi valori di radianza, viene quindi associato uno spettro continuo che può essere usato per identificare le caratteristiche di sorgente di luce.

Standard interno/standard di processo: Sostanza non contenuta nel campione avente proprietà fisico-chimiche il più possibile simili a quelle dell'analita da identificare e che viene aggiunta ad ogni campione nonché ad ogni soluzione di calibrazione.

Stratificazione estiva: Periodo stagionale in cui la differenza di temperatura tra le acque superficiali calde e quelle profonde fredde è sufficiente a mantenere una stratificazione stabile.

Stratificazione termica: Formazione all'interno di un lago di due strati a densità differente a causa di differenze di temperatura. Nei laghi sufficientemente profondi delle aree temperate si ha genere una stratificazione estiva, con uno strato superiore (epilimnio) più caldo delle acque profonde (ipolimnio). Nelle aree più fredde si può formare una stratificazione inversa invernale, con le acque superficiali a temperatura inferiore rispetto alle acque profonde che avranno la temperatura di massima densità dell'acqua (circa 4°C).

Strato eufotico: Strato d'acqua in cui si può verificare la fotosintesi, convenzionalmente inteso come lo strato d'acqua in cui l'intensità luminosa è pari o superiore all'1% dell'intensità luminosa che raggiunge la superficie lacustre.

Studio di coorte: Sorveglianza dell'insorgenza di eventi sanitari in un gruppo che sperimenta una data esposizione ad un fattore di rischio, in un periodo di tempo selezionato. Lo studio di coorte permette di verificare i possibili fattori di rischio di una popolazione attraverso il confronto della diversa incidenza di un determinato evento sanitario (es. una malattia da esposizione a cianotossine), fra il gruppo esposto al fattore di rischio, e il gruppo non esposto.

Studio ecologico: Studi dell'associazione tra una variabile indipendente (fattore di rischio) e una variabile dipendente (tasso di morbosità). L'unità di osservazione è costituita da una popolazione o da una comunità. Vengono misurati sia il fattore di rischio che il tasso di morbosità.

TDI (Tolerable Daily Intake): Dose che può essere ingerita ogni giorno per tutto l'arco della vita senza avere alcun rischio apprezzabile per la vita.

Trappola ionica: Detector mass spettrometrico, può essere a configurazione tridimensionale o lineare (LIT).

Valore guida: Valore di concentrazione di una specie chimica o agente microbiologico che, considerando un consumo effettivo nell'arco di tutta la vita, non comporta alcun rischio significativo per la salute.

Valutazione del rischio: Processo su base scientifica costituito da quattro fasi: individuazione del pericolo, caratterizzazione del pericolo, valutazione dell'esposizione al pericolo e caratterizzazione del rischio

Zooplankton: Costituisce con il fitoplancton e il batterioplancton una delle tre parti del plancton ed è composto da organismi animali, ma che si lasciano trasportare dalla corrente. Lo zooplankton viene usualmente diviso in tre fasce in funzione delle dimensioni degli individui: mesozooplankton, macrozooplankton, megaplankton.

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

Roma, ottobre-dicembre 2011 (n. 4) 24° Suppl.