ISTITVTO SVPERIORE DI SANITÀ

RAPPORTI ISTISAN 14|20

ISSN: 1123-3117 (cartaceo) • 2384-8936 (online)

Cianobatteri: linee guida per la gestione delle fioriture nelle acque di balneazione

A cura di
E. Funari, M. Manganelli ed E. Testai

AMBIENTE
E SALUTE

ISTITUTO SUPERIORE DI SANITÀ

Cianobatteri: linee guida per la gestione delle fioriture nelle acque di balneazione

A cura di
Enzo Funari, Maura Manganelli ed Emanuela Testai
Dipartimento di Ambiente e Connessa Prevenzione Primaria

ISSN: 1123-3117 (cartaceo) • 2384-8936 (online)

Rapporti ISTISAN
14/20

Istituto Superiore di Sanità
Cianobatteri: linee guida per la gestione delle fioriture nelle acque di balneazione.
A cura di Enzo Funari, Maura Manganelli ed Emanuela Testai
2014, v, 254 p. Rapporti ISTISAN 14/20

I cianobatteri sono diffusi in moltissimi ambienti acquatici, dove possono produrre cianotossine con diversi profili tossicologici. Il presente rapporto riporta le linee guida per la gestione delle fioriture di cianobatteri nelle acque di balneazione, elaborate da un gruppo di esperti. La prima parte sintetizza le attuali conoscenze scientifiche su vari aspetti, fra cui la loro presenza nei laghi italiani, le caratteristiche chimiche e tossicologiche delle varie cianotossine, gli effetti osservati sulla salute dell'uomo e la valutazione del rischio. La seconda parte definisce le linee guida per prevenire effetti dannosi per la salute dei bagnanti e gestire il rischio associato alle fioriture. Vengono fornite indicazioni per pianificare attività di monitoraggio ambientale e sorveglianza sanitaria nelle aree a maggiore criticità. Viene inoltre presentato un sistema di reportistica, ambientale e sanitario, anche allo scopo di uniformare le informazioni a livello nazionale. Il rapporto è completato dalle indicazioni tecniche rivolte alle strutture territoriali preposte.
Parole chiave: Balneazione; Tossine biologiche; Valutazione del rischio

Istituto Superiore di Sanità
Cyanobacteria: guidelines for managing blooms in bathing waters.
Edited by Enzo Funari, Maura Manganelli and Emanuela Testai
2014, v, 254 p. Rapporti ISTISAN 14/20 (in Italian)

Cyanobacteria thrive in many aquatic environments, where they can produce cyanotoxins with different toxicological profiles. This report provides the guidelines for the management of cyanobacterial blooms in bathing water, put together by a group of experts. The first part summarizes the current scientific knowledge on various aspects, including their presence in the Italian lakes, chemical and toxicological characteristics of different cyanotoxins, the observed effects on human health and the risk assessment. The second part defines the guidelines to prevent harmful effects on the health of bathers and manage the risk associated with blooms. It provides recommendations for planning environmental monitoring activities and a health surveillance system in most critical areas. It also introduces an environmental and health reporting system, with the purpose to standardize the information at national level too. The report is supplemented by technical information aimed at territorial authorities in charge.
Key words: Bathing water; Risk assessment; Biological toxins

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

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

Citare questo documento come segue:
Funari E, Manganelli M, Testai E (Ed.). *Cianobatteri: linee guida per la gestione delle fioriture nelle acque di balneazione.* Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2014. (Rapporti ISTISAN 14/20).

Legale rappresentante dell'Istituto Superiore di Sanità: *Gualtiero Ricciardi*
Registro della Stampa - Tribunale di Roma n. 114 (cartaceo) e n. 115 (online) del 16 maggio 2014

Direttore responsabile della serie: *Paola De Castro*
Redazione*: Paola De Castro* e *Sandra Salinetti*
La responsabilità dei dati scientifici e tecnici è dei singoli autori.

© *Istituto Superiore di Sanità 2014*
viale Regina Elena, 299 – 00161 Roma

INDICE

Introduzione 1

PARTE A
Sintesi delle conoscenze disponibili

A1. Fattori inerenti allo sviluppo di fioriture di cianobatteri tossici con particolare riferimento a eutrofizzazione e cambiamenti climatici
Nico Salmaso, Diego Copetti, Licia Guzzella, Maura Manganelli, Eleonora Masala, Luigi Naselli-Flores 5
A1.1. Introduzione 5
A1.2. Principali caratteristiche dei cianobatteri e cenni di tassonomia 6
A1.2.1. Caratteristiche principali dei cianobatteri 6
A1.2.2. Approcci tassonomici e ausili per l'identificazione e classificazione delle specie 8
A1.3. Localizzazione delle popolazioni cianobatteriche, classificazione delle fioriture, e specie responsabili 9
A1.4. Fattori che favoriscono lo sviluppo dei cianobatteri 10
A1.4.1. Eutrofizzazione: fosforo e azoto, e rapporti azoto:fosforo 10
A1.4.2. Variazioni climatiche a differenti scale temporali 12
A1.4.3. Mescolamento e caratteristiche idrodinamiche 14
A1.4.4. Interazione tra eutrofizzazione e fluttuazioni climatiche 15
A1.4.5. Aumento dell'intensità di inondazioni e diffusione dei cianobatteri tossici in ambienti estuariali 16
A1.5. Controllo del galleggiamento e velocità di migrazione verticale 16
A1.5.1. Regolazione della densità intracellulare e controllo del galleggiamento 17
A1.5.2. Velocità di migrazione verticale 18
A1.6. Produzione di cianotossine 19
A1.7. Innesco delle fioriture di cianobatteri: casi studio 20
A1.7.1. Sviluppi metalimnetici e superficiali di *Planktothrix rubescens* 21
A1.7.2. Fioriture superficiali di *Dolichospermum lemmermannii* 22
A1.7.3. Fioriture di *Microcystis aeruginosa* 24
A1.7.4. Altri tipi di fioriture 25
A1.8. Conclusioni 25
Bibliografia 27

A2. Profilo tossicologico delle cianotossine
Emanuela Testai, Franca M. Buratti 37
A2.1. Introduzione 37
A2.2. Effetti dovuti ad esposizione per la via orale 38
A2.2.1. Microcistine e nodularine 38
A2.2.2. Cilindrospermopsina 43
A2.2.3. Anatossina-a e omoanatossina-a 46
A2.2.4. Anatossina-a(s) 47
A2.2.5. Saxitossina e analoghi 48
A2.2.6. β-N-metilamino-L-alanina (BMAA) 50
A2.3. Effetti dovuti ad esposizione per la via cutanea 51
A2.3.1. Endotossine LPS 51

A2.3.2. Altre cianotossine 53
A2.3.3. Tossine tropicali 54
A2.4. Effetti dovuti ad esposizione per la via inalatoria 55
Bibliografia 56

A3. Effetti sull'uomo associati ad esposizione a cianobatteri e cianotossine
Emanuela Testai, Franca M. Buratti 67
A3.1. Introduzione 67
A3.2. Attività balneari e ricreative 67
A3.3. Emodialisi 74
A3.4. Acqua potabile 75
A3.5. Esposizione attraverso la dieta 77
A3.6. Un caso particolare: cianotossine e malattie neurodegenerative 80
A3.7. Conclusioni 81
Bibliografia 83

A4. Valutazione del rischio associato all'esposizione alle cianotossine
Emanuela Testai, Enzo Funari 89
A4.1. Introduzione 89
A4.2. Rischio cronico 90
A4.3. Rischio subcronico 92
A4.4. Rischio acuto 93
A4.5. Linee guida dell'OMS per le acque di balneazione 93
Bibliografia 94

A5. Profili delle acque di balneazione nella gestione delle fioriture di cianobatteri
Roberta De Angelis, Massimo Scopelliti 96
A5.1. Introduzione 96
A5.2. Individuazione del potenziale di proliferazione cianobatterica nel profilo dell'acqua di balneazione 98
A5.3. Conclusioni 99
Bibliografia 100

A6. Modelli matematici per la previsione delle fioriture di cianobatteri
Antonello Bruschi, Maria Luisa Cassese, Francesco Lalli, Valeria Pesarino 102
A6.1. Introduzione 102
A6.2. Modelli matematici per la previsione delle fioriture di cianobatteri 102
A6.2.1. Modelli di regressione 103
A6.2.2. Reti neurali artificiali 105
A6.2.3. Modelli teorico-numerici per idrodinamica, biochimica e processi biotici 107
A6.3. Utilizzo di strumenti di modellistica matematica 110
A6.4. Conclusioni 111
Bibliografia 112

A7. Situazione nazionale: corpi idrici interessati da cianobatteri tossici
Maura Manganelli, Emanuela Viaggiu, Rossella Barone, Fabio Buzzi, Francesca Caviglia, Roberta Congestri, Diego Copetti, Roberta De Angelis, Feliciana Godeas, Licia Guzzella, Eleonora Masala, Luigi Naselli-Flores, Nico Salmaso, Simona Scardala 116
A7.1. Distribuzione di cianobatteri nei bacini italiani: frequenza, abbondanza e produzione di tossine 116
A7.1.1. Area settentrionale 117

A7.1.2. Area centrale 120
A7.1.3. Area meridionale e insulare..... 122
A7.2. Principali specie di cianobatteri tossici in Italia
e indicazioni sulla produzione di tossine 123
A7.2.1. Specie che formano fioriture superficiali durante il periodo di balneazione..... 124
A7.2.2. Specie che formano fioriture superficiali
in momenti diversi dal periodo di balneazione 128
A7.2.3. Specie bentoniche presenti in piccoli bacini 129
A7.3. Differenze e similitudini fra la situazione italiana e altri Paesi..... 130
A7.4. Conclusioni..... 133
Bibliografia 134

A8. Carenze conoscitive in ambito sanitario, spunti per la ricerca, priorità
Enzo Funari, Maura Manganelli, Emanuela Testai 144

PARTE B
Linee guida

B1. Razionale per la definizione delle linee guida e contesto internazionale
Enzo Funari, Maura Manganelli, Emanuela Testai 149
B1.1. Aspetti sanitari 149
B1.1.1. Esposizione per ingestione 149
B1.1.2. Esposizione per contatto diretto con l'acqua (cutanea, orale e inalatoria)..... 151
B1.1.3. Esposizione per inalazione 151
B1.2. Indirizzi internazionali: sorveglianza e informazione al pubblico 152
B1.2.1. Australia 152
B1.2.2. Danimarca 153
B1.2.3. Finlandia..... 153
B1.2.4. Francia..... 154
B1.2.5. Paesi Bassi..... 154
B1.2.6. Nuova Zelanda 156
B1.2.7. Stati Uniti 157
B1.3. Conclusioni 157
Bibliografia 157

B2. Piano di sorveglianza
Enzo Funari, Maura Manganelli, Emanuela Testai 158
B.2.1. Monitoraggio ambientale di cianobatteri nelle acque di balneazione 158
B2.1.1. Potenziale di proliferazione dei cianobatteri 158
B2.1.2. Monitoraggio delle fioriture di cianobatteri 159
B2.2. Piano di sorveglianza sanitaria..... 161
Bibliografia 163
Allegato 1 al capitolo B2. Fasi del piano di sorveglianza e azioni da intraprendere
nelle aree ad elevato e medio rischio di fioritura di cianobatteri..... 164
Allegato 2 al capitolo B2. Scheda di raccolta dati essenziali per la descrizione
di casi di possibile intossicazione umana da ciano tossine..... 165

B3. Conferimento dati e reportistica
Maura Manganelli, Enzo Funari, Liana Gramaccioni..... 167
B3.1. Flussi informativi 167

B3.2. Raccolta dei dati e reportistica 167
Allegato al capitolo B3. Scheda per la raccolta dati sui cianobatteri 169

B4. Informazione al pubblico
Enzo Funari 171

PARTE C
Indicazioni tecniche per campionamento e metodi di analisi

C1. Campionamento
Maura Manganelli, Eleonora Masala, Daria Barberis, Giuseppina Mattiolo, Cristina Mosconi, Nico Salmaso 177
C1.1. Scelta dei punti di monitoraggio 177
C1.2. Frequenza di monitoraggio 178
C1.3. Ispezione visiva 178
C1.4. Modalità di campionamento dell'acqua 178
C1.5. Prelievo di campioni di schiume superficiali 179
C1.6. Prelievo di campioni dalla colonna d'acqua 179
C1.7. Campionamento cianobatteri bentonici 179
C1.8. Trasporto e conservazione dei campioni 180
Bibliografia 180

C2. Analisi tassonomiche e conteggio
Rossella Barone, Roberta Congestri, Maura Manganelli, Emanuela Viaggiu 181
C2.1. Identificazione tassonomica 181
C2.1.1. Introduzione 181
C2.1.2. Strumentazione 183
C2.1.3. Chiavi di identificazione 183
C2.1.4. Espressione dei risultati 186
C2.2. Stima della densità 186
C2.2.1. Metodo Utermöhl 186
C2.2.2. Metodo in epifluorescenza su filtri a membrana 188
C2.2.3. Conteggio 190
C2.2.4. Espressione dei risultati 192
C2.3. Calcolo del biovolume/biomassa 192
C2.3.1. Importanza della stima biovolumetrica 192
C2.3.2. Forme geometriche di riferimento 192
C2.3.3. Espressione dei risultati 193
Bibliografia 193
Allegato 1 al capitolo C2. Schede descrittive dei nuovi generi di cianobatteri 196
Allegato 2 al capitolo C2. Schede descrittive dei più comuni generi e morfospecie di cianobatteri rinvenuti in Italia 197

C3. Metodi chimici per l'analisi delle cianotossine nelle acque di balneazione
Leonardo Cerasino, Sara Bogialli, Licia Guzzella, Simona Scardala 201
C3.1. Introduzione e procedure generali 201
C3.1.1. Generalità sulla preparazione del campione 202
C3.1.2. Analisi di campioni di acqua 202
C3.1.3. Analisi di tessuti 203
C3.2. Microcistine 204

C3.2.1. Introduzione 204
C3.2.2. Analisi di campioni di acqua 205
C3.2.3. Estrazione da bloom 206
C3.2.4. Estrazione da tessuti 207
C3.3. Anatossine 207
C3.3.1. Introduzione 207
C3.3.2. Analisi di campioni di acqua 208
C3.3.3. Estrazione da bloom 209
C3.3.4. Estrazione da tessuti 209
C3.4. Saxitossine 210
C3.4.1 Introduzione 210
C3.4.2. Prelevamento e conservazione del campione 211
C3.4.3. Preparazione del campione 211
C3.4.4. Estrazione da bloom 211
C3.4.5. Purificazione 212
C3.4.6. Separazione cromatografica e rilevazione 212
C3.5. BMAA 213
C3.5.1. Introduzione 213
C3.5.2. Estrazione e purificazione 214
C3.5.3. Separazione cromatografica e rilevazione 214
C3.6. Cilindrospermopsine 216
C3.6.1. Introduzione 216
C3.6.2. Analisi di campioni di acqua 218
C3.6.3 Analisi di tessuti 218
C3.6.4. Metodi di rivelazione 218
Bibliografia 219

C4. Analisi immunoenzimatiche

Mara Stefanelli, Francesca Caviglia 224
C4.1. Caratteristiche generali del metodo 224
C4.2. Tipologia di ELISA disponibili 225
C4.3. Protocollo di analisi con kit ELISA su micropiastre ed eventuali interferenze 228
C4.3.1 Preparazione del campione 228
C4.3.2 Interferenze e cause di errore 229
C4.3.3 Quantificazione 231
C4.3.4. Affidabilità, sensibilità e utilità del metodo: quando applicarli 233
C4.4. Altri kit per l'analisi di anatossina-a 234
Bibliografia 234

C5. Metodi molecolari nella identificazione di cianobatteri tossici

Susanna Vichi, Domenico D'Alelio 236
C5.1. Introduzione 236
C5.2. Identificazione e caratterizzazione molecolare dei cianobatteri 236
C5.2.1. Preparazione del campione ed estrazione del DNA 238
C5.2.2. Rilevamento a livello di genere 238
C5.2.3. Rilevamento a livello di specie 241
C5.3. Stima quantitativa degli individui tossici attraverso qPCR 244
C5.3.1. Preparazione del campione 246
C5.3.2. SYBR-green e *Taq Nuclease Assay*: principi fondamentali e applicazioni nell'ecologia dei cianobatteri 247
Bibliografia 251

INTRODUZIONE

Enzo Funari, Maura Manganelli, Emanuela Testai
Dipartimento di Ambiente e Connessa Prevenzione Primaria, Istituto Superiore di Sanità, Roma

I cianobatteri sono organismi procarioti autotrofi, diffusi nella maggior parte dei corpi d'acqua in quasi tutti gli habitat. La loro presenza è considerata un problema sanitario emergente perché possono produrre cianotossine con diversi effetti tossicologici. Il numero delle tossine conosciute finora è probabilmente una percentuale limitata delle tossine effettivamente prodotte e il loro profilo tossicologico spesso non è noto. La crescente diffusione dei cianobatteri, dovuta principalmente all'eutrofizzazione e ai cambiamenti climatici, fa prevedere un aumento dell'esposizione alle cianotossine. Casi gravi associati all'esposizione alle cianotossine si sono verificati dopo l'uso di acqua contaminata per emodialisi; comunque sono stati riportati effetti associati ad altri tipi di esposizione, tra cui quella dovuta ad attività ricreative e di balneazione.

Il presente rapporto riporta le linee guida per la gestione delle fioriture di cianobatteri nelle acque di balneazione.

La parte A sintetizza le conoscenze scientifiche disponibili su questo ampio gruppo di organismi, riguardanti l'ecologia, la distribuzione e la presenza nei laghi italiani. Riassume le informazioni disponibili riguardanti le caratteristiche chimiche e tossicologiche delle varie cianotossine conosciute, gli effetti sull'uomo e la valutazione del rischio al livello attuale delle conoscenze. Presenta, infine, diversi modelli matematici predittivi. Questa parte viene conclusa evidenziando le carenze conoscitive ancora numerose che sarebbe quanto mai opportuno colmare.

La parte B definisce le linee guida per gestire il rischio associato alle fioriture di cianobatteri nelle acque di balneazione. Le linee guida rappresentano un aggiornamento dell'Allegato B del DM 30 marzo 2010 (Ministero della Salute, 2010), reso possibile grazie all'esperienza maturata negli anni della loro applicazione e al contributo di un nutrito gruppo di esperti. L'attività di aggiornamento è stata basata sulle nuove informazioni disponibili nella letteratura scientifica e sulle valutazioni di organismi internazionali. Le linee guida sono finalizzate a tutelare la salute dei bagnanti e dei frequentatori delle spiagge e dei litorali rispetto alle possibili vie di esposizione (orale, cutanea, inalazione), tenendo conto della possibilità di produzione di cianotossine conosciute alle quali sono legati i rischi maggiori. Propone il monitoraggio ambientale nelle aree a rischio, e una possibile procedura di sorveglianza sanitaria da predisporre nelle aree a maggiore criticità.

Nel rapporto viene descritto il sistema di reportistica e conferimento dei dati del monitoraggio ambientale e della sorveglianza sanitaria e vengono forniti i criteri e alcuni esempi per l'informazione al pubblico.

Nella parte C del rapporto sono riportate le indicazioni tecniche rivolte alle strutture territoriali preposte alla sorveglianza delle fioriture di cianobatteri.

Anche sulla base di consolidate esperienze internazionali, è stato dato un ampio risalto alla necessità di informazione ai cittadini. Questo aspetto ha il duplice obiettivo di proteggere la loro salute da eventi improvvisi, come gli accumuli di schiume superficiali, che possono verificarsi nel giro di poche ore e sfuggire perciò al controllo dei tecnici, e di avviare un rapporto collaborativo di feedback, che faciliti l'attività di controllo da parte delle istituzioni.

Molte sono ancora le carenze conoscitive che impediscono la definizione completa dei possibili scenari di esposizione, limitando la possibilità di condurre un'adeguata valutazione del

rischio. In questo senso, la proposta di uniformare la raccolta dei dati di monitoraggio e di sorveglianza sanitaria rappresenta un punto di partenza fondamentale per raggiungere alcuni importanti obiettivi. Infatti, questo sistema dovrebbe consentire una conoscenza più approfondita dell'estensione del problema in Italia e del rischio effettivo a cui sono esposti i cittadini. Dati uniformi dovrebbero permettere anche di realizzare una sintesi su varie scale spaziali, da nazionale a locale, che permetta di dare informazioni più immediatamente fruibili da parte degli utenti.

Una raccolta di dati uniforme, infine, potrebbe essere una base numerica necessaria all'implementazione di modelli matematici, che hanno ancora scarso potere predittivo anche a causa di una scarsa validazione.

Bibliografia

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 - Serie Generale* n. 119, del 24 maggio 2010.

PARTE A
Sintesi delle conoscenze disponibili

A1. FATTORI INERENTI ALLO SVILUPPO DI FIORITURE DI CIANOBATTERI TOSSICI CON PARTICOLARE RIFERIMENTO A EUTROFIZZAZIONE E CAMBIAMENTI CLIMATICI

Nico Salmaso (a)*, Diego Copetti (b), Licia Guzzella (b), Maura Manganelli (c), Eleonora Masala (d), Luigi Naselli-Flores (e)
(a) Centro Ricerca ed Innovazione, Fondazione Edmund Mach, San Michele all'Adige (TN)
(b) Istituto di Ricerca Sulle Acque, Consiglio Nazionale delle Ricerche, Brugherio (MB)
(c) Dipartimento di Ambiente e Connessa Prevenzione Primaria, Istituto Superiore di Sanità, Roma
(d) Laboratorio di Prevenzione dell'Azienda Sanitaria Locale della provincia di Lecco, Oggiono (LC)
(e) Dipartimento di Scienze e Tecnologie Biologiche, Chimiche e Farmaceutiche, Sezione di Botanica ed Ecologia Vegetale, Università di Palermo, Palermo
**nico.salmaso@fmach.it*

A1.1. Introduzione

L'utilizzo delle risorse acquatiche per scopi ricreativi o potabili può essere fortemente compromesso dalla presenza e sviluppo di cianobatteri tossici. I cianobatteri sono un ampio gruppo di batteri fotosintetici ossigenici che hanno iniziato a evolversi almeno 2,5-3 miliardi di anni fa (Schopf, 2012). Questa lunga storia evolutiva è alla base delle elevate capacità competitive che caratterizzano questo gruppo di microrganismi. I cianobatteri sono presenti in gran parte degli habitat acquatici e terrestri, compresi ambienti estremi quali i deserti (Makhalanyane *et al.*, 2013), gli ambienti polari (Kleinteich *et al.*, 2012), e sorgenti calde e ipersaline (Dadheech *et al.*, 2013). In condizioni di elevate concentrazioni di nutrienti, limitato ricambio idrico, elevate temperature e stabilità termica, i cianobatteri possono svilupparsi raggiungendo densità e biomasse molto alte, dando luogo alla formazione di ammassi distribuiti nella zona eufotica o diversamente localizzati negli strati superficiali, subsuperficiali e profondi (Paerl & Huisman, 2009).

La presenza di eccessive proliferazioni cianobatteriche oltre ai disagi conseguenti alla produzione di sostanze maleodoranti (Bowmer *et al.*, 1992), ha importanti conseguenze negative per l'utilizzo delle risorse acquatiche, a causa del rischio connesso con la produzione e rilascio di composti tossici (cianotossine) nelle acque destinate ad uso potabile e ricreativo (Funari & Testai, 2008; Messineo *et al.*, 2010; Cerasino & Salmaso, 2012; Metcalf & Codd, 2012; *vedi* capitoli A3 e A4), nonché per il trasferimento di tossine lungo le reti trofiche e alimentari (Shams *et al.*, 2014; Sotton *et al.*, 2014). La definizione e la valutazione quantitativa del rischio dipendono dall'autoecologia delle specie cianobatteriche dominanti (e quindi dalle modalità di formazione delle fioriture), dalla presenza di ceppi tossici, dalla tipologia di tossine prodotte, e dalla destinazione d'uso delle risorse acquatiche (Codd *et al.*, 2005a; Dietrich & Hoeger, 2005; Manganelli *et al.*, 2012). A titolo esemplificativo, le implicazioni per l'utilizzo delle acque derivanti dallo sviluppo di popolazioni di *Dolichospermum lemmermannii* e *Planktothrix rubescens* saranno molto diverse a seconda che le acque siano destinate ad uso ricreativo o potabile. La prima specie è in grado di formare estese fioriture superficiali, richiedendo particolare attenzione per la salute dei bagnanti e l'uso ricreativo dei corpi lacustri. Nel corso dei mesi estivi la seconda specie è invece strettamente localizzata negli strati più

profondi, ponendo potenziali problemi soprattutto per l'approvvigionamento di acqua potabile a causa del posizionamento a profondità discrete dei punti di captazione.

Gli effetti negativi e spesso letali determinati dall'ingestione di cianobatteri tossici da parte di diversi gruppi di vertebrati terrestri e organismi acquatici sono stati ampiamente descritti a partire dall'Ottocento (Francis, 1878). A sottolineare l'attenzione che veniva posta a questo problema già dalla metà del secolo scorso, si consideri che l'articolo di apertura del primo numero di *Hydrobiologia*, una delle riviste di punta della ricerca idrobiologica internazionale, aveva come titolo: "Objectionable algae with reference to the killing of fish and other animals" (Prescott, 1948). Una rassegna dei casi di intossicazioni umane – letali e non – causati dalla presenza di diversi tipi di cianobatteri in acque destinate ad uso ricreativo, potabile e sanitario (emodialisi) è riportata nel capitolo A3.

In molti dei casi sopra descritti si fa riferimento agli effetti causati dalla formazione di fioriture cianobatteriche (*cyanobacterial blooms*). In letteratura questo termine è utilizzato in un'accezione molto ampia, comprendendo fenomeni anche molto diversi tra di loro, che includono la formazione di schiume superficiali, lo sviluppo di elevate concentrazioni di cianobatteri nell'intera colonna d'acqua o a profondità discrete (e quindi non rilevabili in superficie). Reynolds & Walsby (1975), in una delle prime importanti rassegne sull'argomento, suggerirono di riservare il termine "fioriture" ai soli accumuli superficiali visibili ad occhio nudo. Fenomeni caratterizzati da elevati sviluppi di cianobatteri, senza manifestazioni visibili, non dovrebbero pertanto essere, a rigore, classificati tra i casi di fioriture algali (Salmaso, 2005). È da tenere comunque presente che nel gergo tecnico-scientifico non è infrequente imbattersi in termini quali, per esempio, "fioriture metalimnetiche" o "fioriture" ad indicare l'addensamento di specie cianobatteriche negli strati metalimentici (es. alcune Oscillatoriales planctoniche) o epilimnetici, senza alcuna manifestazione visibile sulla superficie dell'acqua.

In questo volume l'attenzione è rivolta ai problemi connessi con l'utilizzo di acque destinate ad uso ricreativo contaminate da popolazioni cianobatteriche. Nel capitolo, particolare enfasi sarà data non solo alla formazione e dinamica delle fioriture in senso stretto, ma anche allo sviluppo massivo di cianobatteri nella colonna d'acqua, senza formazione di fioriture visibili. Questi diversi tipi di manifestazioni, essendo talvolta legati allo sviluppo di specie differenti, richiedono approcci specifici per la valutazione del rischio, anche in relazione alla spiccata dinamicità temporale e spaziale che caratterizza molti cianobatteri. Dopo una breve introduzione alle principali caratteristiche dei cianobatteri e alla moderna tassonomia (paragrafo A1.2), il diverso posizionamento delle popolazioni cianobatteriche in un corpo lacustre sarà esaminato nel paragrafo A1.3. I principali fattori che favoriscono lo sviluppo dei cianobatteri saranno presi in rassegna nel paragrafo A1.4, mentre nel paragrafo A1.5 saranno discusse le condizioni necessarie per la formazione delle fioriture superficiali. La produzione di tossine ed esempi riguardanti la formazione, dinamica e impatto di fioriture superficiali e metalimnetiche saranno considerati rispettivamente nei paragrafi A1.6 e A1.7.

A1.2. Principali caratteristiche dei cianobatteri e cenni di tassonomia

A1.2.1. Caratteristiche principali dei cianobatteri

Le cellule dei cianobatteri sono di tipo batterico (procariote) con una parete di tipo Gram-negativo. A differenza degli eucarioti, questi organismi non posseggono cioè organelli quali nucleo, mitocondri, e cloroplasti. L'assorbimento di energia per la fotosintesi è assicurato dalla

presenza di clorofilla-a associata a tilacoidi liberi nel citoplasma. Carotenoidi (tra cui xantofille e β-carotene) e ficobiliproteine (ficoeritrina e ficocianina) organizzate in ficobilisomi consentono di ottimizzare l'assorbimento della radiazione fotosinteticamente attiva (*Photosyntethically Active Radiation,* PAR), permettendo la colonizzazione di ambienti con diverso regime di illuminazione (Graham *et al.*, 2009). Alcuni generi, un tempo compresi nelle Prochlorophyta (tra cui *Prochloron*), posseggono clorofilla-a e clorofilla-b, e sono privi di ficobilisomi.

Molti cianobatteri presentano all'interno delle singole cellule delle strutture costituite da proteine globulari, spesso chiamate vacuoli gassosi o vescicole gassose. Entrambe le voci sono fuorvianti, in quanto tali strutture non sono circondate da membrane. Essendo ormai entrati nell'uso comune, questi termini saranno tuttavia utilizzati anche in questo lavoro. Al microscopio i gruppi di vacuoli gassosi ("aerotopi") sono visibili come corpi più scuri rotondeggianti o irregolari. Le singole vescicole sono costituite da numerose strutture cilindriche vuote, con lunghezza fino a 1 µm e diametro mediamente pari a 0,075 µm. Questi sottili cilindri sono chiusi da estremità coniche, e sono circondati da un'unica parete di 2 nm di spessore (Walsby, 1994). La robustezza delle vescicole gassose dipende dal diametro e non tanto dalla lunghezza. Possedendo la caratteristica di escludere l'acqua e altri costituenti cellulari, i singoli cilindri sono riempiti pressoché esclusivamente di gas atmosferico, ciò che li rende molto meno densi dell'acqua (120 kg/m^3). I vacuoli gassosi sono pertanto delle strutture particolarmente adatte per il movimento verticale dei cianobatteri, e i principali responsabili, a livello cellulare, della formazione delle fioriture (*vedi* paragrafo A1.5).

Diverse specie cianobatteriche, al pari di altri batteri e a differenza di tutte le altre alghe eucariote, sono in grado di trasformare e assimilare l'azoto atmosferico gassoso in ioni ammonio, utilizzati per la sintesi di aminoacidi, prote ine e altri costituenti cellulari. La riduzione dell'azoto atmosferico da parte del complesso enzimatico che catalizza il processo di riduzione (nitrogenasi) può avvenire solo in assenza di ossigeno. La fissazione dell'azoto avviene, nella maggior parte dei casi in particolari cellule cianobatteriche specializzate, eterociti ("eterocisti"), che sono in grado di bloccare la diffusione dell'ossigeno al loro interno. Questa caratteristica è dovuta a una serie di modificazioni strutturali e biochimiche, quali la formazione di pareti ispessite avvolte da strati di mucillagine, la presenza di numerosi batteri (che consumano O_2) nelle giunzioni tra le eterociti e le cellule vegetative e il blocco della produzione di O_2 fotosintetico attraverso l'inibizione del fotosistema II (Graham *et al.*, 2009). Le dimensioni e la posizione lungo i filamenti delle eterociti sono state ampiamente utilizzate come carattere sistematico. In taluni casi, la loro assenza può precludere l'esatta classificazione delle specie. Per esempio, la posizione relativa degli acineti rispetto alle eterociti è ritenuta una caratteristica diacritica importante per l'identificazione delle specie all'interno del genere *Dolichospermum* (Komárek & Zapomělová, 2007; Komárek, 2013). Le eterociti sono presenti in molte specie in grado di fomare fioriture superficiali (tra queste *Dolichospermum*, *Aphanizomenon*, *Cylindrospermopsis*, *Nodularia*). La capacità di fissare azoto atmosferico permette ai cianobatteri con eterociti di evitare limitazioni nella crescita in condizioni di scarse concentrazioni di azoto (*vedi* paragrafo A1.4). Altre specie, soprattutto marine, sia filamentose (come *Tricodesmium* spp., tipica di oceani tropicali) che unicellulari (*Gloeothece*), non possiedono cellule specializzate, ma fissano l'azoto probabilmente separando temporalmente il processo di fotosintesi (che produce ossigeno, diurno) da quello di fissazione dell'azoto (notturno), oltre a sfruttare un ridotto flusso di O_2 e un elevato tasso di respirazione tipici delle acque calde in cui si trovano (Stal, 2000; Staal *et al.*, 2003).

Altre importanti cellule cianobatteriche specializzate sono gli acineti. Sono cellule con la parete ispessita e ricche di riserve utilizzate per la sopravvivenza dei cianobatteri in condizioni sfavorevoli. Una volta depositati e sepolti nei sedimenti, sono in grado di restare dormienti e

vitali fino ad alcune decine di anni (Livingstone & Jaworski, 1980). Hanno forme e dimensioni piuttosto diversificate e, al pari delle eterociti, sono utilizzati come criterio per la discriminazione delle specie cianobatteriche.

A1.2.2. Approcci tassonomici e ausili per l'identificazione e classificazione delle specie

I nuovi approcci molecolari e la ricollocazione di specie o interi gruppi in nuove classificazioni filogenetiche hanno posto la tassonomia moderna in uno stato di continuo cambiamento (De Clerck *et al.*, 2013). Questa considerazione è ancor più valida per i cianobatteri (Hoffmann *et al.*, 2005; Komárek, 2006; 2009a; 2009b; Krienitz, 2009; Wacklin *et al.*, 2009). A questo si aggiunga che lo studio di tratti adattativi in ceppi di una stessa specie, legati per esempio alla produzione di vacuoli gassosi in *Planktothrix*, ha permesso di evidenziare l'importante ruolo della criptodiversità nella capacità di colonizzazione e adattamento dei cianobatteri a diverse condizioni ambientali (D'Alelio & Gandolfi, 2012; D'Alelio *et al.*, 2013).

La nomenclatura dei cianobatteri è disciplinata sia dal Codice Internazionale di Nomenclatura per le alghe, funghi e piante (ICN) Codice Internazionale di Nomenclatura Botanica (ICBN) sia dal Codice Internazionale di Nomenclatura dei Procarioti (ICNP)Un processo di unificazione dei due codici è iniziato nel 2004 (Krienitz, 2009). Nel recente lavoro di Thomazeau *et al.* (2010), vengono definiti 6 ordini di cianobatteri (*Chroococcales, Gloeobaterales, Nostocales, Oscillatoriales, Pseudanabaenales e Synechococcales*). È verosimile che nei prossimi anni si assista ad un riarrangiamento delle specie in nuove classificazioni filogenetiche, anche in relazione al progresso delle nuove tecnologie genomiche e bioinformatiche rispetto al più semplice approccio genetico.

Da un punto di vista puramente pratico e finalizzato all'individuazione degli organismi responsabili delle fioriture nei corpi di acqua dolce, il punto di partenza è costituito dai tre manuali pubblicati nella collana Süßwasserflora von Mitteleuropa in conformità con i criteri descritti nel codice ICN, e riguardanti i cianobatteri coccali (*Chroococcales*) (Komárek & Anagnostidis, 1998), filamentosi (*Oscillatoriales*) (Komárek & Anagnostidis, 2005) e specie con eterociti (incluse cioè le *Nostocales*; Komárek, 2013). Questi manuali riportano una notevole ricchezza di specie, in alcune occasioni non sempre facili da discriminare anche a causa dell'influenza dei fattori ambientali sulle caratteristiche morfologiche degli organismi. Nei casi più critici, il ricorso all'identificazione delle specie con metodi molecolari costituisce comunque l'unico approccio risolutivo (Humbert *et al.*, 2010; D'Alelio & Salmaso, 2011). Specialmente nel caso delle specie più diffuse, le guide iconografiche costituiscono un aiuto pratico essenziale per una prima identificazione degli organismi (es. Cronberg & Annadotter, 2006).

Un importante ausilio per un rapido controllo e aggiornamento dello stato tassonomico delle specie e dei gruppi è costituito dalle risorse nel world wide web (web). Tra queste ha assunto importanza *AlgaeBase* (Guiry & Guiry, 2013), un database pubblico che, oltre a provvedere indicazioni aggiornate sulle diverse posizioni tassonomiche, fornisce anche informazioni riguardanti le pubblicazioni correlate e altri riferimenti chiave, elenco di sinonimi, distribuzione geografica e, se disponibili, fotografie e rimandi a database pubblici di sequenze molecolari nel web (*National Center for Biotechnology Information*, NCBI). Altra importante risorsa è costituita da CyanoDB (Komárek & Hauer, 2013). Analogamente ad *AlgaeBase*, il sito fornisce informazioni sullo stato tassonomico delle specie cianobatteriche, principalmente basandosi sul lavoro di Hoffmann *et al.* (2005) e altri lavori tassonomici più recenti.

Una trattazione più approfondita dei vari approcci tassonomici e dei caratteri utili al riconoscimento dei cianobatteri è presentata nel capitolo C2.

A1.3. Localizzazione delle popolazioni cianobatteriche, classificazione delle fioriture, e specie responsabili

La conoscenza delle modalità con cui i cianobatteri si localizzano in un corpo d'acqua è di fondamentale importanza per un'adeguata selezione dei punti da campionare. Una rappresentazione schematica delle potenziali zone di sviluppo e concentrazione dei cianobatteri in relazione alle varie fasi di stratificazione termica e mescolamento è riportata nella Fig. 1. Lo schema fa riferimento a un corpo lacustre (naturale o artificiale) tipico di climi temperati. I casi da 1 a 4 si riferiscono ad addensamenti superficiali o sviluppi lungo la colonna d'acqua comunemente osservati nel periodo estivo, quando le acque sono fortemente stratificate. In queste circostanze si possono avere densi ammassi superficiali localizzati lungo le coste, nelle baie e nei porti riparati dal vento. Nel caso 1 (Figura A1.1) l'accumulo di cianobatteri, spesso in fase di senescenza, non è tanto dovuto alla crescita *in situ*, bensì al trasporto, da parte del vento, di fioriture superficiali che si sono originate nella zona pelagica (caso 2). Le popolazioni possono essere distribuite omogeneamente nello strato superficiale rimescolato (epilimnio; caso 3) oppure, come in alcune Oscillatoriales planctoniche, formare densi strati sub-superficiali non visibili, più o meno strettamente localizzati nel metalimnio e in prossimità della zona eufotica (caso 4). In autunno, con la progressiva erosione del metalimnio e l'espansione dello strato rimescolato, le popolazioni si vengono a disperdere in uno strato più ampio (caso 5). Nel periodo tardo autunnale e invernale, nelle fasi finali del mescolamento, le popolazioni sono disperse fino alla massima profondità lacustre (caso 6) o, nel caso dei laghi più profondi, fino a profondità variabili (generalmente > 100 m) strettamente dipendenti dalle condizioni meteo-climatiche invernali. Addensamenti specifici possono essere rinvenuti sotto il ghiaccio, come nel caso delle popolazioni di *Aphanizomenon flos-aquae* descritte da Üveges *et al.* (2012) nel Lago Stechlin (caso 7).

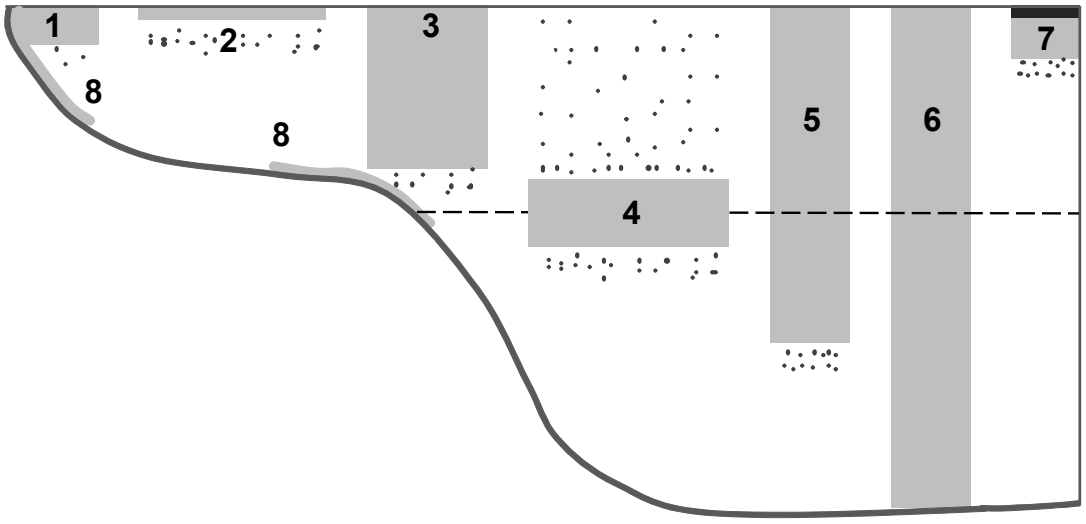


Figura A1.1. Localizzazione degli addensamenti cianobatterici in un corpo lacustre naturale o artificiale tipico di climi temperati (modificato da Lindholm *et al.*, 1989 e Codd *et al.*, 1999) (la linea orizzontale tratteggiata indica il limite inferiore della zona eufotica, che corrisponde allo strato che riceve l'1% della luce incidente sulla superficie del lago)

In aggiunta, come osservato in un piccolo lago eutrofico ungherese, le colonie di *Microcystis* sono in grado di svernare con popolazioni vitali all'interno del ghiaccio (Vasas *et al.*, 2010). Analogamente a molti altri organismi algali, i cianobatteri possono formare strati più o meno spessi (fino a diversi cm) sulla superficie dei sedimenti lacustri e su diverse tipologie di substrati (caso 8), incluse le prese di acqua potabile (Quiblier *et al.*, 2013).

Le implicazioni connesse con la presenza di organismi bentonici cianobatterici è stata fortemente sottovalutata. I tappeti di cianobetteri bentonici sono generalmente costituiti da Oscillatoriales appartenenti ai generi *Lyngbya*, *Leptolyngbya*, *Microcoleus*, *Tychonema*, *Schizothrix,* oltre ad altre Chroococcales e Nostocales. Mez *et al.* (1997; 1998) associarono la morte di un centinaio di capi di bestiame alla presenza di ceppi tossici di *Oscillatoria limosa* e *Phormidium konstantinosum* sulla superficie dei sedimenti e delle rocce sommerse di diversi laghi montani svizzeri.

A1.4. Fattori che favoriscono lo sviluppo dei cianobatteri

I fattori responsabili della distribuzione e sviluppo dei cianobatteri sono stati oggetto di numerosissime ricerche. Rassegne su questa tematica sono state pubblicate, tra gli altri, da Hyenstrand *et al.* (1998), Paerl & Fulton (2006), Paerl (2008) e Oliver *et al.* (2012). L'aumento della frequenza delle fioriture algali dovute allo sviluppo massivo di specie cianobatteriche viene comunemente associato a modifiche riconducibili all'attività umana. Queste comprendono, da una parte, gli effetti dovuti all'aumento dei carichi di nutrienti algali sui corpi lacustri e fluviali, e dall'altra importanti modifiche nella composizione dell'atmosfera con ripercussioni sui bilanci energetici a scala globale. Di fatto, eutrofizzazione e riscaldamento climatico sono considerati i due principali fattori chiave responsabili dell'aumento dello sviluppo dei cianobatteri nei Paesi industrializzati e in via di sviluppo e, più in generale, in aree densamente popolate (O'Neil *et al.*, 2012; Paerl & Paul, 2012). Il potenziale di sviluppo dei cianobatteri e delle fioriture algali è inoltre fortemente influenzato dai tempi di ricambio delle acque e dai processi di mescolamento (Zohary *et al.*, 2010). Altri fattori considerati importanti nello sviluppo e dominanza dei cianobatteri comprendono i rapporti tra azoto e fosforo (N:P), il controllo del galleggiamento, l'elevata competizione per luce e CO_2, la tolleranza alle elevate temperature, la resistenza ai predatori (zooplancton), le elevate capacità di accumulo di riserve di nutrienti, l'azoto-fissazione, l'assimilazione di ammonio e la competizione per elementi in traccia (Hyenstrand *et al.*, 1998).

A1.4.1. Eutrofizzazione: fosforo e azoto, e rapporti azoto:fosforo

Sin dagli anni '60 del secolo scorso il fosforo è stato identificato come la causa principale del deterioramento della qualità delle acque e uno dei principali fattori nel controllo dello sviluppo dei cianobatteri (Ryding & Rast, 1989; Reynolds *et al.*, 2000; Dokulil & Teubner, 2000). Gli studi sinottici condotti nel corso degli ultimi 20 anni hanno permesso di analizzare quantitativamente le relazioni tra le concentrazioni di fosforo (P) e la dominanza dei cianobatteri. Sulla base di uno studio condotto in 91 laghi della zona temperata, Watson *et al.* (1997) confermarono la stretta relazione tra le concentrazioni di P e l'aumento dei cianobatteri e, secondariamente, di diatomee e cloroficee. Tra i gruppi minori, le dinoficee, dopo un rapido aumento, presentavano una stabilizzazione e una diminuzione a concentrazioni di fosforo totale (TP)> 100 µg/L, mentre Chrysophyceae e Cryptophyceae mostravano rispettivamente un

aumento di biomassa solo fino a 10 e 30 µg/L. Prendendo in considerazione i dati raccolti in 35 laghi temperati e sub-tropicali, questi risultati furono successivamente confermati da Jeppesen *et al.* (2005). Ad elevate concentrazioni di nutrienti i cianobatteri mostravano un aumento, accompagnato da una riduzione o stabilizzazione rispettivamente di crisoficee e dinoficee. È interessante osservare che per concentrazioni di TP molto elevate (> 0,5-1 mg/L), nei laghi poco profondi il contributo percentuale dei cianobatteri tendeva a diminuire a favore delle cloroficee. In un lavoro successivo, basato sull'analisi di campioni raccolti in circa 850 laghi europei, Ptacnick *et al.* (2008) dimostrarono un significativo aumento della frazione dei cianobatteri e una diminuzione delle crisoficee all'aumentare dello stato trofico.

La funzione dell'azoto (N) nel favorire l'eutrofizzazione e un aumento dei cianobatteri appare più controversa. Nei piani di recupero della qualità delle acque, alcuni autori hanno sostenuto la necessità di associare alla riduzione dei carichi di fosforo una simultanea riduzione dei composti dell'azoto (Lewis *et al.*, 2008; Conley *et al.*, 2009). Queste considerazioni sono state aspramente criticate da Schindler (2012), il quale ha ulteriormente ribadito come l'unico metodo che abbia mostrato storicamente un elevato grado di successo nella riduzione dell'eutrofizzazione dei corpi lacustri sia costituito dalla riduzione del fosforo. La discussione ha una valenza estremamente importante per l'implementazione delle politiche di controllo e riduzione delle fonti di nutrienti e dei cianobatteri. D'altra parte, anche prendendo in esame i soli casi studio limitati all'ambito italiano ed europeo, l'efficacia degli interventi di recupero basati sulla riduzione dei composti del fosforo non sembra prestarsi ad equivoci (tra gli altri, laghi Maggiore, Costanza, Ginevra; Mosello *et al.*, 2010; Sommer *et al.*, 1993; Anneville & Pelletier, 2000).

Il rapporto N:P è stato frequentemente utilizzato per valutare il tipo di nutrienti responsabili della limitazione della crescita delle popolazioni algali e cianobatteriche (Oliver *et al.*, 2012). Assumendo rapporti di stechiometria cellulare vicini ai rapporti molari di Redfield (106C:16N:1P), valori di N:P > 16 e N:P < 16 sono comunemente considerati indicativi rispettivamente della limitazione della crescita relativa a fosforo e azoto. Questa idea è stata fortemente messa in discussione da osservazioni sul campo e da studi di laboratorio che hanno dimostrato una forte variabilità nei rapporti elementali (Geider & La Roche, 2002). D'altra parte, considerata anche la presenza di molte specie azoto-fissatrici, rapporti di N:P bassi dovrebbero comunque promuovere la crescita dei cianobatteri. Questa tesi si affermò rapidamente a seguito di uno studio condotto da Smith (1983) in 20 laghi perlopiù nord europei. Il lavoro venne, però successivamente criticato a causa di diverse imprecisioni nell'impostazione della ricerca (Trimbee & Prepas, 1987). Una nuova analisi effettuata sullo stesso archivio e su nuovi dati raccolti in laghi canadesi evidenziò che le variazioni nella dominanza dei cianobatteri potevano essere spiegate meglio dalle variazioni delle concentrazioni assolute di P e N piuttosto che dai rapporti N:P (Trimbee & Prepas, 1987). L'analisi di un dataset molto più ampio e rappresentativo (99 laghi distribuiti globalmente) permise a Downing *et al.* (2001) di confermare quanto anticipato da Trimbee & Prepas (1987). Downing *et al.* (2001) suggerirono che le correlazioni tra N:P e cianobatteri rilevate in diversi lavori potessero essere originate da una forte correlazione negativa tra concentrazioni di nutrienti e N:P. La causa sarebbe dovuta al maggior consumo di N rispetto a P a concentrazioni maggiori a seguito di processi di assimilazione biologica o denitrificazione. Nonostante i fondamenti teorici, il modello stechiometrico sembra pertanto meno efficace rispetto all'utilizzo, come variabili causali, delle concentrazioni assolute di P e N. Questi risultati sono pienamente compatibili con il fatto che non tutti i cianobatteri sono azoto-fissatori. Comunque, l'utilizzo dei rapporti stechiometrici nell'individuazione dei fattori limitanti la crescita dei cianobatteri non può prescindere dall'attenta valutazione della limitazione connessa con le concentrazioni assolute dei singoli nutrienti. In altri termini, concentrazioni molari di N e P

rispettivamente di 300 e 25 mM (4,2 mg N L^{-1} e 0,78 mg P/L), pur avendo N:P pari a 12, non possono essere considerate indicative di condizioni di limitazione da azoto.

A concretizzare il maggior potere predittivo delle concentrazioni assolute di P, Downing *et al.* (2001) proposero una serie di valori soglia di TP finalizzati alla definizione del rischio di sviluppo di popolazioni cianobatteriche con biomasse > 50% sulla biomassa algale totale (Tabella A1.1). I limiti così definiti forniscono una valutazione sul potenziale grado di dominanza dei cianobatteri rispetto alla comunità fitoplanctonica. Un minore rischio di produzioni cianobatteriche è raggiunto con concentrazioni di TP < 30 µg/L. Questo valore è coerente con i modelli cianobatteri/TP descritti in Watson *et al.* (1997) e Jeppesen *et al.* (2005) che mostrano un deciso aumento del contributo dei cianobatteri con concentrazioni di TP > 20-30 µg/L.

Tabella A1.1. Percentuali di rischio dei corpi d'acqua di sviluppare comunità fitoplanctoniche dominate da cianobatteri in funzione delle concentrazioni di fosforo totale (TP) (secondo Downing *et al.*, 2001)

Fosforo totale (µg P/L)	Rischio di dominanza di cianobatteri (%)
0-30	0-10
30-70	40
70-100	40-80

A1.4.2. Variazioni climatiche a differenti scale temporali

La disponibilità di nutrienti è il fattore di controllo più importante per la crescita delle comunità fitoplanctoniche e cianobatteriche. Tuttavia altri fattori, quali le fluttuazioni climatiche e idrologiche, possono assumere un'importanza fondamentale nel controllo dei livelli di biomassa e nella selezione dei gruppi algali dominanti. L'idrologia, pur essendo legata al clima, in specifici casi appare maggiormente condizionata dalle attività umane (es. nella regimazione dei bacini idroelettrici) e sarà pertanto considerata in un paragrafo dedicato (*vedi* paragrafo A1.4.3).

Il clima esercita i suoi effetti a differenti scale temporali, in un ampio range compreso tra le fluttuazioni meteorologiche a scala giornaliera/settimanale e i cambiamenti climatici misurati su scale decadali e secolari. Condizioni di calma di vento ed elevata insolazione sono essenziali per esempio per lo sviluppo di molti tipi di fioriture cianobatteriche e per il declino delle popolazioni delle grandi diatomee. Su scale temporali più lunghe, i cambiamenti climatici hanno profonde ripercussioni sulla fisica e chimica delle acque e sui cicli vitali degli organismi, causando la scomparsa di specie autoctone e la comparsa di specie aliene, tra cui molti cianobatteri. A questo riguardo, numerose ricerche hanno recentemente evidenziato un nesso causale tra gli effetti provocati dal riscaldamento climatico (George, 2010; Salmaso & Mosello, 2010) e l'aumento dell'importanza dei cianobatteri, anche sotto forma di fioriture (Jöhnk *et al.*, 2008; Paerl & Huisman, 2008; 2009; Wagner & Adrian, 2009; Carey *et al.*, 2012; O'Neil *et al.*, 2012; Paerl & Paul, 2012; Sommer *et al.*, 2012; Winder & Sommer, 2012).

La temperatura dell'acqua ha effetti diretti sugli organismi algali, controllando le velocità di crescita. In coltura, e in condizioni ottimali di luce e nutrienti, il tasso di replicazione di molte specie fitoplanctoniche cresce esponenzialmente con la temperatura, ma con velocità differenti a seconda delle specie. In generale, i cianobatteri presentano tassi di replicazione elevati a temperature relativamente alte, spesso > 25°C. Questa caratteristica è ritenuta da molti autori un tratto competitivo importante (Paerl & Huisman, 2008). Jöhnk *et al.* (2008) hanno per esempio descritto la formazione delle fioriture di *Microcystis* utilizzando un modello che mette direttamente in relazione le velocità di crescita con le temperature dell'acqua. Analogamente, Paerl & Huisman (2009) hanno evidenziato che a temperature elevate la crescita di molti

organismi eucarioti inizia a diminuire, mentre molti cianobatteri raggiungono condizioni di crescita ottimali (Figura A1.2).

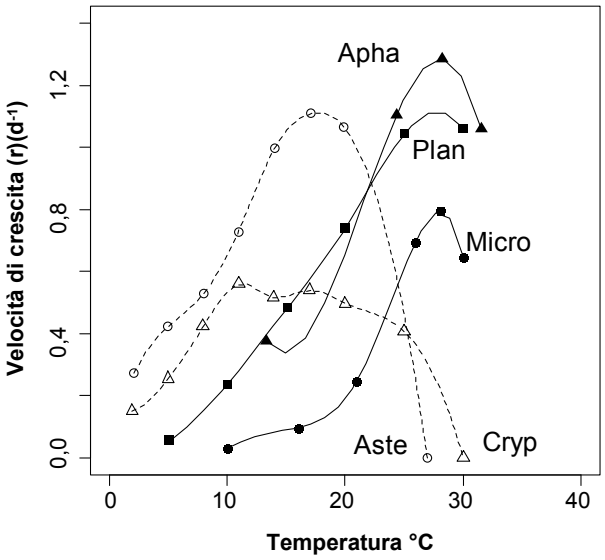


Figura A1.2. Crescita di specie selezionate di diatomee (*Asterionella formosa*, Aste), criptoficee (*Cryptomonas marssonii*, Cryp) e cianobatteri (*Aphanizomenon*, Apha; *Planktothrix agardhii*, Plan; *Microcystis aeruginosa*, Micro) in condizioni di saturazione di luce e concentrazioni non limitanti di nutrienti (modificato da Paerl & Huisman, 2009 e Reynolds, 2006)

Per contro, utilizzando informazioni pubblicate in oltre 60 articoli e procedendo alla loro verifica con nuovi esperimenti di laboratorio, Lürling *et al.* (2013) hanno evidenziato una sostanziale coincidenza negli optimum di temperatura per la crescita di cloroficee e cianobatteri, e maggiori velocità di crescita rilevate nelle cloroficee rispetto ai cianobatteri (Figura A1.3), mettendo pertanto in discussione il ruolo diretto della temperatura nel controllo della competitività di questi ultimi.

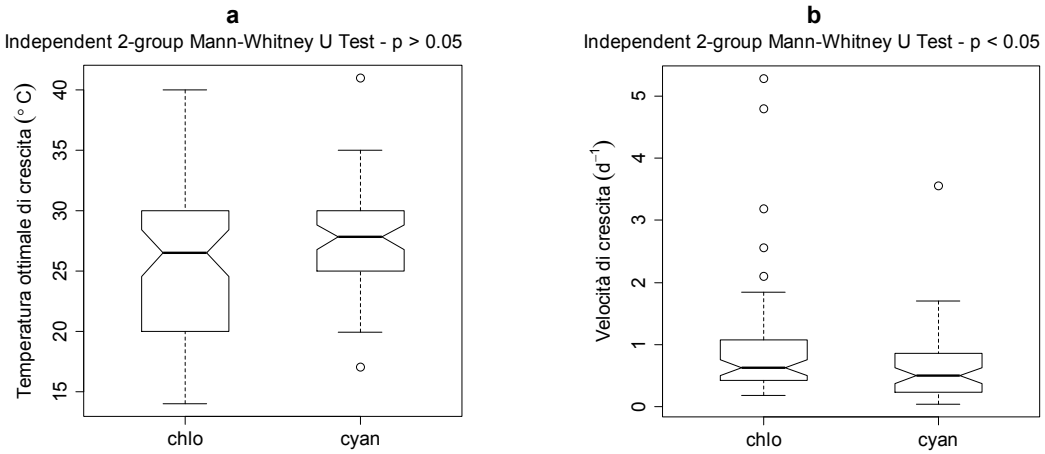


Figura A1.3. Temperature ottimali di crescita (a) e velocità di crescita in condizioni di temperatura ottimale (b) nelle cloroficee (chlo) e cianobatteri (cyan) (dati da Lürling *et al.* 2013)

È da rilevare che le cloroficee sono tra l'altro un diretto competitore dei cianobatteri nel corso dei mesi più caldi, e tra gli organismi più abbondanti in ambienti eutrofici e ipereutrofici.

Analogamente, altri autori, quali Wagner & Adrian (2009) e Sommer *et al.* (2012), hanno suggerito che il vantaggio competitivo dei cianobatteri debba perlopiù essere ascritto a effetti indiretti dell'aumento di temperatura, in primo luogo determinati dall'aumentata stabilità fisica della colonna d'acqua. All'aumentare delle temperature aumenta infatti il grado di separazione tra gli strati superficiali illuminati e poveri di nutrienti e gli strati meta- e ipolimnetici sottostanti poco illuminati ma ricchi di nutrienti. Pur tenendo conto della capacità che hanno i cianobatteri di continuare a crescere in condizioni di basse concentrazioni di nutrienti a seguito del consumo di sostanze di riserva accumulate in precedenza (*luxury uptake*; Carey *et al.*, 2012), queste condizioni sono favorevoli alle specie in grado di spostarsi lungo la colonna d'acqua. È il caso per esempio delle grandi colonie di *Microcystis* e *Dolychospermum*, o dei sottili filamenti di *P. rubescens*, specie in grado di posizionarsi a profondità ottimali di crescita formando intensi addensamenti metalimnetici. Più in generale, un'intensificazione del riscaldamento climatico porterebbe, assieme a una maggiore estensione del periodo vegetativo, ad un maggiore sviluppo ed espansione dei cianobatteri che risulterebbero maggiormente favoriti sia dalle loro elevate velocità di replicazione alle alte temperature sia dalla loro spiccata capacità di migrazione o posizionamento verticale in ambienti stratificati (Paerl & Huisman, 2009). Se, come abbiamo visto, l'elevata velocità di replicazione è una caratteristica condivisa anche con altri gruppi algali, il controllo del galleggiamento in ambienti a bassa turbolenza sembra pertanto costituire un considerevole vantaggio competitivo, con importanti implicazioni per quanto riguarda le possibilità di controllo delle popolazioni attraverso la manipolazione della regimazione idrologica nei corpi lacustri artificiali o ampliati.

A1.4.3. Mescolamento e caratteristiche idrodinamiche

Con il progressivo aumento della turbolenza dell'acqua, il pieno sfruttamento delle capacità di galleggiamento dei cianobatteri gas-vacuolati inizia ad essere impedito del tutto o in parte. In un epilimnio profondo e ben rimescolato (in autunno o primavera, oppure con condizioni meteorologiche instabili, caratterizzate da diminuzione delle temperature e forte vento) gli organismi algali, indipendentemente dalla loro capacità di galleggiamento, tenderanno ad essere ridistribuiti omogeneamente nello strato superficiale, e in alcune occasioni anche ben al di sotto della zona eufotica (casi 3 e 5 in Figura A1.1). Queste condizioni sono del tutto negative per la formazione delle fioriture estive (es. Nostocales). Analogamente, il mescolamento tardo autunnale/primaverile nei laghi profondi costituisce un elemento sfavorevole per lo sviluppo di tutti gli organismi fitoplanctonici (caso 6 in Figura A1.1). Più specificatamente, Reynolds (2006) ha mostrato che per valori nel rapporto tra strato mescolato (z_{mix}) e zona eufotica (z_{eu}) $z_{mix}/z_{eu} > 3$, la crescita del fitoplancton è fortemente inibita a causa del regime di luce insufficiente per compensare i processi respiratori.

Eventi di mescolamento profondo possono incidere pesantemente sulla funzionalità dei vacuoli gassosi, causandone il collasso a seguito delle elevate pressioni idrostatiche (Walsby *et al.*, 1998). Posch *et al.* (2012) hanno sostenuto che l'aumento delle popolazioni di *P. rubescens* nel Lago di Zurigo sia stato determinato da una riduzione dello strato d'acqua interessato dalla completa circolazione primaverile (da ca. >100 m a <80 m) a seguito dall'aumento delle temperature invernali. Ciò avrebbe comportato una corrispondente diminuzione delle pressioni idrostatiche sperimentate dalle cellule di *Planktothrix* e una maggiore sopravvivenza degli inoculi per la crescita delle popolazioni estive. Altre spiegazioni sono tuttavia possibili. Tra queste, come evidenziato da Winder (2012), meriterebbero di essere approfondite le modificazioni nell'intensità della luce (PAR, *Photosyntetically Active Radiation*) negli strati

metalimnetici interessati dagli accumuli di *Planktothrix*. I processi di mescolamento profondo hanno anche effetti indiretti. A seguito del mescolamento degli strati più profondi e ricchi di nutrienti con gli strati più superficiali e illuminati, la circolazione primaverile costituisce un'importante fonte di nutrienti per la crescita delle popolazioni fitoplanctoniche e cianobatteriche nei mesi primaverili ed estivo-autunnali (*vedi* paragrafo A1.4.4).

Sempre tra i fattori fisici, i cianobatteri sono particolarmente sensibili alla regimazione idrologica e al tempo di ricambio delle acque. Nonostante i maggiori carichi, elevati afflussi di acqua nei bacini idroelettrici o nei laghi di piccole dimensioni sono in grado di rimuovere e diluire le popolazioni cianobatteriche. Esemplificativo il caso del Lago Arancio (Sicilia) dove, nell'estate del 2003, a seguito del continuo riempimento del bacino, le densità di *Microcystis aeruginosa* diminuirono di 5-6 volte rispetto alle settimane precedenti (Naselli-Flores *et al.*, 2007). Per contro, l'alterazione del bilancio idrico dovuto ad un aumento delle temperature e dei tassi di evapo-traspirazione nel bacino imbrifero ha fortemente ridotto gli afflussi al Lago Biviere di Gela (Sicilia) che progressivamente, nell'arco di alcuni anni, si è svuotato. Originariamente trasparente e ricco di macrofite, con la riduzione dei livelli e la distruzione della zona litorale il lago si è rapidamente trasformato in un bacino torbido dominato da cianobatteri, quali *Chrysosporum ovalisporum* (*Aphanizomenon ovalisporum*, Zapomelova *et al.*, 2012), *Cylindrospermopsis raciborskii* e *Pseudanabaena limnetica* (Barone *et al.*, 2010). Casi del tutto simili sono stati documentati anche in altre aree mediterranee (Hoyer *et al.*, 2009; Naselli-Flores, 2011; Rigosi & Rueda, 2012; Romo *et al.*, 2013). È invece interessante sottolineare che nei bacini idroelettrici localizzati in aree climatiche alpine e subalpine la presenza di cianobatteri è generalmente molto ridotta a causa delle minori temperature, elevato ricambio idrico e maggiore turbolenza della colonna d'acqua (Salmaso *et al.*, 1992; Moccia *et al.*, 2000).

A1.4.4. Interazione tra eutrofizzazione e fluttuazioni climatiche

I modelli che finora sono stati utilizzati per studiare l'effetto congiunto della disponibilità di nutrienti e delle temperature dell'acqua sullo sviluppo del fitoplancton hanno indicato una decisiva e maggiore importanza dei carichi di nutrienti sul riscaldamento climatico, e un'ampia dominanza di cianobatteri in scenari caratterizzati da elevate concentrazioni di nutrienti ed elevate temperature (Elliott *et al.*, 2006). Questi risultati, se da una parte confermano l'importanza dei nutrienti (*vedi* paragrafo A1.4.1), dall'altra evidenziano il ruolo sinergico della temperatura nel favorire la diffusione e consolidamento delle popolazioni cianobatteriche (Salmaso *et al.*, 2012).

L'effetto congiunto delle fluttuazioni del clima e della temperatura dipende strettamente dalle caratteristiche fisiografiche dei corpi lacustri e dalle finestre temporali. Esemplificativo è l'effetto delle fluttuazioni climatiche invernali sulle dinamiche di mescolamento profondo e fertilizzazione delle acque superficiali nei grandi laghi a sud delle Alpi. Analisi condotte sul Lago di Garda e sui laghi d'Iseo, Como, Lugano e Maggiore hanno dimostrato una stretta dipendenza dei processi di mescolamento dall'evoluzione climatica dei mesi invernali e da modi di circolazione atmosferica rilevanti per l'area mediterranea, quali l'*East Atlantic pattern* (EA) e l'*Eastern Mediterranean Pattern* (EMP) (Salmaso *et al.*, 2014). Nello stato rispettivamente negativo e positivo, EA ed EMP sono associati a condizioni di forte afflusso invernale di aria fredda dall'Europa settentrionale e centrale verso l'area mediterranea. In tutti i laghi analizzati questa condizione determina una serie di effetti a cascata che comprendono la diminuzione delle temperature lacustri, la maggiore estensione del mescolamento verticale primaverile e il maggiore rifornimento di nutrienti verso la superficie e di ossigeno verso l'ipolimnio profondo. Nel Garda, dopo lo sviluppo di inverni più freddi e all'aumentare della disponibilità primaverile

di nutrienti, sono stati osservati significativi aumenti nella crescita dei cianobatteri (principalmente *P. rubescens*) nei mesi estivi e autunnali (Salmaso, 2012).

Nonostante un'importante attività di riduzione di N e P (da 750 a 600, e da 100 a 30 µg/L, rispettivamente) iniziata nel 1984, aumenti significativi di *P. rubescens* sono stati osservati anche nel lago subalpino di Bourget (Francia) fra il 1996 e il 2001 (Jaquet *et al.*, 2005). Secondo gli autori, il progressivo riscaldamento osservato fra il 1984 e il 2001 e il conseguente anticipo e prolungamento della stratificazione termica, in coincidenza con una maggiore trasparenza dovuta alla diminuzione del fitoplancton eucariotico a seguito della riduzione dei nutrienti inorganici, avrebbe favorito il successo di *Planktothrix*. Questa specie è infatti in grado di sfruttare irradianze luminose basse e di utilizzare il fosforo organico localizzato intorno al metalimnio, caratteristiche che hanno favorito lo sviluppo di fioriture metalimnetiche estive, successivamente disperse lungo la colonna d'acqua al termine della stratificazione termica (*vedi* paragrafo A1.7.1).

A1.4.5. Aumento dell'intensità di inondazioni e diffusione dei cianobatteri tossici in ambienti estuariali

Un effetto significativo dei cambiamenti climatici nelle zone temperate è una diminuzione dei giorni di pioggia, accompagnata però da un aumento del volume medio di acqua trasportato (Bates *et al.*, 2008). Una delle possibili conseguenze dell'aumento del flusso di acqua dolce verso le zone costiere è l'abbassamento di salinità delle zone salmastre e il trasporto a valle, da parte delle acque interne, di inoculi di cianobatteri che tollerano variazioni di salinità e possono dar luogo a fioriture. Per il momento, questo problema sembra riguardare solo *M. aeruginosa*, per la quale sono stati riportati eventi di grandi fioriture in estuari e baie di diverse parti del mondo, tra cui Australia (Robson & Hamilton, 2003) e USA nella baia di San Francisco (Lehman *et al.*, 2005) e nell'estuario del fiume St. Lucie in Florida (Ross *et al.*, 2006). Le grandi fioriture negli estuari sono state innescate non solo da grandi afflussi di acqua dolce, causati da piogge più intense della media, che hanno trasportato inoculi di organismi negli estuari, come sopra descritto, ma anche da altri fattori concomitanti, tra cui temperature elevate associate ad adeguate concentrazioni di nutrienti. In tutti e tre i casi, a seguito delle fioriture, sono state trovate microcistine disciolte in acqua e nei tessuti di alcuni organismi. Nel Santuario Marino Nazionale della baia di Monterey fu segnalata la morte di alcune lontre, attribuita ad una ipotizzata biomagnificazione delle microcistine lungo la catena trofica (Miller *et al.*, 2010). *Microcystis* riesce a crescere in condizioni di salinità crescente, fino a 10 g/L, senza variazioni nei tassi di crescita e di concentrazioni di tossine per cellula (Tonk *et al.*, 2007). Questi esempi mostrano la rilevanza del problema sia per l'ecologia delle zone di transizione sia per i possibili effetti sulla salute umana, in quanto gli organismi marini/salmastri eduli vengono controllati solo per alcune classi di tossine algali, escluse le cianotossine (Funari *et al.*, 2012).

A1.5. Controllo del galleggiamento e velocità di migrazione verticale

Per la formazione delle fioriture superficiali di cianobatteri devono essere soddisfatte contemporaneamente almeno 3 condizioni (Reynolds & Walsby, 1975): 1) la presenza di un adatto inoculo nella colonna d'acqua; 2) la diminuzione della turbolenza dell'acqua; e 3) la diminuzione delle densità intracellulari, con la formazione di popolazioni galleggianti. I primi due punti sono stati analizzati nel paragrafo A1.4, e concorrono al generale sviluppo dei cianobatteri nei corpi lacustri. Di seguito passeremo brevemente in rassegna i meccanismi

fisiologici che permettono ai cianobatteri di regolare la loro posizione verticale lungo la colonna d'acqua, dando luogo alla formazione delle fioriture superficiali (senso stretto, casi 1 e 2 in Figura A1.1) e agli sviluppi sub-superficiali (in particolare caso 4 in Figura A1.1).

A1.5.1. Regolazione della densità intracellulare e controllo del galleggiamento

Il galleggiamento nei cianobatteri è controllato attraverso cambiamenti nella funzionalità e nel numero dei vacuoli gassosi e mediante il bilancio - regolato da fotosintesi e respirazione - tra costituenti cellulari di diversa densità, quali carboidrati e proteine (Oliver *et al.*, 2012). La funzionalità e numero dei vacuoli gassosi dipende dalla pressione di turgore all'interno delle cellule e dalla diluizione a seguito dei processi di divisione cellulare. I vacuoli gassosi possono essere soggetti a collassamento per l'azione congiunta della pressione di turgore (interna) e della pressione idrostatica (esterna). La pressione di turgore può assumere valori tra 0 e 0,4 MPa (Walsby, 1994), mentre lungo la colonna d'acqua la pressione idrostatica aumenta di circa 0,01 Mpa/m. La "pressione critica", p_c, e cioè la pressione oltre la quale le vescicole gassose collassano, presenta valori che sono generalmente compresi tra 0,3 MPa e oltre 1,1 MPa (Walsby, 1994). Questi valori, al netto della pressione di turgore, possono essere raggiunti a profondità variabili, tra < 30 m e ca. 100 m. Il grado di resistenza alla pressione delle vescicole gassose varia inversamente con la loro dimensione. Vescicole gassose più piccole e robuste, pur fornendo una minore galleggiabilità, sono tuttavia più resistenti alla pressione idrostatica (Bright & Walsby, 1999). La dimensione delle vescicole gassose è dovuta a differenze nelle sequenze di aminoacidi che costituiscono le proteine strutturali. Tali differenze sono controllate attraverso l'espressione di diversi geni, in particolare tre varianti del gene *gvpC* che codifica le proteine GvpC che formano lo strato più esterno delle vescicole gassose, controllandone diametro e resistenza. I geni *gvpC* variano non solo tra le diverse specie ma, costituendo un tratto adattativo controllato dalla pressione idrostatica, anche tra ceppi diversi di una stessa specie (Beard *et al.*, 2002). Attraverso l'analisi di 276 ceppi diversi di *Planktothrix rubescens* isolati in 8 laghi sudalpini, D'Alelio *et al.* (2011) hanno dimostrato una chiara relazione tra la profondità dei bacini e lo sviluppo di genotipi diversi caratterizzati da vacuoli gassosi di diversa resistenza. La diversità nei geni *gvpC* favorisce la dispersione dei cianobatteri in ambienti caratterizzati da differenti profondità idrostatiche massime, ottimizzando il rapporto tra grandezza e resistenza delle vescicole, e contribuendo pertanto alla ben nota plasticità di adattamento che caratterizza questo gruppo.

Il galleggiamento ad opera dei vacuoli gassosi viene controbilanciato dalla sintesi di carboidrati ($\rho \sim 1600$ kg/m^3) e proteine ($\rho \sim 1300$ kg/m^3). Nel complesso, queste molecole costituiscono una sorta di "zavorra" cellulare strettamente regolata dal bilancio tra fotosintesi e respirazione, e quindi dai livelli di illuminazione (*Photosynthetically Active Radiation*, PAR) (Walsby, 1994; Walsby *et al.*, 2006; Oliver *et al.*, 2012). Con illuminazioni elevate, le cellule accumulano carboidrati pesanti, aumentando la loro densità e diminuendo in parte o del tutto la capacità di galleggiamento. In alcune specie (es. *Dolichospermum* spp.) questi cambiamenti possono essere accentuati da una diminuzione nel numero e funzionalità delle vescicole gassose determinata da un aumento della pressione di turgore (Kinsman *et al.*, 1991). A bassi livelli di PAR, il galleggiamento tende ad aumentare a causa del consumo dei carboidrati e della produzione di nuovi vacuoli gassosi (Walsby, 1994). L'alternanza tra la prevalenza dei processi fotosintetici e respiratori può spiegare l'aumento e la diminuzione della galleggiabilità delle cellule rispettivamente di notte e di giorno, contribuendo alla formazione e scomparsa delle fioriture superficiali (Reynolds & Walsby, 1975). Effetti simili possono essere regolati dai cambiamenti di temperatura. Per esempio, l'aumento dei carboidrati intracellulari e la

diminuzione della galleggiabilità nelle colonie di *Microcystis* a temperature comprese nel range inferiore di crescita (12-18°C; Visser *et al.*, 1995) sono stati interpretati sulla base della diversa dipendenza di fotosintesi e respirazione dalla temperatura (Carey *et al.*, 2012).

Oltre che dall'intensità dell'illuminazione, la galleggiabilità è regolata dalla disponibilità di nutrienti (Oliver *et al.*, 2012). Se P e N sono presenti in concentrazioni limitanti per la crescita, i carboidrati tendono ad aumentare, diminuendo la galleggiabilità (Chu *et al.*, 2007) e permettendo alle cellule di sfruttare le potenziali riserve di nutrienti poste a profondità maggiori. Se tutti i nutrienti sono presenti in eccesso, il galleggiamento sarà ampiamente controllato dall'illuminazione; con livelli di PAR inferiori rispetto a quelli richiesti per raggiungere le velocità massime di crescita, le riserve di carboidrati saranno ridotte, con effetti positivi sul galleggiamento. Sempre in assenza di limitazione da nutrienti, popolazioni poste in condizioni saturanti di illuminazione potranno rispondere in modo diverso, mantenendo la galleggiabilità (*M. aeruginosa*), oppure diminuendola o raggiungendo densità neutre (*Aph. flos-aquae*). A complicare questo quadro, si consideri che all'effetto derivato dall'accumulo di carboidrati in condizioni ottimali di nutrienti e illuminazione si può aggiungere una diminuzione nella sintesi dei vacuoli gassosi (Oliver *et al.*, 2012). Per un approfondimento del ruolo e controllo della zavorra cellulare in relazione a diverse condizioni di illuminazione e nutrienti si rimanda a Carey *et al.* (2012) e Oliver *et al.* (2012).

I meccanismi di controllo della galleggiabilità possono essere compromessi o del tutto persi, intrappolando le fioriture sulla superficie dei corpi lacustri. Abbondanti fioriture possono impedire un adeguato rifornimento di risorse (tra cui luce) per la sintesi dei carboidrati, impedendo sia l'aumento della pressione di turgore, sia l'aumento delle densità intracellulari. Oppure le vescicole gassose possono essere troppo robuste per collassare. In questi casi gli organismi cianobatterici riescono a mantenere la loro galleggiabilità per diversi giorni (*overbuoyancy*), dando luogo alla formazione di spesse schiume superficiali. La continua e diretta esposizione alla radiazione solare determinerà un più o meno rapido processo di degradazione delle cellule cianobatteriche, con potenziale rilascio di tossine e consumo di ossigeno disciolto.

A1.5.2. Velocità di migrazione verticale

In condizioni di elevata stabilità termica e flusso laminare, la velocità verticale degli organismi fitoplanctonici è proporzionale al quadrato del raggio equivalente di una sfera di uguale volume (Padisák *et al.*, 2003). Pertanto, le velocità di spostamento verticale, che sono regolate dalle differenze di densità tra le cellule e l'acqua, saranno fortemente amplificate negli organismi di maggiori dimensioni. Organismi senza gas-vacuoli sedimentano con velocità proporzionali al volume occupato; organismi con gas vacuoli si muovono verso l'alto con velocità proporzionali al volume e alla percentuale di citoplasma occupata dai gas-vacuoli. L'ampio range dimensionale, che va dalle piccole cellule picoplanctoniche, del diametro di frazioni di µm, fino alle grandi colonie di *Microcystis*, con dimensioni di alcuni mm, rendono i cianobatteri un gruppo altamente diversificato anche nel controllo del posizionamento verticale.

La differenza nelle velocità verticali tra alcune specie di cianobatteri, e tra questi e alcune specie rappresentative dei dinoflagellati, cloroficee e diatomee è rappresentata nella Figura A1.4. Molte cellule eucariotiche (come nelle cloroficee e diatomee) hanno densità superiori a quelle dell'acqua, e velocità di spostamento verticale negative (Sommer, 1987). Una nota eccezione è costituita da *Botryococcus*, cloroficea che forma fioriture superficiali in virtù della sua capacità di produrre e accumulare sostanze oleose (triterpeni) all'interno delle cellule. Anche i grandi flagellati (quali le dinoficee) possono raggiungere velocità paragonabili a quelle delle grandi colonie cianobatteriche (Salmaso & Tolotti, 2009). Per questa loro caratteristica, le fioriture di *Ceratium* spp. e *Peridinium* spp. sono state documentate in molti corpi lacustri (es.

Hickel & Pollingher, 1988; Nakano *et al.*, 1999; Matsumura-Tundisi *et al.*, 2010). Queste fioriture, pur se non tossiche, possono creare notevoli problemi per l'utilizzo delle acque, causando soprattutto odori sgradevoli. Non devono essere confuse con le fioriture di cianobatteri.

Le velocità di spostamento dei cianobatteri variano tra pochi cm per ora fino ad alcuni m per ora (Figura A1.4). Come atteso, le velocità più elevate (attorno o superiori a 0,5 m h^{-1}) sono raggiunte dalle grandi colonie di *Microcystis* e dagli aggregati di filamenti di *Dolichospermum* e *Aphanizomenon*. Altri dati (non riportati nella Figura A1.4) citati in Paerl (1988), riportano velocità fino a oltre 10 m/h, mentre Oliver *et al.* (2012) indicano velocità massime raggiunte da aggregati di *Dolichospermum circinalis* di oltre 200 m/h. Per contro, le velocità raggiunte dai singoli filamenti sono molto più basse e limitate, nel caso per esempio di *P. rubescens*, a pochi cm per ora (tipicamente 3-5 cm/h). In questa specie velocità molto più elevate possono tuttavia essere raggiunte con l'aggregazione dei filamenti in unità più grandi (Walsby *et al.*, 2006).

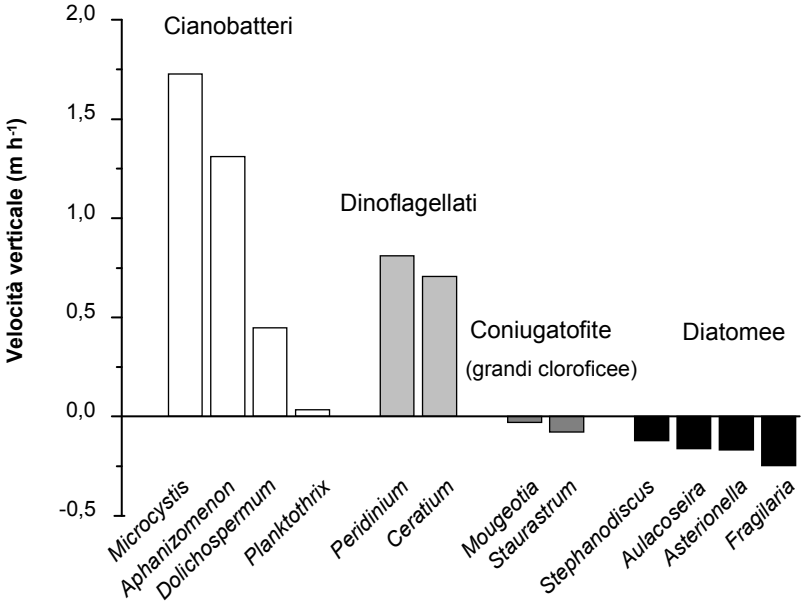


Figura A1.4. Velocità di migrazione verticale di alcuni generi cianobatterici con vacuoli gassosi in relazione alle velocità di spostamento di altri organismi fitoplanctonici provvisti (dinoflagellati) e privi (diatomee e coniugatoficee) di flagelli. Le stime di velocità sono del tutto indicative, dipendendo dalla specie e genotipo, dalla vitalità delle cellule e dalle condizioni di turbolenza della colonna d'acqua (dati rielaborati da Padisák, 2004)

A1.6. Produzione di cianotossine

Lo studio dei fattori che sovrintendono alla sintesi delle cianotossine, e in particolare delle microcistine, ha iniziato ad essere inquadrato correttamente solo nell'ultimo decennio. Nei corpi d'acqua dolce le microcistine (MC) sono presenti con concentrazioni variabili tra meno di 1 µg/L a oltre 30000 µg/L (Sivonen & Jones, 1999; Naselli-Flores *et al.*, 2007; *vedi* capitolo A7). Gran parte di questa variabilità è dovuta a differenze nelle abbondanze cianobatteriche, e alla diversa frazione di genotipi tossici nelle popolazioni (Kurmayer *et al.*, 2002; Okello *et al.*, 2010). L'azione dei fattori ambientali sulla regolazione della tossicità a livello fisiologico –

dovuta a luce, ferro, pH ecc. – contribuisce alla regolazione fine del contenuto di tossine nelle cellule (Neilan *et al.*, 2012). Pertanto, l'opinione corrente è che la ragione della forte variabilità nella produzione di tossine per unità di densità o biomassa da parte di una stessa specie (la cosiddetta "quota" cellulare) sia da ricercare principalmente nell'esistenza di sub-popolazioni costituite da ceppi tossici e non-tossici. Tali considerazioni sembrano essere confermate anche da un recente studio condotto sui laghi di Garda e Ledro (Salmaso *et al.*, 2013). I due laghi, vicini, e connessi da una condotta d'acqua utilizzata per la produzione di energia idroelettrica, ospitano popolazioni di *P. rubescens* con la stessa quota cellulare di MC (0,53 e 0,51 $\mu g/mm^3$, rispettivamente), suggerendo la presenza di genotipi tossici simili e una produzione costitutiva di tossine. Tuttavia la percentuale relativa di individui tossici non è costante, e variazioni anche sostanziali possono verificarsi in un arco di tempo anche limitato, contribuendo a modificare la quota cellulare e a far sì che le sole densità cellulari non siano sempre indicative della reale tossicità della fioritura (Manganelli *et al.*, 2010). L'argomento è stato oggetto di numerose pubblicazioni, nonché di ampie rassegne (Kardinaal & Visser, 2005; Neilan *et al.*, 2012), ed è stato più estesamente trattato nel capitolo A7, cui si rimanda. Di seguito riportiamo solo alcuni esempi di studi svolti sull'argomento.

Durante le fioriture di *Microcystis* la produzione di MC sembra positivamente correlata al tasso di crescita e quindi, indirettamente, ai fattori che limitano/stimolano i tassi di crescita (Orr & Jones, 1998; Oh *et al.*, 2000). Altri autori ritengono più importante l'abbondanza relativa del ceppo tossico (Hotto *et al.*, 2008; Okello *et al.*, 2010), che a sua volta sembra favorito da concentrazioni elevate di N e P inorganico (Davis *et al.*, 2010). Anche nel caso di *Planktothrix* spp. è stato suggerito che l'abbondanza relativa del genotipo tossico sia legata alla maggiore concentrazione di N e P (Briand *et al.*, 2008a; Manganelli *et al.*, 2010). La produzione di cilindrospermopsina (CYN) da parte di *Aph. ovalisporum* sembra invece stimolata da basse concentrazioni di P inorganico (Bar-Yosef *et al.*, 2010).

Per quanto riguarda la temperatura non sembrano esserci effetti omogenei sul controllo dei livelli di tossicità. Nel caso di *Planktothrix agardhii* un aumento delle temperature potrebbe avere effetti positivi da un punto di vista della gestione dei cianobatteri tossici, dato che i ceppi tossici sembrano favoriti in condizioni di bassa luce e bassa temperatura, condizioni ritenute limitanti per questa specie (Briand *et al.*, 2008b). Nel caso di *Microcystis* sembra vero l'opposto: dall'analisi dei dati relativi a fioriture in 4 laghi negli Stati Uniti Nord Orientali, risulta che elevate temperature, insieme a elevate concentrazioni di fosforo, favoriscono il successo dei ceppi tossici rispetto a quelli non tossici (Davis *et al.*, 2009). Relativamente alla produzione di CYN, alcuni dati sperimentali indicano che all'aumentare della temperatura la produzione della tossina diminuisce. Questo è stato osservato in ceppi tropicali di *Cylindrospermopsis*, per i quali un aumento di temperatura da 25°C a 35°C aumentava il tasso di crescita ma inibiva completamente la produzione di CYN (Saker & Griffiths, 2000). In un ceppo di *Aph. flos-aquae* di acque temperate di laghi tedeschi, Preußel *et al.* (2009) hanno trovato una correlazione negativa fra la temperatura e la produzione di tossine, nel range 16-25°C. Questi dati vanno interpretati con una certa cautela, sia per la presenza di variabili confondenti negli studi ambientali, sia per le diverse risposte fisiologiche di ceppi adattati a specifiche condizioni ambientali (Üveges *et al.*, 2012).

A1.7. Innesco delle fioriture di cianobatteri: casi studio

Di seguito riporteremo una descrizione delle principali tipologie di fioriture rilevate nei corpi lacustri italiani. L'obiettivo è di fornire un collegamento tra quanto riportato a livello perlopiù descrittivo nei paragrafi precedenti e quanto effettivamente osservato negli studi sul campo. Una rassegna completa dei casi di fioriture rilevate in ambito italiano è riportata nel capitolo A7.

A1.7.1. Sviluppi metalimnetici e superficiali di *Planktothrix rubescens*

P. rubescens è una specie cianobatterica diffusa su tutto il territorio nazionale. Le cellule presentano un diametro di pochi µm, mentre i filamenti possono superare il mm di lunghezza ed essere quindi visibili anche ad occhio nudo. Nel nord Italia è presente sia nei grandi laghi a sud delle Alpi (Ravera & Vollenweider, 1968; Salmaso *et al.*, 2012) sia in ambienti di medie dimensioni, quali i laghi di Pusiano (Legnani *et al.*, 2005), Ledro (Salmaso *et al.*, 2013) e Varese. La specie è stata riscontrata anche in diversi ambienti dell'Italia centrale (Messineo *et al.*, 2006; Manganelli *et al.*, 2010; Funari *et al.*, 2011) e insulare (Naselli-Flores *et al.*, 2007). Nell'Italia meridionale fioriture associate a questa specie sono state recentemente documentate nel Lago Occhito (Assennato *et al.*, 2010, Bogialli *et al.*, 2013), un invaso strategico per la Regione Puglia destinato principalmente a uso potabile e irriguo. A differenza di altre specie cianobatteriche, *P. rubescens* predilige ambienti a trofia intermedia (mesotrofici) e viene descritta come una specie che spesso si sviluppa durante il processo di oligotrofizzazione (Ernst *et al.*, 2009). Nel Lago di Pusiano, ad esempio, questa specie è comparsa all'inizio degli anni 2000 (Legnani *et al.*, 2005) a seguito del progressivo collettamento dei reflui urbani nel bacino imbrifero e della conseguente riduzione delle concentrazioni di fosforo nelle acque (Vuillermotz *et al.*, 2006). Queste caratteristiche sono dovute alle particolarità ecologiche di questa specie. Per svilupparsi con popolazioni consistenti, *P. rubescens* necessita infatti di condizioni caratterizzate dalla presenza di un metalimnio debolmente illuminato. La fotosintesi netta in questa specie è possibile con valori di intensità luminosa fino a 3-4 µmol m^2/s. Se si considera che all'1% dell'intensità luminosa generalmente corrispondono valori di illuminazione attorno a 2-20 µmol m^2/s, lo strato al limite della zona eufotica presenta ancora condizioni ottimali per la crescita di *P. rubescens* (Walsby & Schanz, 2002; Salmaso *et al.*, 2012). Nel metalimnio i cianobatteri possono sfruttare le maggiori concentrazioni di nutrienti disponibili rispetto agli strati più superficiali (Dokulil & Teubner, 2012). D'altra parte, un eccessivo aumento di stato trofico, causando una diminuzione drastica dell'illuminazione metalimnetica, è in grado di determinare una conseguente riduzione di *Planktothrix*. Situazioni di questo tipo sono state per esempio documentate nei laghi di Zurigo e Bourget (Lampert & Sommer, 1997; Jacquet *et al.*, 2005).

In *P. rubescens* il galleggiamento è perlopiù controllato dalla frazione di carboidrati (zavorra) prodotti all'interno della cellula. Negli strati più superficiali, e in condizioni di illuminazione superiori a quelle presenti nello strato metalimnetico, il galleggiamento operato dalle vescicole gassose è controbilanciato da una maggiore produzione di carboidrati e da un conseguente appesantimento delle cellule. A basse intensità luminose la produzione di carboidrati è inferiore e le cellule, diminuendo di densità, si posizionano nello strato metalimnetico (Walsby & Schanz, 2002) (caso 4 in Figura A1.1), ad una profondità definita di galleggiamento neutro, z_n (Walsby *et al.*, 2006). A titolo esemplificativo, filamenti isolati dal Lago di Zurigo presentavano un galleggiamento neutro dopo essere stati sottoposti in coltura a illuminazioni PAR di 6,5 µmol m^2/s e fotoperiodo di 12 ore di luce e 12 di buio, corrispondenti ad un'illuminazione giornaliera per il galleggiamento neutro (Q_n) di 0,28 mol/m^2 (Walsby *et al.*, 2004; Walsby *et al.*, 2006). I valori z_n tenderanno pertanto ad aumentare e diminuire in condizioni rispettivamente di maggiore e minore insolazione.

Nel periodo autunnale/invernale *P. rubescens* può dare luogo a spettacolari fioriture, molte delle quali documentate anche in molti laghi italiani, tra cui i grandi laghi sudalpini (Garibaldi *et al.*, 2000), e i laghi di Pusiano (Legnani *et al.*, 2005; Carraro *et al.*, 2012), Occhito (Assennato *et al.*, 2010; Copetti *et al.*, 2011) e Ledro (Salmaso *et al.*, 2013). Gli addensamenti superficiali presentano un caratteristico colore rosso dovuto alla presenza di ficoeritrina nelle cellule. Le fioriture prendono avvio da una contemporanea e progressiva diminuzione della profondità di galleggiamento neutro, z_n, causata dalla diminuzione della durata e intensità

dell'illuminazione giornaliera, e da un aumento della profondità dello strato rimescolato, z_m. Quando $z_m > z_n$, i filamenti sono trascinati verso la superficie (Walsby & Schanz, 2002), sperimentando una maggiore insolazione media giornaliera nello strato rimescolato (Q_v) e diminuendo la capacità di galleggiamento. Con il progressivo raffreddamento delle acque e all'aumentare di z_m, l'insolazione giornaliera media Q_v diminuisce, fino ad assumere, a specifici valori di profondità critica per il galleggiamento (z_q), valori equivalenti a Q_n, e rendendo i filamenti in grado di galleggiare formando, in condizioni di calma di vento e minore turbolenza, fioriture superficiali (Walsby *et al.*, 2006) (caso 2 in Figura A1.1). Pertanto, fioriture superficiali di *P. rubescens* potranno essere osservate in laghi con una profondità tale da permettere non solo lo sviluppo metalimnetico estivo dei filamenti, ma anche il raggiungimento di profondità di mescolamento richieste per il galleggiamento neutro $z_q \gg z_n$. Una volta in superficie, e in presenza di brezze leggere, i filamenti possono essere trasportati piuttosto rapidamente dalla zona pelagica verso le zone litorali (con spostamenti fino a 160 m h^{-1}; Oliver & Ganf, 2000). Nei laghi profondi *Planktothrix* può subire una completa diluizione lungo tutta la colonna d'acqua nel caso di completo rimescolamento invernale (caso 6 in Figura A1.1). Il periodo autunnale/invernale rappresenta un momento critico del ciclo annuale, in cui la specie viene dispersa su un volume più ampio rispetto ai mesi estivi. L'intensità dell'inoculo invernale è cruciale per il successo della popolazione nella stagione successiva (Dokulil & Teubner, 2012).

Le proliferazioni metalimnetiche di *P. rubescens* possono raggiungere valori di biomassa consistenti. Nel Lago di Occhito, nel giugno del 2009, dopo la fioritura documentata nell'inverno precedente, le densità nella stazione di centro lago presentavano valori superiori a 34.000 cell/mL (Copetti *et al.*, 2011). Nello stesso campionamento, dati raccolti lungo il thalveg con il fluorimetro FluoroProbe (Beutler *et al.*, 2002), hanno evidenziato uno strato ben differenziato tra i 7 e i 14 m di profondità (al limite della zona eufotica) ed esteso per tutta la lunghezza dell'invaso (circa 13 km), con valori di clorofilla-a associati a *Planktothrix* intorno a 20 µg/L (Copetti *et al.*, 2010). In primavera, in condizioni di debole stratificazione termica, la specie può invece distribuirsi in uno strato superficiale di spessore variabile (caso 3 in Figura A1.1) con valori di biomassa anche consistenti. Sempre nel Lago Occhito i dati raccolti sottodiga nell'aprile 2009 indicavano valori di densità medi superiori a 80.000 cell/L (Copetti *et al.*, 2011), con un picco di circa 95.000 cell/L situato a 5 m di profondità nell'incipiente termoclino.

Poiché durante il periodo estivo la popolazione di *P. rubescens* si posiziona in corrispondenza del salto termico (mentre tende a essere dispersa in superficie in periodi dell'anno in cui le acque lacustri non vengono utilizzate dai bagnanti), l'impatto delle fioriture di questa specie sulla balneabilità delle acque risulta sicuramente inferiore rispetto a quello di altre specie cianobatteriche potenzialmente tossiche, mentre risulta più critico in riferimento ad altri usi della risorsa idrica, quali la captazione di acqua per l'approvvigionamento idrico o l'utilizzo irriguo. In questi casi, il cono di risucchio creato dalle opere di presa dell'acqua potabile o per uso irriguo può coinvolgere un ampio strato della colonna d'acqua lacustre in un intervallo compreso tra 10 e 30 metri di profondità, di fatto facilitando l'estrazione della fioritura di *P. rubescens* dal lago, con evidente impatto sanitario sull'uso della risorsa acquatica.

A1.7.2. Fioriture superficiali di *Dolichospermum lemmermannii*

Le fioriture di *D. lemmermannii* rappresentano tipici esempi di fioriture superficiali che si manifestano sotto forma di sottili (1-2 cm) strie giallo-verdi galleggianti sulla superficie dell'acqua in condizioni di elevata stabilità termica (caso 2 in Figura A1.1) e in zone sottovento e riparate (litorali e porti), dando luogo alla formazione di spesse coltri di schiume maleodoranti (caso 1 in

Figura A1.1). Nei grandi laghi italiani a sud delle Alpi, dove questa specie è comparsa dai primi anni '90 del secolo scorso; Salmaso *et al.*, 1994), lo sviluppo delle fioriture è generalmente compreso tra giugno e ottobre, con il massimo dei casi localizzato nei tre mesi più caldi (tra luglio e settembre). In diverse occasioni (es. con continua calma di vento), le fioriture di questa specie presentano una ciclicità di 24 ore, comparendo nelle prime ore del giorno e svanendo nelle ore pomeridiane. Il genere *Dolichospermum* presenta vescicole gassose meno rigide e maggiormente suscettibili all'aumento della pressione di turgore. I valori di "pressione critica" p_c sono dell'ordine di 0,20-0,56 Mpa (*D. flos-aquae*; Hayes *et al.*, 1992). Secondo quanto riportato in Reynolds (2006), *D. lemmermannii* presenterebbe tuttavia vescicole gassose più robuste rispetto alle altre specie dello stesso genere (0,93 MPa). Di giorno la fotosintesi e il turgore cellulare aumentano, le vescicole gassose collassano e le cellule aumentano di densità, sedimentando. A basse illuminazioni il ciclo si inverte e le cellule, di notte, iniziano a risalire. L'accumulo e la respirazione di carboidrati nel controllo del galleggiamento in *Dolichospermum* sembrerebbero di minore importanza rispetto all'azione esercitata dalle variazioni della pressione di turgore (Oliver & Walsby, 1984). Come evidenziato nel paragrafo A1.5, le sottili striscie e marezzature sono il risultato di un veloce accumulo in superficie di popolazioni già presenti nello strato trofogenico, e non tanto di uno sviluppo abnorme nello strato più superficiale. Il numero di cellule presenti nelle fioriture può arrivare a valori molto alti (>> 100.000 cell/mL) (Salmaso, 2000). D'altra parte, essendo strettamente localizzati nei primissimi centimetri della colonna d'acqua, gli episodi osservati trasmettono una falsa impressione di abbondanza algale. Questo appare del tutto evidente se si confrontano le abbondanze relative (in termini di densità o biomassa) di *Dolichospermum* con le altre specie fitoplanctoniche. Nelle normali indagini condotte dal 1993 nello strato 0-20 m del Lago di Garda, questa specie è sempre stata rilevata con biomasse < 50 mm^3/m^3 (640 cell/mL), corrispondenti a una frazione sul totale della comunità sempre inferiore a ca. il 5%. In considerazione della scarsa abbondanza areale, le fioriture pelagiche di *Dolichospermum* sono state descritte con il termine *fioriture oligotrofe* (Salmaso, 2000). Per converso, le fioriture pelagiche, dopo essere state trasportate da venti leggeri e correnti, possono essere accumulate lungo i litorali dando luogo, specialmente nelle baie e porti riparati, a irregolari e più compatti (fino ad alcuni cm) addensamenti di filamenti. Situazioni di questo tipo, documentate per esempio nel porto di Bardolino (Garda) nell'agosto del 2002, sono diventati episodi non così infrequenti anche nei laghi d'Iseo, Como e Maggiore, così come in altri laghi di medie e piccole dimensioni. In questa tipologia di bacini, le fioriture di *D. lemmermannii* possono formare spessi addensamenti lungo ampie zone di costa, con profonde ripercussioni sull'intero sistema lacustre (caso 1 in Figura A1.1).

La formazione delle fioriture pelagiche di *Dolichospermum* richiede una colonna d'acqua stabile e assenza di vento. Elevati livelli di turbolenza tenderebbero infatti a ridistribuire gli organismi lungo la colonna d'acqua. In particolare, è stato osservato che la formazione delle fioriture è particolarmente favorita in presenza di spiccati gradienti termici superficiali e in assenza di evidenti strati epilimnetici, in presenza cioè di un "metalimnio superficiale" (Salmaso, 2005). Strati epilimnetici ben rimescolati, anche se di ridotta estensione (3 m), rappresentano una condizione sfavorevole per l'innesco delle fioriture di *Dolichospermum*. Le condizioni meteorologiche pertanto sono essenziali nel controllo delle fioriture, che potranno essere osservate solo in condizioni favorevoli di tempo atmosferico, temperature stabili ed elevate, e calma di vento. Venti continui attorno a 3-4 m/s sono in grado di formare e mantenere strati rimescolati con spessori di 1 m. Queste intensità di vento costituiscono un valore limite oltre il quale iniziano a formarsi increspature nell'acqua (Webster & Hutchinson, 1994).

A1.7.3. Fioriture di *Microcystis aeruginosa*

In *M. aeruginosa* le vescicole gassose sono più resistenti rispetto a *Dolichospermum* e il controllo del galleggiamento si esplica soprattutto attraverso l'accumulo e la degradazione di carboidrati (Thomas & Walsby, 1985). Il genere *Microcystis* è estremamente diffuso nelle acque superficiali di tutta Italia. La presenza di *Microcystis* è concentrata prevalentemente nel periodo estivo e autunnale negli strati superficiali e può dare origine anche ad intense fioriture con produzione di cianotossine. Il genere può essere classificato tra i cianobatteri tipici di ambienti eutrofici. A titolo esemplificativo, intense fioriture di *Microcystis* sono state osservate nel corso degli anni '80 nel Lago di Como, in coincidenza con il raggiungimento del massimo livello trofico del bacino (Mosello *et al.*, 1991; Mosello *et al.*, 2010). Dal 2007, durante i monitoraggi quindicinali effettuati ai fini della valutazione della balneabilità, seppur in presenza di popolazioni misurabili di *Planktothrix*, nei laghi di Como e Lugano non sono state osservate fioriture. Al contrario, nei laghi minori, quali il Montorfano (Como), *Microcystis* ha dato luogo a fioriture anche intense.

Il Lago di Montorfano è un lago dimittico e poco profondo. Nel 2009 si sono verificate due fioriture di *Microcystis* spp., a luglio e a settembre. In entrambi i casi le densità erano di gran lunga superiori a 100.000 cell/mL. Nei campioni superficiali raccolti a 1 m dalla riva le fioriture erano dovute all'addensamento di *M. aeruginosa* e *M. wesembergii*. La fioritura ha interessato prevalentemente i primi 3-4 metri di costa (caso 1 in Figura A1.1) e l'acqua ha acquisito un'intensa colorazione verde per la presenza di agglomerati cellulari di varie dimensioni visibili ad occhio nudo. Anche al termine delle fioriture la densità delle cellule di *Microcystis* spp. si è mantenuta su livelli elevati (> 10.000 cell/mL) per tutto il periodo estivo e autunnale.

Una serie di osservazioni condotte sui bacini artificiali siciliani ha permesso di mettere in relazione le fioriture di *Microcystis* spp. e le oscillazioni di livello cui questi ambienti sono soggetti a causa del clima mediterraneo (inverni piovosi ed estati asciutte) e dell'insularità della regione (reticolo fluviale per lo più formato da corsi d'acqua temporanei). In particolare l'utilizzo estivo delle acque invasate per far fronte alle necessità irrigue e idropotabili causa un rapido abbassamento della quota del pelo libero. L'abbassamento del livello lacustre e il contemporaneo trascinamento verso il basso del termoclino causa un'immissione negli strati trofogenici di nutrienti di provenienza ipolimnetica (a causa del regime temporaneo degli immissari, nessun afflusso idrico proviene dal bacino nei periodi secchi). Esso inoltre può, in casi estremi, causare la rottura anticipata del termoclino e una circolazione delle acque "fuori stagione" (Naselli-Flores, 2003, 2014; Naselli-Flores & Barone, 2003, 2005, 2007). Peraltro, le elevate temperature estive possono instaurare fenomeni di atelomissi (stratificazione giornaliera) con la creazione di un termoclino effimero e poco profondo ma sufficiente, nei bacini più produttivi, a generare fenomeni di anossia ipolimnetica con la conseguente mobilitazione di fosforo dai sedimenti. La rottura del termoclino e il concomitante sprofondamento repentino della zona di mescolamento alterano i rapporti tra zona di mescolamento e zona eufotica e generano una condizione simile a quella che si ha in ecosistemi profondi durante la circolazione. Quando il rapporto z_{mix}/z_{eu} supera il valore di 3, il bilancio tra fotosintesi e respirazione delle alghe fitoplanctoniche diventa negativo, non consentendo un loro ulteriore sviluppo (Reynolds, 2006). Queste condizioni ambientali, frequentemente riscontrate nei bacini artificiali siciliani, operano come meccanismi di selezione nei confronti di quelle alghe fitoplanctoniche che, a causa di valori di densità delle cellule inferiori a quelli dell'acqua, e delle grandi dimensioni, sono in grado di galleggiare sfuggendo al trascinamento operato dalle masse d'acqua circolanti; tra queste i grandi cianobatteri planctonici gas-vacuolati, e in particolare *Microcystis* spp.. L'abbassamento del livello della superficie lacustre favorisce inoltre il reclutamento delle colonie di *Microcystis* che trascorrono i periodi avversi (p.es. la

stagione invernale) adagiate sui sedimenti lacustri profondi, prive di vescicole gassose (overwintering), e che necessitano di un adeguato stimolo luminoso per tornare a produrre le strutture di galleggiamento (Reynolds, 2006).

A1.7.4. Altri tipi di fioriture

Tra le Nostocales planctoniche, oltre a specie del genere *Dolichospermum*, *C.* (*Aph.*) *ovalisporum* fiorisce frequentemente in area mediterranea in un'ampia varietà di ambienti acquatici. Questa specie, registrata in uno stagno siciliano (Biviere di Gela) a partire dal 2002 con densità pari a circa 500×10^3 cell/mL, fu osservata formare fioriture per la prima volta nel 1994 in Israele nel Lago Kinneret (Pollingher *et al.*, 1998). Successivamente è stata rinvenuta in alcuni laghi greci e in bacini artificiali spagnoli (Gkelis *et al.*, 2005; Quesada *et al.*, 2006). Più in generale, assieme a *C. raciborskii*, nel corso degli ultimi 2-3 decenni l'areale geografico di questa specie ha mostrato una rapida espansione nei laghi situati nelle zone climatiche temperate e subtropicali (Sukenik *et al.*, 2012). La sua abbondante presenza in questi ambienti è stata generalmente messa in relazione con le elevate temperature estive dell'acqua e i ceppi rinvenuti hanno sempre mostrato di produrre CYN (Codd *et al.*, 2005b).

Nel Biviere di Gela, *Aph. ovalisporum* fiorisce irregolarmente in estate quando la temperatura dell'acqua supera i 27°C. Come accennato in precedenza, la specie ha cominciato a manifestarsi quando la vegetazione acquatica del lago, a causa di una alterazione del bilancio idrico, si è estinta trasformando il lago da un ambiente dominato da piante acquatiche e caratterizzato da elevati valori di trasparenza ad un ambiente torbido dominato dal fitoplancton (Barone *et al.*, 2010). I periodi tardo estivi (fine agosto-settembre) sono generalmente dominati da *C. raciborskii* con valori di biovolume al di sotto di 10 mm^3/L. In accordo con Reynolds *et al.* (2002), la regolare comparsa nello stagno di quest'ultima specie è favorita dalle condizioni di bassa disponibilità luminosa, scarsa disponibilità di azoto e assenza di turbolenza nella colonna d'acqua che si realizzano a fine estate.

Negli ambienti temperati, *C. raciborskii* è prevalentemente diffusa in laghi poco profondi, dove le temperature estive dei sedimenti raggiungono valori ≥ a 22-25°C, in grado di far germogliare gli acineti che superano l'inverno nel sedimento. Lo sviluppo di acineti da parte di *C. raciborskii* come strategia di sopravvivenza all'inverno o alle basse temperature, è stato osservato solo nelle zone temperate, dove questa specie può raggiungere concentrazioni molto più elevate di quanto osservato in ambienti tropicali, ma solo durante il periodo estivo (Padisák, 1997). Le fioriture sembrano favorite da condizioni di bassa disponibilità luminosa, scarsa disponibilità di azoto e assenza di turbolenza nella colonna d'acqua che si realizzano a fine estate (Reynolds *et al.*, 2002). Si sviluppano generalmente lungo la colonna d'acqua, senza quasi mai dare luogo a schiume superficiali, ma provocano un lieve cambiamento di colorazione dell'acqua, rendendo meno efficace l'ispezione visiva. Inoltre, i ceppi europei di *Cilindrospermopsis* sono risultati tossici ma non è ancora stata individuata la sostanza responsabile (Fastner *et al.*, 2003), non sembrando produrre (pur con alcune eccezioni, Messineo *et al.*, 2010) né cilindrospermopsina né tossine PSP (*paralytic shellfish poisoning*), come invece avviene per i ceppi australiano e americano, rispettivamente.

A1.8. Conclusioni

La conoscenza dei fattori che favoriscono la crescita dei cianobatteri e il loro sviluppo in forma massiva è essenziale per poter predisporre adeguate misure volte a contrastare e minimizzare i

rischi connessi con la comparsa di genotipi tossici nelle acque destinate ad uso ricreativo e potabile. Nel corso degli ultimi anni, a seguito della maggiore disponibilità di informazioni ottenute nell'ambito delle numerose ricerche scientifiche condotte a livello internazionale, alcuni dei paradigmi su cui si fondavano le tecniche di recupero e salvaguardia dei corpi lacustri si sono andati rapidamente modificando. Se, da una parte, la riduzione dei carichi di fosforo (e in casi specifici azoto) rimane spesso l'unico intervento utile per favorire la riduzione dei cianobatteri, dall'altra parte è aumentata la consapevolezza circa le notevoli differenze nelle risposte delle singole specie di cianobatteri alle modificazioni nelle concentrazioni di nutrienti. Mentre alcune specie sono indicative di condizioni di elevata trofia (*Microcystis* spp.), altre specie, per le loro specifiche caratteristiche autoecologiche, si ritrovano solo in laghi oligo-mesotrofici e mesotrofici (*P. rubescens*) caratterizzati da specifiche caratteristiche fisiografiche e climatiche. Generalizzazioni non sono possibili nemmeno a livello di genere in quanto, per esempio, *P. agardhii* è una specie che, a differenza di *P. rubescens*, predilige laghi mescolati e torbidi.

Su questo quadro, già di per sé articolato, si sovrappongono gli effetti generati dalle variazioni climatiche a diverse scale temporali – da giornaliere a secolari. Le fluttuazioni del clima a livello locale e a scala giornaliera (fluttuazioni meteorologiche) controllano strettamente lo sviluppo delle fioriture (senso stretto) superficiali e, più in generale, la distribuzione delle microalghe nello strato epilimnetico. I cambiamenti climatici su scale decadali e secolari, caratterizzate nel corso dell'ultimo secolo da un significativo aumento delle temperature, sembrerebbero essere strettamente legate all'espansione degli areali di distribuzione di specifici gruppi cianobatterici, e in particolare delle Nostocales. La colonizzazione di *D. lemmermannii* nel Lago di Garda e negli altri grandi laghi a sud delle Alpi sembra avere preso avvio in modo indipendente dallo stato trofico dei bacini. La comparsa di questa specie nel Lago Maggiore, giusto al termine del lungo processo di oligotrofizzazione iniziato negli anni '80 del secolo scorso, e in piene condizioni di oligotrofia, è stato un fatto del tutto inatteso e poco prevedibile, almeno secondo gli standard interpretativi di un decennio fa. D'altra parte, è da sottolineare la necessaria distinzione tra comparsa di nuove specie e intensità di sviluppo. Almeno nei laghi più profondi e con un livello trofico meno accentuato, lo sviluppo di *Dolichospermum* nella colonna d'acqua è sempre molto limitato. Per converso, una volta concentrate nei primi centimetri della colonna d'acqua, o lungo i litorali e baie riparate, le colonie di questa specie costituiscono strati più o meno spessi, con evidenti problemi per l'utilizzo delle acque a scopo ricreativo (compresi gli sport acquatici nelle zone centrali dei corpi lacustri).

La forte variazione esistente nel contenuto di tossine per unità di cellula o biovolume (fino a diversi ordini di grandezza) richiede di essere adeguatamente considerata quando le densità o le biomasse sono utilizzate come criterio per la valutazione del potenziale tossico delle popolazioni cianobatteriche. In un approccio del tutto conservativo, nello spirito della salvaguardia della salute dei bagnanti e in assenza di informazioni sul potenziale di tossicità, le popolazioni cianobatteriche andrebbero considerate costituite interamente da ceppi tossici. La conoscenza delle dinamiche delle popolazioni cianobatteriche permette di inquadrare la dimensione del problema e, attraverso la conoscenza dell'autoecologia delle specie, di prevederne la possibile evoluzione nel tempo. Sulla base di queste premesse, l'utilizzo di valori predeterminati di quote cellulari di tossine potrebbe, nella peggiore delle ipotesi, sottostimare gravemente l'entità del rischio.

L'analisi diretta delle cianotossine costituisce d'altra parte l'unico sistema diretto di valutazione del rischio, che tanto impulso ha avuto relativamente alla definizione delle strategie di monitoraggio con lo sviluppo di tecniche analitiche commerciali di facile applicazione e rapida risposta costituite dalle tecniche ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) di analisi immunoenzimatica. Sul fronte dello studio dello sviluppo dei cianobatteri, un cambiamento di paradigma nel prossimo futuro sarà quanto mai opportuno, richiedendo di spostare la valutazione, interpretazione e gestione del rischio dal livello di *specie* e *popolazione* al livello di *genotipo*

(*ceppo*). In questa prospettiva, il livello di innovazione nella definizione del rischio in ambienti contaminati da cianobatteri sarà strettamente connesso con lo sviluppo di nuove tecnologie che, nel caso dell'identificazione di genotipi tossici o dell'espressione della tossicità in tempo reale, sono in una fase di differente sviluppo, a seconda del tipo di tossine analizzate (Humbert *et al.*, 2010; Kaushika & Balasubramanian, 2013; Srivastava *et al.*, 2013; Weller, 2013).

Bibliografia

Anneville O, Pelletier JP. Recovery of Lake Geneva from eutrophication: quantitative response of phytoplankton. *Arch Hydrobiol* 2000;148:607-24.

Assennato G, Blonda M, Cudillo B, Gifuni S, Petruzzelli MR, Pastorelli AM, UngaroN. Cyanobacteria bloom in the Occhito artificial lake (southern Italy): relationship between *Planktothrix rubescens* density and microcystin concentration. *Fresen Environ Bull* 2010;19:1795-801.

Bar-Yosef Y, Sukenik A, Hadas O, Viner-Mozzini Y, Kaplan A. Enslavement in the water body by toxic *Aphanizomenon ovalisporum*, inducing alkaline phosphatase in phytoplanktons. *Curr Biol* 2010;20(17):1557-61.

Barone R, Castelli G, Naselli-Flores L. Red sky at night cyanobacteria delight: the role of climate in structuring phytoplankton assemblage in a shallow, Mediterranean lake (Biviere di Gela, southeastern Sicily). *Hydrobiologia* 2010;639:43-53.

Bates BC, Kundzewicz ZW, Wu S, Palutikof JP (Ed.). *Climate change and water. Technical paper of the intergovernmental panel on climate change*. Geneva: IPCC Secretariat; 2008 p. 210.

Beard SJ, Handley BA, Walsby AE. Spontaneous mutations in gas vesicle genes of *Planktothrix* spp. affect gas vesicle production and critical pressure. *FEMS Microbiol Lett* 2002;215:189-95.

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*. *Photosynth Res* 2002;72:39-53.

Bogialli S, Nigro di Gregorio F, Lucentini L, Ferretti E, Ottaviani M, Ungaro N, Abis PP, Cannarozzi de Grazia M. Management of a toxic cyanobacterium bloom (*Planktothrix rubescens*) affecting an Italian drinking water basin: A case study. *Environ Sci Technol* 2013;47:574-83.

Bowmer KH, Padovan A, Oliver RL, Korth W, Ganf GG. Physiology of geosmin production by *Anabaena circinalis* isolated from the Murrumbidgee River, Australia. *Water Sci Technol* 1992;25:259-67.

Briand E, Gugger M, Francois JC, Bernard C, Humbert JF, Quiblier C. Temporal variations in the dynamics of potentially microcystin-producing strains in a bloom-forming *Planktothrix agardhii* (Cyanobacterium) population. *Appl Environ Microbiol* 2008a;74(12):3839-48.

Briand E, Yepremian C, Humbert JF, Quiblier C. Competition between microcystin- and non-microcystin-producing *Planktothrix agardhii* (cyanobacteria) strains under different environmental conditions. *Environ Microbiol* 2008b;10(12):3337-48.

Bright DI, Walsby AE. The relationship between critical pressure and width of gas vesicles in isolates of *Planktothrix rubescens* from Lake Zürich. *Microbiology* 1999;145:2769-75.

Carey CC, Ibelings BW, Hoffmann EP, Hamilton DP, Brookes JD. Eco-physiological adaptations that favour freshwater cyanobacteria in a changing climate. *Water Res* 2012;46:1394-407.

Carraro E, Guyennon N, Hamilton D, Valsecchi L, Manfredi EC, Viviano G, Salerno F, Tartari G, Copetti D. Coupling high-resolution measurements to a three dimensional lake model to assess the spatial and temporal dynamics of the cyanobacterium *Planktothrix rubescens* in a medium-sized lake. *Hydrobiologia* 2012;698:77-95.

Cerasino L, Salmaso N. Diversity and distribution of cyanobacterial toxins in the Italian subalpine lacustrine district. *Oceanol Hydrobiol Studies* 2012;41:54-63.

Chu Z, Jin X, Yang B, Quigru Z. Buoyancy regulation of *Microcystis flos-aquae* during phosphorus limited and nitrogen limited growth. *J Plankton Res* 2007;29:739-45.

Codd GA, Chorus I, Burch M. Design of monitoring programmes. In: Chorus I, Bartram J (Ed.). *Toxic cyanobacteria in water: a guide to their public health consequences, monitoring and management*. London, New York: E&FN Spon; 1999. (Published on behalf of WHO). p. 313-28.

Codd GA, Lindsay J, Young FM, Morrison LF, Metcalf JS. Harmful cyanobacteria. From mass mortalities to management measures. In: Huisman J, Matthijs HTP, Visser PM. *Harmful cyanobacteria*. Dordrecht, The Netherlands: Springer; 2005a.

Codd GA, Morrison LF, Metcalf JS. Cyanobacterial toxins: risk management for health protection. *Toxicol Appl Pharm* 2005b;203:264-72.

Conley DJ, Paerl HW, Howarth RW, Boesch DF, Seitzinger SP, Havens KE, Lancelot C, Likens GE. Controlling eutrophication: nitrogen and phosphorus. *Science* 2009;323:1014-5.

Copetti D, Guzzella L, Mingazzini M, Vignati D, Mastroianni D, Tartari G, Palumbo MT, Valsecchi L, Guyennon N, Ghislanzoni L, Legnani D, Pozzoni F. *Studio limnologico e valutazione della produzione di microcistine associate a una intensa fioritura di P. rubescens nel Lago Occhito*. *Rapporto Finale.* Roma: IRSA-CNR; 2010.

Copetti D, Valsecchi L, Ghislanzoni L, Pozzoni F, Carraro E, Guyennon N, Tartari G, Guzzella L. Intense *Planktothrix rubescens* blooms in a South Italy multiple-uses reservoir and their impact on the agricultural irrigation network. In: *Program and book of abstracts of the 16 the Workshop of the International Association of Phytoplankton Taxonomy and Ecology (IAP).* San Michele all'Adige (Trento). 21-28 August, 2012, 27.

Cronberg G, Annadotter H. *Manual on aquatic cyanobacteria. A photo guide and synopsis of their toxicology*. Copenhagen: ISSHA and IOC of UNESCO; 2006.

D'Alelio D, Gandolfi A. Recombination signals in the rpoc1 gene indicate gene-flow between *Planktothrix* (cyanoprokaryota) species. *J Phycol* 2012;48:1424-32.

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 Biol* 2011;56(8):1481-93.

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.

D'Alelio D, Salmaso N, Gandolfi A. Frequent recombination shapes the epidemic population structure of *Planktothrix* (cyanoprokaryota) in Italian sub-alpine lakes. *J Phycol* 2013;49:1107-17.

Dadheech PK, Glöckner G, Casper P, Kotut K, Mazzoni CJ, Mbedi S, Krienitz L. Cyanobacterial diversity in the hot spring, pelagic and benthic habitats of a tropical soda lake. *FEMS Microbio Ecol* 2013;85:389-401.

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.

Davis TW, Harke MJ, Marcoval MA, Goleski J, Orano-Dawson C, Berry DL, Gobler CJ. Effects of nitrogenous compounds and phosphorus on the growth of toxic and non-toxic strains of *Microcystis* during cyanobacterial blooms. *Aquat Microb Ecol* 2010;61(2):149-62.

De Clerck O, Guiry MD, Leliaert F, Samyn Y, Verbruggen H. Algal taxonomy: a road to nowhere? *J Phycol* 2013;49(2):215-25.

Dietrich D, Hoeger S. Guidance values for microcystins in water and cyanobacterial supplement products (blue-green algal supplements): A reasonable or misguided approach? *Toxicol Appl Pharm* 2005;203(3 SPEC. ISS.):273-89.

Dokulil M, Teubner K. Cyanobacterial dominance in lakes. *Hydrobiologia* 2000;438:1-12.

Dokulil M, Teubner K. Deep living *Planktothrix rubescens* modulated by environmental constraints and climate forcing. *Hydrobiologia* 2012;698:29-46.

Downing JA, Watson SB, McCauley E. Predicting Cyanobacteria dominance in lakes. *Can J Fish Aquat Sci* 2001;58:1905-8.

Elliott JA, Jones ID, Thackeray SJ. Testing the sensitivity of phytoplankton communities to changes in water temperature and nutrient load, in a temperate lake. *Hydrobiologia* 2006;559:401-11.

Ernst B., Hoeger SJ, O'Breien E, Dietrich DR. Abundance and toxicity of *Planktothrix rubescens* in the pre-alipine Lake Ammersee, Germany. *Harmful Algae* 2009;8:329-42.

Fastner J, Heinze R, Humpage AR, Mischke U, Eaglesham GK, Chorus I. Cylindrospermopsin occurrence in two German lakes and preliminary assessment of toxicity and toxin production of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanobacteria) isolates. *Toxicon* 2003;42:313-21.

Francis G. Poisonous Australian lakes. *Nature* 1878;18:1-12.

Funari E, Manganelli M, Scardala S, Stefanelli M, Palazzo F, Testai E, Gemma S, Vichi S. *Indagine per approfondire gli aspetti sanitari associati alle fioriture di Planktothrix rubescens nel Lago di Vico. Relazione finale*. Roma: Istituto Superiore di Sanità, Provincia di Viterbo; 2011.

Funari E, Manganelli M, Sinisi L. Impact of climate change on waterborne diseases. *Ann Ist Super Sanità* 2012;48(4):473-83.

Funari E, Testai E. Human health risk assessment related to cyanotoxins exposure. *Crit Rev Toxicol* 2008;38:97-125.

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.* Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2000. (Rapporti ISTISAN 00/30). p. 117-35.

Geider RJ, La Roche J. Redfield revisited: variability of C:N:P in marine microalgae and its biochemical basis. *Eur J Phycol* 2002;37:1-17.

George G (Ed.). *The impact of climate change on European lakes*. Dordrecht: Springer, 2010.

Gkelis S, Moustaka-Gouni M, Sivonen K, Lanaras T. First report of the cyanobacterium *Aphanizomenon ovalisporum* Forti in two Greek lakes and cyanotoxin occurrence. *J Plankton Res* 2005;27:1295-300.

Graham LE, Graham JM, Wilcox LW. *Algae*. 2nd edition. San Francisco: Benjamin Cummings; 2009,

Guiry MD, Guiry GM. *AlgaeBase* [Internet]. Galway: National University of Ireland; 1996-2015. Disponibile all'indirizzo:www.algaebase.org; ultima consultazione 17/12/2014.

Hayes P K, Buchholz B, Walsby AE. Gas vesicles are strengthened by the outer-surface protein, GvpC. *Arch Microbiol* 1992;157:229-34.

Hickel B, Pollingher U. Identification of the bloom-forming Peridinium from Lake Kinneret (Israel) as P. gatunense (Dinophyceae). *Brit J Phycol* 1988;23:115-9.

Hoffmann L, Komarek J, Kastovsky J. System of cyanoprokaryotes (cyanobacteria) state in 2004. *Algol Stud* 2005;117:95-115.

Hotto AM, Satchwell MF, Berry DL, Gobler CJ, Boyer GL. Spatial and temporal diversity of microcystins and microcystin-producing genotypes in Oneida Lake, NY. *Harmful Algae* 2008;7(5):671-81.

Hoyer AB, Moreno-Ostos E, Vidal J, Blanco JM, Palomino-Torres RL, Basanta A, Escot C, Rueda FJ. The influence of external perturbations of the functional composition of phytoplankton in a Mediterranean reservoir. *Hydrobiologia* 2009;636:49-64.

Humbert JF, Quiblier C, Gugger M. Molecular approaches for monitoring potentially toxic marine and freshwater phytoplankton species. *Anal Bioanal Chem* 2010;397:1723-32.

Hyenstrand P, Blomquist P, Pettersson A. Factors determining cyanobacterial success in aquatic systems – a literature review. *Arch Hydrobiol, Spec Issues Advanc Limnol* 1998;51:41-62.

Jaquet S, J. Briand F, Leboulanger C, Avois-Jacquet C, Oberhaus L, Tassin B, Vinçon-Leite B, Paolini G, Druart JC, Anneville O, Humbert J-F. The proliferation of the toxic cyanobacterium *Planktothrix rubescens* following restoration of the largest natural French lake (Lac du Bourget). *Harmful Algae* 2005;4:651-72.

Jeppesen E, Søndergaard M, Jensen JP, Havens KE, Anneville O, Carvalho L, Coveney MF, Deneke R, Dokulil MT, Foy B, Gerdeaux D, Hampton SE, Hilt S, Kangur K, Köhler J, Lammens EHHR, Lauridsen TL, Manca M, Miracle MR, Moss B, Nõges P, Persson G, Phillips G, Portielje R, Romo S, Schelske CL, Straile D, Tatrai I, Willén, E, Winder M. Lake responses to reduced nutrient loading - An analysis of contemporary long-term data from 35 case studies. *Freshwater Biol* 2005;50(10):1747-71.

Jöhnk KD, Huisman J, Sharples J, Sommeijer B, Visser PM, Stroom JM. Summer heat waves promote blooms of harmful cyanobacteria. *Glob Change Biol* 2008;14:495-512.

Kardinaal WE, Visser PM. Dynamics of cyanobacterial toxins. Sources of variability in microcystin concentrations. In: Huisman J, Matthijs HCP, Visser PM (Ed.). *Harmful cyanobacteria.* Dordrecht: Springer; 2005. p. 41-63.

Kaushika R, Balasubramanian R. Methods and approaches used for detection of cyanotoxins in environmental samples: a review. *Crit Rev Env Sci Tec* 2013;43:1349-83.

Kinsman R, Ibelings BW, Walsby AE. Gas vesicle collapse by turgor pressure and its role in buoyancy regulation by *Anabaena flos-aquae*. *J Gen Microbiol* 1991;137:1171-8.

Kleinteich J, Wood SA, Küpper FC, Camacho A, Quesada A, Frickey T, Dietrich DR. Temperature-related changes in polar cyanobacterial mat diversity and toxin production. *Nature Climate Change* 2012;2:356-60.

Komárek J. Cyanobacterial taxonomy: current problems and prospects for the integration of traditional and molecular approaches. *Algae* 2006;21:349-75.

Komárek J. Modern taxonomic revision of planktic nostocacean cyanobacteria: a short review of genera. *Hydrobiologia* 2009a;639(1):231-43.

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* 2009b;639(1):245-59.

Komárek J. *Süsswasserflora von Mitteleuropa: Bd. 19/3. Cyanoprokaryota 3. Teil. Heterocytous Genera.* Heidelberg: Springer Spektrum; 2013.

Komárek J, Anagnostídis K. *Süsswasserflora von Mitteleuropa: Bd. 19/1 Cyanoprokaryota 1. Teil: Chroococcales.* Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag; 1998.

Komárek J, Anagnostidis K. *Süsswasserflora von Mitteleuropa: Bd. 19/2. Cyanoprokaryota 2. Teil: Oscillatoriales*. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag; 2005.

Komárek J, Hauer T. *CyanoDB.cz - On-line database of cyanobacterial genera* [Internet]. České Budějovice, Třeboň (Czech Republic): University of South Bohemia & Institution of Botany; ultimo aggiornamento 2014. Disponibile all'indirizzo: www.cyanodb.cz; ultima consultazione 17/12/2014.

Komárek J, Zapomělová E. Planktic morphospecies of the cyanobacterial genus *Anabaena* subg. *Dolichospermum* – 1. part: coiled types. *Fottea* 2007;7:1-31.

Krienitz L. Algae. In: Likens GE (Ed.) *Encyclopedia of inland waters*. vol 1. Oxford: Elsevier; 2009. p. 103-13.

Kurmayer R, Dittman E, Fastner J, Chorus I. Diversityof microcystin genes within a population of the toxic cyanobacterium *Mycrocystis* spp. in lake Wannsee (Berlin, Germany). *Microbial Ecol* 2002;43:107-18.

Lampert W, Sommer U. *Limnoecology. The ecology of lakes and streams*. New York: Oxford University Press; 1997.

Legnani E, Copetti D, Oggioni A, Tartari G, Palumbo MT, Morabito G. *Planktothrix rubescens'* seasonal and spatial distribution in Lake Pusiano (North Italy). *J Limnol* 2005;64:61-73.

Lehman PW, Boyer G, Hall C, Waller S, Gehrts K. Distribution and toxicity of a new colonial *Microcystis aeruginosa* bloom in the San Francisco Bay Estuary, California. *Hydrobiologia* 2005;541(1):87-99.

Lewis Jr WM, Wurtsbaugh WA. Control of lacustrine phytoplankton by nutrients: erosion of the phosphorus paradigm. Int. Rev. *Hydrobiologia* 2008;93:446-65.

Lindholm T, Eriksson JE, Meriluoto JAO. Toxic cyanobacteria and water quality problems - Examples from a eutrophic lake on Åaland, South West Finland. *Water Res* 1989;23:481-6.

Livingstone D, Jaworski GHM. The viability of akinetes of blue-green algae recovered from the sediments of Rostherne Mere. *Brit Phycol J* 1980;15(4):357-64.

Lürling M, Eshetul F, Faassen EJ, Kosten S, Huszar VLM. Comparison of cyanobacterial and green algal growth rates at different temperatures. *Freshwater Biol* 2013;58:552-9.

Makhalanyane TP, Valverde A, Lacap DC, Pointing SB, Tuffin MI, Cowan DA. Evidence of species recruitment and development of hot desert hypolithic communities. *Environ Microbiol Reports* 2013;5:219-24.

Manganelli M, Scardala S, Stefanelli M, Palazzo F, Funari E, Vichi S, Buratti FM, Testai E. Emerging health issues of cyanobacterial blooms. *Ann Ist Super Sanità* 2012;48(4):415-28.

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 Res* 2010;44(5):1297-306.

Matsumura-Tundisi T, Tundisi JG, Luzia AP, Degani RM. Occurrence of *Ceratium furcoides* (Levander) Langhans 1925 bloom at the Billings Reservoir, São Paulo State, Brazil. *Braz J Biol* 2010;70:825-9.

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.

Messineo V, Mattei D, Melchiorre S, Salvatore G, Bogialli S, Salzano R, Mazza R, Capelli G, Bruno M. Microcystin diversity in a *Planktothrix rubescens* population from Lake Albano (central Italy). *Toxicon* 2006;48:160-74.

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. *Environ Toxicol* 2010;25:18-27.

Metcalf JS, Codd GA. Cyanotoxins. In: Whitton BA (Ed.). *Ecology of Cyanobacteria II: Their diversity in space and time*. Dordrecht: Springer; 2012. p. 651-75.

Mez K, Beattie KA, Codd GA, Hanselmann K, Hauser B, Naegeli H, Preisig HR. Identification of a microcystin in benthic cyanobacteria linked to cattle deaths on alpine pastures in Switzerland. *Eur J Phycol* 1997;32(2):111-7.

Mez K, Hanselmann K, Preisig HR. Environmental conditions in high mountain lakes containing toxic benthic cyanobacteria. *Hydrobiologia* 1998;368(1-3):1-15.

Miller MA, Kudela RM, Mekebri A, Crane D, Oates SC, Tinker MT, Staedler M, Miller WA, Toy-Choutka S, Dominik C, Hardin D, Langlois G, Murray M, Ward K, Jessup DA. Evidence for a novel marine harmful algal bloom: cyanotoxin (microcystin) transfer from land to sea otters. *PLoS ONE* 2010;5(9):e12576.

Moccia A, Decet F, Salmaso N. Plankton and nutrients evolution of a piedmont reservoir in Northern Italy (L. Santa Croce). *Verhandlungen der IVL* 2000;27:2929-33.

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;24:167-77.

Mosello R, Ruggiu D, Pugnetti A, Moretti M. Observed trends in the trophic conditions and possible recovery of the deep subalpine Lake Como (Northern Italy). *Memorie dell'Istituto italiano di Idrobiologia* 1991;49:79-98.

Nakano S, Nakajima T, Hayakawa K, Kumagai M, Jiao C. Blooms of the Dinoflagellate *Ceratium hirundinella* in large enclosures placed in Lake Biwa. *Jpn J Limnol* 1999;60:495-505.

Naselli-Flores L. Man-made lakes in Mediterranean semi-arid climate: the strange case of Dr Deep Lake and Mr Shallow Lake. *Hydrobiologia* 2003;506/509:13-21.

Naselli-Flores L. Mediterranean climate and eutrophication of reservoirs: limnological skills to improve management. In: Ansari AA, Gill SS, Lanza GR, Rast W (Ed.). *Eutrophication: causes, consequences and control.* Dordrecht: Springer; 2011. p. 131-42.

Naselli-Flores L. Morphological analysis of phytoplankton as a tool to assess ecological state of aquatic ecosystems. The case of Lake Arancio, Sicily, Italy. *Inland Waters* 2014;4:15-26.

Naselli-Flores L, Barone R. Steady-state assemblages in a Mediterranean hypertrophic reservoir. The role of *Microcystis* ecomorphological variability in maintaining an apparent equilibrium. *Hydrobiologia* 2003;502:133-43.

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.

Naselli-Flores L, Barone R. Pluriannual morphological variability of phytoplankton in a highly productive Mediterranean reservoir (Lake Arancio, Southwestern Sicily). *Hydrobiologia* 2007;578:87-95.

Naselli-Flores L, Barone R, Chorus I, Kurmayer R. Toxic cyanobacterial blooms in reservoirs under a semiarid Mediterranean climate: the magnification of a problem. *Environ Toxicol* 2007;22:399-404.

Neilan BA, Pearson LA, Muenchhoff J, Moffitt MC, Dittmann E. Environmental conditions that influence toxin biosynthesis in cyanobacteria. *Environ Microbiol* 2013;15:1239-53.

Oh H-M, Lee SJ, Jang M-H, Yoon B-D. Microcystin Production by *Microcystis aeruginosa* in a phosphorus-limited chemostat. *Appl Environ Microbiol* 2000;66(1):176-9.

Okello W, Ostermaier V, Portmann C, Gademann K, Kurmayer R. Spatial isolation favours the divergence in microcystin net production by *Microcystis* in Ugandan freshwater lakes. *Water Res* 2010;44(9):2803-14.

Oliver RL, Ganf GG. Freshwater blooms. In: Whitton BA, Potts M (Ed.). *The ecology of cyanobacteria*. Dordrecht, the Netherlands: Kluwer Academic Publishers; 2000. p. 149-94.

Oliver RL, Hamilton DP, Brookes JD, Ganf GG. Physiology, blooms and prediction of planktonic cyanobacteria. In: Whitton BA. (Ed.). *Ecology of Cyanobacteria II: Their diversity in space and time*. Dordrecht: Springer; 2012. p. 155-94.

Oliver RL, Walsby AE. Direct evidence for the role of light mediated gas vesicle collapse in the buoyancy regulation of *Anabaena flos-aquae* (Cyanobacteria). *Limnol Oceanogr* 1984;29:879-86.

O'Neil JM, Davis TW, Burford MA, Gobler CJ. The rise of harmful cyanobacteria blooms: The potential roles of eutrophication and climate change. *Harmful Algae* 2012;14:313-34.

Orr PT, Jones GJ. Relationship between microcystin production and cell division rates in nitrogen-limited *Microcystis aeruginosa* cultures. *Limnol Oceanogr* 1998;43(7):1604-14.

Padisák J. *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska) Seenayya et Subba Raju, an expanding, highly adaptive cyanobacterium: worldwide distribution and review of its ecology. *Arch Hydrobiol Suppl* 1997;107:563-93.

Padisák J. Phytoplankton. In: O'Sullivan PE, Reynolds CS (Ed.). *The lakes handbook, vol. 1, Limnology and limnetic ecology*. Malden: Blackwell Publishing; 2004. p. 251-308.

Padisák J, Soróczki-Pintér E, Rezner Z. Sinking properties of some phytoplankton shapes and the relation of form resistance to morphological diversity of plankton-an experimental study. *Hydrobiologia* 2003;500:243-57.

Paerl HW. Growth and reproductive strategies of freshwater blue-green algae (Cyanobacteria). In: Sandgren CD. (Ed.). *Growth and reproductive strategies of freshwater phytoplankton*. Cambridge: Cambridge University Press; 1988. p. 261-315.

Paerl H,. 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; 2008. p. 217-37.

Paerl HW, Fulton RS. Ecology of harmful cyanobacteria. In: Granéli E, Turner JT (Ed.). *Ecology of harmful algae. Ecological Studies Series*. Heidelberg: Springer-Verlan 2006;189(8):95-109.

Paerl HW, Huisman J. Climate: Blooms like it hot. *Science* 2008;320(5872):57-8.

Paerl HW, Huisman J. Climate change: A catalyst for global expansion of harmful cyanobacterial blooms. *Environ Microbiol Rep* 2009;1(1):27-37.

Paerl HW, Paul VJ. Climate change: Links to global expansion of harmful cyanobacteria. *Water Res* 2012;46(5):1349-63.

Pollingher U, Hadas O, Yacobi Y Z, Zohary T, Berman T. *Aphanizomenon ovalisporum* (Forti) in Lake Kinneret, Israel. *J Plank Res* 1998;20:1321-39.

Posch T, Köster O, Salcher MM, Pernthaler J. Harmful filamentous cyanobacteria favoured by reduced water turnover with lake warming. *Nature Climate Change* 2012;2:809-13.

Prescott GW. Objectionable algae with reference to the killing of fish and other animals. *Hydrobiologia* 1948;1(1-4):1-13.

Preußel K, Wessel G, Fastner J, Chorus I. Response of cylindrospermopsin production and release in *Aphanizomenon flos-aquae* (Cyanobacteria) to varying light and temperature conditions. *Harmful Algae* 2009;8(5):645-50.

Ptacnik R, Lepistö L, Willén E, Brettum P, Andersen T, Rekolainen S, Lyche Solheim A, Carvalho L. Quantitative responses of lake phytoplankton to eutrophication in Northern Europe. *Aquat Ecol* 2008;42:227-36.

Quesada A, Moreno E, Carrasco D, T Paniagua, Wormer L, De Hoyos C, Sukenik A. Toxicity of *Aphanizomenon ovalisporum* (Cyanobacteria) in a Spanish water reservoir. *Eur J Phycol* 2006;41:39-45.

Quiblier C, Wood S, Echenique-Subiabre I, Heath M, Villeneuve A, Humbert J-F. A review of current knowledge on toxic benthic freshwater cyanobacteria: ecology, toxin production and risk management. *Water Res* 2013;47:5464-79.

Ravera O, Vollenweider RA. *Oscillatoria rubescens* D.C. as an indicator of Lago Maggiore eutrophication. *Schweizerische Zeitschrift für Hydrologie-Swiss J Hydrol* 1968;30:374-80.

Reynolds CS. *The ecology of phytoplankton*. Cambridge: Cambridge University Press; 2006.

Reynolds CS, Dokulil M, Padisák J (Ed.). *Development in hydrobiology. The trophic spectrum revisited*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers; 2000.

Reynolds CS, Huszar VL, Kruk C, Naselli-Flores L, Melo S. Towards a functional classification of the freshwater phytoplankton. *J Plank Res* 2002;24:417-28.

Reynolds CS, Walsby AE. Water blooms. *Biol Rev* 1975;50 (4):437-81.

Rigosi A, Rueda FJ. Hydraulic control of short-term successional changes in the phytoplankton assemblage in stratified reservoirs. *Ecol Eng* 2012;44:216-26.

Robson BJ, Hamilton DP. Summer flow event induces a cyanobacterial bloom in a seasonal Western Australian estuary. *Mar Freshwat Res* 2003;54(2):139-51.

Romo S, Soria J, Fernández F, Ouahid Y, Barón-Solá A. Water residence time and the dynamics of toxic cyanobacteria. *Freshwater Biol* 2013;58(3):513-22.

Ross C, Santiago-Vázquez L, Paul V. Toxin release in response to oxidative stress and programmed cell death in the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. *Aquat Toxicol* 2006;78(1):66-73.

Ryding S-O, Rast W (Ed.). *The control of eutrophication of lakes and reservoirs*. Paris: UNESCO & The Parthenon Publishing Group; 1989.

Saker ML, Griffiths DJ. The effect of temperature on growth and cylindrospermopsin content of seven isolates of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Nostocales, Cyanophyceae) from water bodies in northern Australia. *Phycologia* 2000;39(4):349-54.

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;438:43-63.

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.

Salmaso N. Influence of atmospheric modes of variability on the limnological characteristics of a deep lake south of the Alps. *Climate Research* 2012;51:125-33.

Salmaso N, Boscaini A, Shams S, Cerasino L. Strict coupling between the development of *Planktothrix rubescens* and microcystin quota in two nearby lakes south of the Alps (lakes Garda and Ledro). *Annales de Limnologie - Int J Limnol* 2013;49:309-18.

Salmaso N, Buzzi F, Cerasino L, Garibaldi L, Leoni B, Morabito G, Rogora M, Simona M. Influence of atmospheric modes of variability on the limnological characteristics of large lakes south of the Alps: a new emerging paradigm. *Hydrobiologia* 2014;731:31-48.

Salmaso N, Buzzi F, Garibaldi L, Morabito G, Simona M. Effects of nutrient availability and temperature on phytoplankton development: A case study from large lakes south of the Alps. *Aquat Sci* 2012;74:555-70.

Salmaso N, Cavolo F, Cordella P. Fioriture di *Anabaena* e *Microcystis* nel Lago di Garda. Eventi rilevati e caratterizzazione dei periodi di sviluppo. *Acqua Aria* 1994;1:17-28.

Salmaso N, Miola A, Cordella P. Phytoplankton succession in the euphotic zone of Lake Corlo (Northern Italy) during summer stratification. *Giornale Botanico Italiano* 1992;126:463-80.

Salmaso N, Mosello R. Limnological research in the deep southern subalpine lakes: synthesis, directions and perspectives. *Adv Oceanogr Limnol* 2010;1:29-66.

Salmaso N, Tolotti M. Other phytoflagellates and groups of lesser importance. In: Likens GE (Ed.). *Encyclopedia of inland waters, vol 1*. Oxford: Elsevier; 2009. p. 174-83.

Shams S, Cerasino L, Salmaso N, Dietrich DR. Experimental models of microcystin accumulation in *Daphnia magna* grazing on *Planktothrix rubescens*: Implications for water management. *Aquatic Toxicol* 2014;148:9-15.

Schindler DW. The dilemma of controlling cultural eutrophication of lakes. *P Roy Soc Lond B Bio* 2012;279(1746):4322-33.

Schopf JW. The fossil record of cyanobacteria. In: Whitton BA (Ed.). *Ecology of cyanobacteria II: Their diversity in space and time*. Dordrecht: Springer; 2012. p. 15-36.

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, New York: E&FN Spon; 1999. (Published on behalf of WHO). p. 41-111.

Smith VH. Low nitrogen to phosphorus ratios favor dominance by blue green algae in lake phytoplankton. *Science* 1983;221(4611):669-71.

Sommer U. Factors controlling the seasonal variation in phytoplankton species composition. A case study for a deep, nutrient rich lake. *Prog Phyc Res* 1987;5:123-78.

Sommer U, Adrian R, Bauer B, Winder M. The response of temperate aquatic ecosystems to global warming: Novel insights from a multidisciplinary project. *Mar Biol* 2012;159(11):2367-77.

Sommer U, Gaedke U, Schweizer A. The first decade of oligotrophication of Lake Constance II. The response of phytoplankton taxonomic composition. *Oecologia* 1993;93:276-84.

Sotton B, Guillard J, Anneville O, Maréchal M, Savichtcheva O, Domaizon I. Trophic transfer of microcystins through the lake pelagic food web: evidence for the role of zooplankton as a vector in fish contamination. *Sci Total Environ* 2014;466-467:152-163.

Srivastava A, Singh S, Ahn C-Y, Oh H-M, Asthana R.K. Monitoring approaches for a toxic cyanobacterial bloom. *Environ Sci Technol* 2013; 47(16):8999-9013. DOI: 10.1021/es401245k

Stal LJ. Cyanobacterial mats and stromatolites. In: Whitton BA, Potts M (Ed.). *The ecology of cyanobacteria*. Dordrecht, the Netherlands: Kluwer Academic Publishers; 2000. p. 61-120.

Staal M, Meysman FJ, Stal LJ. Temperature excludes N_2-fixing heterocystous cyanobacteria in the tropical oceans. *Nature* 2003;425:504-7.

Sukenik A, Hadas O, Kaplan A, Quesada A. Invasion of Nostocales (cyanobacteria) to subtropical and temperate freshwater lakes – Physiological, regional and global driving forces. *Front Microbiol* 2012;3:86.

Thomas RH, Walsby AE. Buoyancy regulation in a strain of *Microcystis*. *J Gen Microbiol* 1985;131:799-809.

Thomazeau S, Houdan-Fourmont A, Couté A, Duval C, Couloux A, Rousseau F, Bernard C. The contribution of sub-Saharan African strains to the phylogeny of cyanobacteria: focusing on the Nostacaceae (Nostocales, Cyanobacteria). *J Phycol* 2010;46(3):564-79.

Tonk L, Bosch K, Visser PM, Huisman J. Salt tolerance of the harmful cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. *Aquat Microb Ecol* 2007;46(2):117-23.

Trimbee AM, Prepas EE. Evaluation of total phosphorus as a predictor of the relative biomass of blue-green algae with emphasis on Alberta lakes. *Can J Fish Aquat Sci* 1987;44(7):1337-42.

Üveges V, Tapolczai K, Krienitz L, Padisák J. Photosynthetic characteristics and physiological plasticity of an *Aphanizomenon flos-aquae* (Cyanobacteria, Nostocaceae) winter bloom in a deep oligo-mesotrophic lake (Lake Stechlin, Germany). *Hydrobiologia* 2012;698(1):263-72.

Vasas G, Bácsi I, Surányi G, Hamvas M, Máthé C, Nagy S, Borbély G. Isolation of viable cell mass from frozen *Microcystis viridis* bloom containing microcystin-RR. *Hydrobiologia* 2010;639(1):147-51.

Visser PM, Ibelings BW, Mur LR. Autumnal sedimentation of *Microcystis* is the result of an increase in carbohydrate ballast, triggered by a decrease in water temperature. *J Plankton Res* 1995;17:919-33.

Vuillermoz E, Legnani E, Copettti D, Tartari G. Thirty-years of Lake Pusiano (North Italy) evolution. *Verh Internat Verein Limnol* 2006;29:2009-14.

Wacklin P, Hoffman L, Komárek J. Nomenclatural validation of the genetically revised cyanobacterial genus *Dolichospermum* (Ralfs ex Bornet et Flahault) comb. nova. *Fottea* 2009;9:59–64.

Wagner C, Adrian R. Cyanobacteria dominance: Quantifying the effects of climate change. *Limnol Oceanogr* 2009;54:2460-8.

Walsby AE. Gas vesicles. *Microbiol Rev* 1994;58:94-144.

Walsby AE, Avery A, Schanz F. The critical pressures of gas vesicles in *Planktothrix rubescens* in relation to the depth of winter mixing in Lake Zurich, Switzerland. *J Plankton Res* 1998;20:1357-75.

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* 2004;162:133-45.

Walsby AE, Schanz F. Light-dependent growth rate determines changes in the population of *Planktothrix rubescens* over the annual cycle in Lake Zürich, Switzerland. *New Phytologist* 2002;154:671-87.

Walsby AE, Schanz F, Schmid M. The Burgundy-blood phenomenon: a model of buoyancy change explains autumnal water blooms by *Planktothrix rubescens* in Lake Zürich. *New Phytologist* 2006;169(1):109-22.

Watson SB, McCauley E, Downing JA. Patterns in phytoplankton taxonomic composition across temperate lakes of differing nutrient status. *Limnol Oceanogr* 1997;42:487-95.

Webster IT, Hutchinson PA. Effect of wind on the distribution of phytoplankton cells in lakes revisited. *Limnol Oceanogr*1994;39:365-73.

Weller MG. Immunoassays and biosensors for the detection of cyanobacterial toxins in water. *Sensor* 2013;13:15085-112.

Winder M. Limnology: Lake warming mimics fertilization. *Nature Climate Change* 2012;2:771-2.

Winder M, Sommer U. Phytoplankton response to a changing climate. *Hydrobiologia* 2012;698:5-16.

Zapomelová E, Skaácelová O, Pumann P, Kopp R, Janecek E. Biogeographically interesting planktonic Nostocales (Cyanobacteria) in the Czech Republic and their polyphasic evaluation resulting in taxonomic revisions of *Anabaena bergii* Ostenfeld 1908 (*Chrysosporum* gen. nov.) and *A. tenericaulis* Nygaard 1949 (*Dolichospermum tenericaule* comb. nova). *Hydrobiologia* 2012;698:353-65.

Zohary T, Padisák J, Naselli-Flores L (Ed.). Phytoplankton in the physical environment: papers from the 15th workshop of the International Association for Phytoplankton Taxonomy and Ecology (IAP) held at the Ramot Holiday Resort on the Golan Heights, Israel, 23-30 November 2008. *Hydrobiologia* 2010;639(1).

A2. PROFILO TOSSICOLOGICO DELLE CIANOTOSSINE

Emanuela Testai*, Franca M. Buratti
Dipartimento di Ambiente e Connessa Prevenzione Primaria, Istituto Superiore di Sanità, Roma
**emanuela.testai@iss.it*

A2.1. Introduzione

A causa dell'aumento del carico di nutrienti in corpi idrici superficiali associati ad attività agricole e ad altre attività antropiche, così come ad eventi estremi come siccità, alluvioni o aumenti di temperatura legati a cambiamenti climatici, i cianobatteri hanno trovato condizioni favorevoli alla loro crescita fino a densità tanto elevate da formare fioriture e schiume. La presenza di fioriture di cianobatteri in corpi idrici superficiali utilizzati sia per attività ricreative che come fonte di acque da destinare all'uso umano possono rappresentare un rischio per la salute della popolazione esposta, a causa della produzione di tossine cianobatteriche, prodotte come metaboliti secondari.

Le cianotossine possono essere raggruppate in base alla loro struttura chimica in tre gruppi principali: i) eptapeptidi ciclici come le microcistine (MC), le nodularine (NOD) e la cilindrospermopsina (CYN); ii) alcaloidi come le anatossine e le saxitossine e iii) tossine lipopolisaccaridiche (LPS).

Alternativamente sono raggruppate a seconda degli effetti che producono in:

- epatotossine (più di 100 MC, circa 9 NOD);
- citotossine (CYN);
- neurotossine (anatossine e saxitossine; β-N-metilamino-L-alanina, BMAA);
- tossine irritative (LPS).

Le cianotossine descritte finora rappresentano molto probabilmente solo una piccola percentuale delle possibili tossine prodotte dai cianobatteri, che sintetizzano anche altri metaboliti secondari non ancora ben caratterizzati relativamente al loro profilo tossicologico. I cianobatteri infatti possono produrre un numero elevato di altri peptidi bioattivi, incluse microviridine, microginine e ciano-peptolidi, ma poco si sa sulla loro funzione, sulla presenza nell'ambiente e sull'impatto sulla salute umana e ambientale (1). Ciascuna cianotossina può essere prodotta da più di una specie, così come una stessa specie/ceppo può sintetizzare tossine diverse (per dettagli su questo aspetto *vedi* paragrafo A7.2).

La popolazione può essere esposta alle cianotossine i) durante attività ricreative e professionali (es. pescatori, sportivi professionisti), ii) in seguito all'uso potabile delle acque contaminate e altri usi umani (uso delle acque nella produzione alimentare, nelle procedure di dialisi, ecc.), iii) attraverso il consumo di cibi contaminati (soprattutto prodotti ittici) e di integratori alimentari a base di cianobatteri e a seguito di uso irriguo (2, 3). Relativamente all'esposizione attraverso l'uso ricreativo delle acque, le vie di esposizione più rilevanti sono: la via cutanea, attraverso il contatto diretto con le acque contaminate, la via inalatoria (sia per i bagnanti che per chi svolge attività nelle aree circostanti il corpo idrico contaminato) e la via orale (associata, ad esempio, all'ingestione involontaria di acqua durante il nuoto). È evidente che durante l'attività di balneazione tutte e tre le vie possono essere coinvolte contemporaneamente e che esiste, indipendentemente dalla via di esposizione, la potenzialità di produrre sia effetti locali al punto di contatto (es. pelle, occhi, epitelio gastro-intestinale e delle vie respiratorie) che effetti sistemici a seguito di assorbimento e ingresso in circolo.

Per la valutazione del rischio associata alla esposizione durante le attività di balneazione e ricreative è importante considerare che: i) la stagionalità delle fioriture rende gli scenari di esposizione cronica poco plausibili; ii) le specie che fioriscono esclusivamente durante la stagione invernale costituiscono un rischio limitato per la balneazione; iii) nelle aree in cui si verificano frequentemente fioriture in concomitanza dello svolgimento di attività ricreative e/o di balneazione, gli scenari più rappresentativi sono quelli di esposizione subacuta/subcronica.

I rischi potenziali sono associati sia alle proprietà chimico fisiche e al profilo tossicologico delle cianotossine che alla identificazione degli scenari e dei livelli di esposizione, in grado di causare effetti locali al sito di contatto (effetti topici) o effetti sistemici in seguito ad assorbimento e distribuzione ai vari organi bersaglio. Di seguito verrà preso in considerazione il profilo tossicologico delle varie tossine, evidenziando gli effetti prodotti (topici e/o sistemici) a seconda delle via di esposizione. La via orale sarà la prima ad essere descritta poiché a questa via di esposizione si riferisce la maggior parte dei dati disponibili sul profilo tossicologico delle varie cianotossine.

A2.2. Effetti dovuti ad esposizione per la via orale

A2.2.1. Microcistine e nodularine

Le MC e le NOD sono peptidi ciclici costituiti da sette (MC) o cinque (NOD) amminoacidi. Una caratteristica comune di entrambi i gruppi di epatotossine è l'amminoacido Adda (acido-3-ammino-9-metossi-2,6,8-trimetil-10-fenildeca-4(*E*),6(*E*)-dienoico) che in natura si trova solo nei cianobatteri. Le variazioni strutturali derivano dalla sostituzione di due (MC) o un (NOD) amminoacido e diversi altri cambiamenti (es. demetilazioni in vari gruppi funzionali); queste differenze portano a più di 100 congeneri di MC e 9 varianti di NOD (4,5). Nella Figura A2.1 è mostrata la struttura chimica del congenere MC-LR, uno dei più diffusi, caratterizzato dalla presenza di leucina (L) e arginina (R) come L-amminoacidi in posizione 2 e 4 (6). Sulla base della tossicità acuta la MC-LR è considerata tra i congeneri con la più elevata epatossicità e conseguentemente è la più studiata.

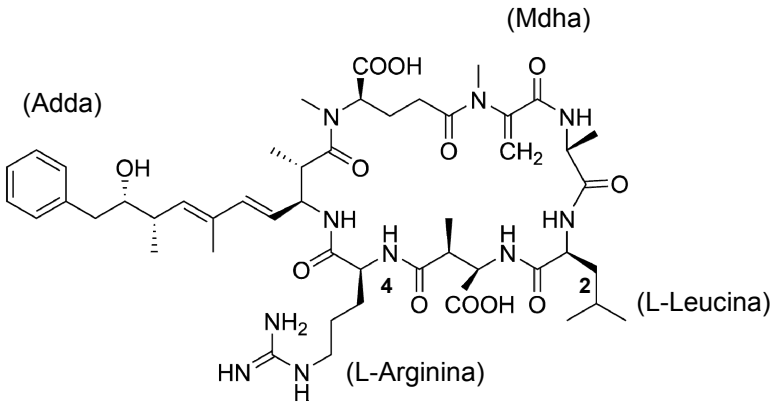


Figura A2.1. Struttura chimica della MC-LR, caratterizzata dalla presenza di leucina (L) in posizione 2 e di arginina (R) in posizione 4

Il meccanismo di azione delle MC è associato alla specifica inibizione delle fosfatasi PP1 e PP2A, alterando la fosforilazione delle proteine cellulari coinvolte nei segnali di trasduzione (7). La capacità di inibire *in vitro* la PP1 e PP2A è più o meno comparabile tra i singoli congeneri con valori di IC_{50} (concentrazione in grado di inibire il 50% dell'attività dell'enzima) nell'ordine del nanomolare (8-11). Ad alti livelli di esposizione (rappresentativi delle intossicazioni acute), la MC-LR provoca una cascata di eventi (alterazioni del citoscheletro, perossidazione lipidica, stress ossidativo, apoptosi) che portano a tossicità centro-lobulare con aree di emorragia intra-epatica, dovuta al danneggiamento dei capillari sinusoidali. A basse dosi, tipiche dell'esposizione a lungo termine, l'inibizione delle fosfatasi inducono proliferazione cellulare e ipertrofia epatica (7). È stato dimostrato che le MC inducono stress ossidativo producendo ossigeno reattivo (*Reactive Oxygen Species*, ROS) sia *in vivo* che *in vitro* (12), probabilmente a causa del legame dell'epatotossina all'aldeide deidrogenasi mitocondriale (ALDH2): è noto infatti che l'alterazione di questa attività enzimatica anche nell'uomo è coinvolta nell'induzione dello stress ossidativo (13).

L'entità della tossicità dipende sia dalla durata che dai livelli di esposizione ed è determinata dal bilancio tra assorbimento, detossificazione ed escrezione delle MC. La MC-LR è altamente idrofilica e non può attraversare le membrane cellulari per trasporto passivo. È assorbita attivamente dalla mucosa intestinale tramite il sistema di trasporto degli anioni organici (*Organic Anion-Transporting Polypeptide*, OATP); entra poi negli epatociti grazie all'attività sia dei trasportatori degli acidi biliari che degli OATP (10). Anche gli altri congeneri si servono di questi trasportatori che sono espressi anche nel rene e nella barriera emato-encefalica, spiegando parzialmente alcuni disordini neurologici osservati nell'uomo durante una intossicazione fatale in Brasile (14) e macro alterazioni della funzionalità renale a dosi sub-letali (55 µg/kg) (15). Per alcune MC specifiche come la MC-LF e MC-LW (16) e più recentemente anche per la MC-LR (17,18) sono stati riportati anche effetti neurotossici. Per questo motivo è stato ipotizzato un ruolo dei cianobatteri e delle cianotossine nella eziologia della sclerosi laterale amiotrofica (SLA) e dell'Alzheimer suggerendo che la neurotossicità delle MC possa essere legata a processi neurodegenerativi (17, 19, 20).

Minimi cambiamenti strutturali tra le MC portano a differenze di 3-4 volte nell'assorbimento, distribuzione tissutale ed escrezione (21): tali differenze cinetiche spiegherebbero la tossicità congenere-specifica, visto che l'inibizione delle fosfatasi misurata *in vitro* con i diversi congeneri è comparabile. È stato dimostrato che i trasportatori epatici OATP1B1 e 1B3 sono selettivi rispetto ai congeneri nel loro trasporto negli epatociti umani: a parità di concentrazione nominale di esposizione, MC-LW e MC-LF inducono effetti citotossici a concentrazioni più basse di MC-LR e MC-RR (10), perché la concentrazione intracellulare è in realtà più elevata a causa di un maggior *uptake*. Inoltre le cellule HEK293 che sovra-esprimono OATP1B1 o 1B3 risultano più sensibili alla MC-LR rispetto alla MC-RR suggerendo un assorbimento inferiore della MC-RR (9,10).

Relativamente alla biotrasformazione, le MC sono coniugate con il glutatione ridotto (GSH) nel fegato sia degli organismi acquatici (22) sia dei mammiferi (23, 24). La reazione può avvenire sia spontaneamente che enzimaticamente, catalizzata dalle glutatione –S-transferasi, e coinvolge il gruppo metilico della N-metil-deidro-alanina (opposta all'Adda). I coniugati mantengono una attività inibitoria minima residua rispetto al composto parentale e sono escreti principalmente nelle urine (25), per cui la reazione rappresenta una via di detossificazione. La coniugazione è stata caratterizzata principalmente con MC-LR in estratti cellulari di organismi acquatici e di topo (26, 27) e *in vivo* in invertebrati, piante, mitili pesci e roditori (22, 23, 28, 29). Sono disponibili anche dati su MC-RR su topo (24) e pesci (30,31) *in vivo* e in linee cellulari BY-2 da piante di tabacco (32). In generale le informazioni sulla biotrasformazione nell'uomo sono scarse. Recentemente la formazione dell'addotto è stata caratterizzata per MC-

LR e MC-RR, usando sia GST umane ricombinanti che citosol epatico umano: i dati mostrano che l'uomo è in grado di metabolizzare le MC, e che la detossificazione della MC-RR risulta più efficiente rispetto alla MC-LR (33,34), contribuendo ulteriormente a spiegare la differenze di tossicità acuta tra i vari congeneri.

La tossicità acuta della MC-LR dopo somministrazione intra-peritoneale (ip) nei topi indica una LD_{50} (*Lethal Dose* 50% degli animali trattati) = 50 µg/kg peso corporeo (pc), mentre per via orale il composto risulta meno tossico (LD_{50} = 5000 µg/kg pc e anche più alta nel ratto) (35,36). La tossicità acuta orale più bassa di 30-100 volte dipende probabilmente da differenze tossico-cinetiche, legate alla via di esposizione: il sistema di trasporto attivo coinvolto nell'assorbimento attraverso la mucosa gastrointestinale (GI) è bypassato dall'iniezione ip, rendendo la MC-LR direttamente biodisponibile per l'internalizzazione negli epatociti (2). Questa ipotesi è parzialmente supportata da studi di distribuzione che mostrano come nel topo, dopo somministrazione orale e ip i livelli epatici di ^{3}H-dihydro-MC-LR radio-marcata differiscono di circa 80 volte (37-39). Perciò la somministrazione ip non è completamente rappresentativa delle reali condizioni di esposizione umana associate principalmente con il consumo di acqua e cibo contaminato e quindi mostra un limitato valore per la valutazione del rischio.

La tossicità acuta è molto variabile tra i congeneri: la MC-LA, -YR e -YM, mostrano una LD_{50} ip simile alla MC-LR, il che ha fatto presupporre che la presenza di amminoacidi idrofobici come l'alanina o la fenilalanina non influisca sulla tossicità acuta (40). La MC-RR che ha degli amminoacidi polari in posizione sia 2 che 4, ha una LD_{50} 10 volte più alta della MC-LR (41, 42). Per altri congeneri i valori di LD_{50} cadono in un ampio range di valori compreso tra 50 e 1200 µg/kg pc (Tabella A2.1), ma l'informazione non è disponibile per tutti i congeneri (es. MC-LW e -LF).

Tabella A2.1. Differenze in tossicità acuta delle varianti di MC

Tossina	ip LD_{50} (µg/kg)	PM	Struttura*
MC-LR	50	994	**cyclo-(D-Ala-L-Leu-D-MeAsp-L-Arg-Adda-D-Glu-Mdha-)**
[D-Asp^{3}]MC-LR	50	970	cyclo-(D-Ala-L-Leu-D-**Asp**-L-Arg-Adda-D-Glu-Mdha-)
[L-MeLan^{7}]MC-LR	1000	1115	cyclo-(D-Ala-L-Leu-D-MeAsp-L-Arg-Adda-D-Glu-**L-MeLan**-)
[6(Z)-Adda^{5}]MC-LR	>1200	994	cyclo-(D-Ala-L-Leu-D-MeAsp-L-Arg-**6(Z)Adda**-D-Glu-Mdha)
MC-LA	50	909	cyclo-(D-Ala-L-Leu-D-MeAsp-**L-Ala-**Adda-D-Glu-Mdha-)
MC-RR	500	1037	cyclo-(D-Ala-**L-Arg**-D-MeAsp-L-Arg-Adda-D-Glu-Mdha-)
[Dha^{7}]MC-RR	180	980	cyclo-(D-Ala-**L-Arg**-D-MeAsp-L-Arg-Adda-D-Glu-**Dha**-)
[6(Z)-Adda^{5}]MC-RR	>1200	1037	cyclo-(D-Ala-**L-Arg**-D-MeAsp-L-Arg-**6(Z)Adda**-D-Glu-Mdha)
MC-YR	150-200	1044	cyclo-(D-Ala-**L-Tyr**-D-MeAsp-L-Arg-Adda-D-Glu-Mdha-)
MC-YA	60-70	959	cyclo-(D-Ala-**L-Tyr**-D-MeAsp-**L-Ala**-Adda-D-Glu-Mdha-)
MC-AR	250	952	cyclo-(D-Ala-**L-Ala**-D-MeAsp-L-Arg-Adda-D-Glu-Mdha-)
MC-M(O)R	700-800	1028	cyclo-(D-Ala-**L-Met(O)**-D-MeAsp-L-Arg-Adda-D-Glu-Mdha-)

*I residui amminoacidici diversi dalla MC-LR son riportati in grassetto
ip= intraperitoneale; PM= Peso Molecolare
Dati da (40)

La stereochimica del gruppo Adda e la configurazione dei suoi doppi legami sono cruciali per l'inibizione delle PP1 e PP2A indotte dalle MC (43). Tuttavia l'Adda di per se non è capace di inibire la PP1 e la PP2A e non mostra tossicità se iniettata per via ip nei topi anche a dosi molto alte (10 mg/kg pc) (44).

Tra gli studi disponibili di tossicità ripetuta il più rilevante è stato condotto sul topo, che è più suscettibile agli effetti acuti indotti dalle MC rispetto agli altri roditori. In tale studio la MC-LR è stata somministrata oralmente tramite gavaggio per 90 giorni a 3 dosi differenti (35)

identificando la dose a cui non si osserva alcun effetto (*No Observed Adverse Effect Level*, NOAEL): 40 µg/kg pc/giorno (35). Lievi danni epatici sono stati osservati in un numero limitato di animali trattati con la dose immediatamente superiore, 200 µg/kg pc/giorno, che perciò è stata identificata come LOAEL (*Lowest Adverse Effect Level*, la dose più bassa che dava effetto), mentre alla più alta dose testata di 1mg/kg pc/giorno tutti gli animali mostravano lesioni epatiche tipiche dell'azione della MC-LR. Quando in un altro studio i topi sono stati trattati attraverso la dieta con un estratto contenente MC-LR, regime di somministrazione più simile all'esposizione umana, il valore di NOAEL è risultato più alto: 333 µg/kg pc/giorno (45), attribuibile a differenze di tossicocinetica. Infatti il gavaggio corrisponde ad un'unica dose bolo, che implica una più alta concentrazione nei tessuti rispetto a quella derivante da una graduale introduzione mediante la dieta, dando la possibilità ai sistemi di detossificazione/escrezione di lavorare efficientemente (senza essere saturati).

Riguardo altri *end-point* tossicologici rilevanti per la valutazione del rischio, la MC-LR pura non ha mostrato attività teratogena nei topi e in colture embrionali di topo (46). Risultati contrastanti sono stati descritti in relazione ad effetti embriotossici e teratogeni nella rana a seguito di esposizione con estratti di cianobatteri che producono MC-LR (46-48). Quando visibili, gli effetti embriotossici non correlavano con il contenuto di MC, suggerendo che gli estratti potessero contenere altri composti bioattivi oltre le MC. Trattamenti ip acuti e sub-acuti (3,75-30 µg/kg pc al giorno) (49) o prolungati (1-3,2-10 µg/L per 3 e 6 mesi per via orale) (50) con MC-LR hanno suggerito la presenza di effetti tossici *in vivo* sul sistema riproduttivo maschile dei roditori, a partire dalla dose intermedia (3,2-10 µg/L) con riduzione dei livelli di testosterone, atrofia testicolare, alta incidenza di anormalità spermatiche dose e tempo dipendenti (49, 50). Tuttavia, i dati relativi alla somministrazione ip hanno un valore limitato; nel caso dell'altro studio è utile sottolineare che l'espressione degli OATP (particolarmente di OATP1B2) non è mai stata confermata nel testicolo, per cui a meno che non siano presenti altre vie, finora non identificate, resta da capire come la MC-LR possa essere entrata nelle cellule del sistema riproduttivo maschile per causare i danni descritti, ponendo un serio limite, ammesso dagli stessi autori, ai risultati dello studio.

Sono disponibili dati anche sul sistema riproduttivo femminile, a seguito di esposizione a MC-LR (0, 5, e 20 µg/kg) di topi femmina per 28 giorni via ip: sono stati descritti alla dose più alta aumento del peso delle ovaie, del livello nel siero del progesterone, ma non del FSH (*Follicle-Stimulating Hormone*) o del LH (*Luteinizing Hormone*), con disturbi del ciclo di estro derivante probabilmente da un effetto diretto sulle ovaie nelle quali è stata trovata presenza di MC-LR (51). Tuttavia, deve essere ancora sottolineato l'uso di una via di somministrazione poco rappresentativa: se questi studi possono avere un valore per l'idenficazione di un potenziale *hazard*, hanno un valore limitato per la valutazione del rischio.

Anche alla luce di recenti pubblicazioni può essere ragionevolmente esclusa una diretta interazione con il DNA, responsabile dell'attività genotossica (52-54). I risultati positivi di danno al DNA sia *in vivo* che *in vitro* sono stati ottenuti solo a dosi altamente citotossiche, suggerendo il coinvolgimento della DNA endonucleasi (55-57). Le MC pure a concentrazioni fino a 10 mg/mL non sono mutagene nei batteri (54), mentre possono dare qualche risultato positivo se testate come estratti, probabilmente per la presenza di qualche altro componente non identificato (54). Nelle cellule di mammifero mostrano di indurre formazione di ROS con danno indiretto del DNA e formazione di micronuclei (53). In cellule epatiche (epatociti primari e HepG2), che presumibilmente esprimono attività degli OATP, l'induzione di ROS si osserva a concentrazioni nanomolari (53). È stata ipotizzata inoltre l'interferenza con due pathway di riparazione del DNA, per cui l'induzione di danno ossidativo al DNA e conseguente inibizione del riparo ed esposizione a basse concentrazioni potrebbero contribuire alla instabilità genomica (53).

La MC-LR non ha mostrato nessuna induzione di tumori quando somministrata per gavaggio per 28 settimane (80 µg/kg pc/giorno) (58). L'attività di promozione tumorale della MC-LR (associata alla inibizione delle fosfatasi) è stata evidenziata (59,60) e confermata dalla somministrazione della cianotossina con noti cancerogeni come l'aflatossina B1 e la dietil-nitrosammina (61,62). L'Agenzia internazionale per la ricerca sul cancro (*International Agency for Research on Cancer*, IARC) ha rivisto i dati disponibili sulla cancerogenicità della MC-LR, concludendo che non ci sono evidenze sufficienti sia nell'uomo che nei modelli sperimentali animali sulla cancerogenicità della MC-LR. Comunque sulla base di dati su meccanismi di promozione tumorale, la IARC ha classificato la MC-LR come possibile cancerogeno nell'uomo (Group2B) (63).

La MC-LR è la MC più studiata, ma recentemente cominciano ad essere pubblicati lavori su altri congeneri con caratteristiche strutturali diverse per esempio congeneri più idrofobici, avendo un triptofano (W) o una fenilalanina (F) al posto dell'arginina (R): recentemente vari studi *in vitro* hanno mostrato una loro maggiore tossicità rispetto la MC-LR. La MC-LW e LF sono risultate più citotossiche per esempio negli epatociti umani, nelle cellule embrioniche di rene che esprimono i trasportatori OATP e nelle cellule Caco-2 (10,11). Anche nelle cellule cerebrali murine si evidenziano maggiori effetti neurodegenerativi (MC-LF >> MC-LW > MC-LR) dipendenti dalla concentrazione e dal congenere (16). Poiché MC-LW e MC-LF inibiscono le fosfatasi in maniera simile o più debolmente della MC-LR (9-11), la loro maggiore tossicità è stata attribuita ad una maggiore facilità ad entrare nelle cellule per la maggiore affinità dei trasportatori (16) o per una differente interazione con le membrane (64) e per una diversa possibilità di essere detossificate (34). La rilevanza di questi dati può essere esemplificata considerando i dati di un recente studio (65) in cui si evidenziava che MC-LW e MC-LF erano presenti nel 32% di campioni d'acqua di laghi tedeschi contenenti MC contribuendo in media, quando presenti, al 10% della concentrazione totale di MC. Gli autori però ipotizzavano che considerando la loro possibile alta tossicità il loro contributo alla tossicità totale delle MC saliva al 45% (65).

La NOD è un penta-peptide che condivide con le MC non solo una struttura chimica simile, ma anche il meccanismo di azione che prevede l'inibizione delle fosfatasi (66, 67). Ad oggi sono state individuate 9 varianti, due delle quali prodotte da *Nodularia* in Nuova Zelanda, con variazioni anche sull'Adda in grado di ridurne quasi totalmente la tossicità. Infatti è l'Adda che blocca l'attività fosfatasica interagendo con il gruppo idrofobico dell'enzima, ostruendo così l'entrata del substrato nella tasca catalitica. Il residuo D-Glu è essenziale per l'induzione della tossicità, tanto che la esterificazione del carbossile libero la elimina. Le NOD non sono comunque così ben studiate come le MC.

La LD_{50} ip nei topi è simile a quella calcolata per la MC-LR (50-70 µg/kg pc); non sono disponibili dati rilevanti per la valutazione del rischio sulla tossicità ripetuta (5). Risulta comunque ragionevole considerare almeno come "worst case" la comparazione con MC-LR e adottare il suo valore di NOAEL, esprimendo le concentrazioni di NOD come MC-LR equivalenti.

La tossina si distribuisce principalmente nel fegato dopo iniezione intravenosa (iv) di una dose non letale nel topo (68) ma anche l'intestino e il sangue hanno livelli significativi di tossina. Similmente alle MC, la NOD viene trasportata dall'intestino al fegato, dove entra per trasporto attivo dovuto a un non specifico OATP. È epatotossica e il danno epatico include perossidazione lipidica, perdita di integrità delle membrane, apoptosi, frammentazione del DNA. Al contrario delle MC-LR la NOD non lega covalentemente la PP1 e la PP2A pur mostrando simile capacità inibitoria (67). La NOD inibisce l'attività della PP2A in maniera più efficiente della PP1 a concentrazioni simili alle MC (~0,1 nM).

Viste le dimensioni inferiori dell'anello della NOD rispetto alle MC, è stato proposto che possa entrare più facilmente negli epatociti e possa essere la ragione del fatto che la NOD è considerata un promotore tumorale più potente della MC-LR (53,68). Rispetto alla genotossicità, *in vitro* ha mostrato di comportarsi come le MC, induce ROS e conseguente danno ossidativo al DNA e interferisce nei *pathway* di riparazione; aumenta la frequenza di cellule polinucleate suggerendo che possa agire come aneugeno (53). I dati disponibili sono ancora limitati per affermare che la NOD possa avere un potenziale genotossico/cancerogeno e per tale motivo è attualmente classificata dalla IARC come sospetto cancerogeno per l'uomo (Group 3) (53).

A2.2.2. Cilindrospermopsina

La molecola della CYN è composta da un gruppo guanidinico triciclico combinato con un idrossimetil-uracile (Figura A2.2). È considerata una citotossina, poiché produce effetti sia epatotossici che nefrotossici, sebbene altri organi possono anche essere danneggiati in seguito all'esposizione (69-72).

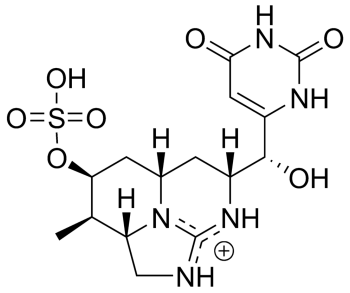


Figura A2.2. Struttura chimica della CYN

La CYN è altamente idrofila e il suo assorbimento intestinale necessita di un sistema di trasporto attivo, come anche per entrare negli epatociti attraverso il sistema di trasporto degli acidi biliari (73). Comunque, a causa delle piccole dimensioni della molecola è possibile anche una limitata diffusione passiva attraverso le membrane biologiche, come evidenziato da studi *in vitro* che mostrano effetti citotossici anche in linee cellulari che non esprimono il sistema di trasporto degli acidi biliari (73).

Quando [^{14}C]-CYN (0,2 mg/kg pc) è stata somministrata nei topi per via ip, 6 ore dopo il trattamento la radioattività fu recuperata principalmente nel fegato e in maniera minore nel rene, rispettivamente il 20,6% e il 4,3% della dose somministrata. Nel fegato circa il 2% della dose iniettata era ancora rilevabile una settimana dopo la somministrazione. La principale via di eliminazione è l'escrezione urinaria: il 50-70% della radioattività somministrata risultava presente nelle urine entro 6-12 ore; il 72% della dose urinaria escreta, pari a circa il 50% della dose somministrata, era il composto parentale (74), indicando che solo metà della CYN subiva biotrasformazione.

Dati sperimentali sia *in vivo* nei roditori (74, 75) che *in vitro* in epatociti primari (76,77) sebbene indirettamente (con uso di inibitori e induttori) indicano che la CYN è bioattivata dal citocromo P450 (P450). La sostanziale deplezione del GSH osservata dopo somministrazione orale di CYN nei ratti fa ipotizzare che possa essere ulteriormente metabolizzata attraverso la coniugazione con il GSH (76). Tuttavia la riduzione della quantità di GSH può essere anche

attribuita all'inibizione della sintesi del GSH, con riduzione della capacità di detossificazione delle cellule (77).

La CYN ha una tossicità acuta tardiva e progressiva: dopo un trattamento con dose letale il decesso sopraggiunge in un ampio intervallo di tempo (24-120 ore). Infatti la LD_{50} nei topi dopo iniezione ip di CYN pura è 2,1 mg/kg pc dopo 24 ore, ma è 10 volte più bassa (LD_{50}= 0,2 mg/kg pc) quando il periodo di osservazione è prolungato a 120-144 ore (70). Un andamento simile è stato visto anche iniettando nei topi estratti di *Cylindrospermopsis raciborskii* contenenti CYN. Il valore di LD_{50} a 7 giorni era circa 0,18 mg CYN equivalenti/kg pc. L'estratto somministrato ai topi per via orale causa una minore tossicità acuta (LD_{50} orale=4,4-6,9 mg CYN eq/kg pc dopo 2-6 giorni), (71,78) dovuta probabilmente a differenze di tossicocinetica (2). Il danno epatico acuto è localizzato nelle aree centrolobulari, essendo caratterizzato da vacuoalizzazione degli epatociti e incremento delle pigmentazione dei nuclei e del citoplasma. Le principali espressioni della tossicità renale sono aumento del lumen dei tubuli prossimali, alterazioni nei glomeruli e necrosi (69).

Il meccanismo di azione della CYN tal quale è stato associato all'inibizione della sintesi proteica (72), mentre i metaboliti molto probabilmente agiscono con differente modalità (79). Infatti, in esperimenti *in vitro* con epatociti di topo, concentrazioni di CYN $\leq$ 0,5μM inibirono la sintesi proteica, ma la necrosi si verificava solo a concentrazioni 10 volte più alte. La presenza di inibitori del P450 preveniva la morte delle cellule (osservata in 18 ore) ma non l'inibizione della sintesi delle proteine. Questo suggerisce che, a basse concentrazioni di CYN, la tossicità è prevalentemente dovuta al composto parentale via inibizione della sintesi proteica, mentre a più alte concentrazioni i composti tossicologicamente rilevanti sono molto probabilmente rappresentati dai metaboliti della CYN con effetti citotossici (80,81). Inoltre in una serie di linee cellulari di mammifero sono riportati effetti inibitori della crescita cellulare o citotossicità (12,82-86). Studi recenti hanno dimostrato che la CYN induce stress ossidativo mediato dai ROS che producono perossidazione lipidica in epatociti primari (12,87) e apoptosi anche a concentrazioni dell'ordine del nanomolare (88).

Tra gli studi di tossicità ripetuta disponibili, due sono stati considerati rilevanti per la valutazione del rischio: 1) topi trattati per 10 settimane con 3 dosi di estratti di *C. raciborskii* contenenti CYN disciolti nell'acqua da bere (corrispondenti a 0, 216, 432, e 657 μg tossina equivalenti/kg pc al giorno), e 2) topi trattati per 11 settimane per gavaggio con CYN purificata (0, 30, 60, 120, and 240 μg/kg pc al giorno) (89). Entrambi i trattamenti mostrarono un incremento dose-dipendente del peso di fegato e rene, alterazioni negli enzimi plasmatici (usati come marker di tossicità epatica e renale) e consistenti cambiamenti istopatologici ad alte dosi. Nessun NOAEL poté essere derivato dallo studio con l'estratto, poiché gli effetti furono evidenti in tutti gli animali ad ogni dose. Nello studio con la CYN pura, gli effetti renali si evidenziavano a dosi più basse e fu identificato un NOAEL di 30 μg/kg pc al giorno, sulla base dell'incremento del peso del rene osservato alla dose testata immediatamente superiore (60 μg/kg pc al giorno=LOAEL). Comparando i due studi allo stesso livello di equivalenti di tossina (216 e 240 μg tossina equivalenti/kg pc al giorno) il grado di severità degli effetti era più alto nel caso della somministrazione dell'estratto rispetto alla tossina pura. Il risultato suggerisce che altri costituenti dei cianobatteri oltre alla CYN possono contribuire alla tossicità.

È disponibile anche un ulteriore studio sub-cronico che descrive la tossicità orale in topi esposti a CYN nell'acqua da bere per 42 settimane (90), i cui risultati supportano qualitativamente quanto evidenziato precedentemente, confermando che il fegato e il rene sono i principali target della tossicità indotta dalla CYN. Inoltre furono anche riportati l'aumento dei livelli di colesterolo nel sangue e fegato e le variazioni dei parametri ematici (elevato ematocrito e deformazione dei globuli rossi). Tuttavia a causa del disegno sperimentale non standardizzato (gruppo sperimentale costituito da un animale per sesso trattato con CYN a dose giornaliera

gradualmente crescente ogni 8 settimane da 10 a 55 µg/kg pc) (91), non è possibile derivare da questo studio un adeguato valore di riferimento.

Per quanto riguarda altri *end-point* tossicologici, la struttura chimica della tossina (presenza di gruppi simil-guanidina e solfati potenzialmente reattivi) potrebbe suggerire una possibile interazione con il DNA che porti ad eventuale attività genotossica .Nonostante una serie di dati apparentemente contrastanti, sembra generalmente accettato che la CYN necessiti di essere metabolicamente attivata per poter esplicare effetti genotossici, clastogenici e aneugenici (53). In una linea cellulare di linfoblasti mancante di competenza metabolica, la CYN indusse danno citogenetico (formazioni di micronuclei e perdita cromosomiale) solo a concentrazioni (1–6 µM) alle quali erano già evidenti inibizione della sintesi delle proteine e palese citotossicità (92). Risultati simili furono ottenuti anche nelle cellule CHOK1 mancanti di qualsiasi attività metabolica mediata dal P450 (83). L'attività mutagena di estratti di cianobatteri produttori di CYN nei test di Ames senza attivazione metabolica ha dato risultati positivi per 4 dei 10 campioni studiati, al contrario della tossina pura, probabilmente a causa della presenza di altri componenti presenti ma non identificati (54). Una possibile attività genotossica non secondaria agli effetti citotossici è stata suggerita dai risultati positivi del *comet assay* in epatociti di topo metabolicamente competenti, trattati con concentrazioni non tossiche di CYN (≤ 0,05 µM) (93): la positività del saggio fu annullata dal trattamento degli epatociti con inibitori del P450 (93), suggerendo che il potenziale genotossico sia associato alla bioattivazione P450-dipendente della CYN. È stata riportata anche la formazione degli addotti al DNA (94) e la frammentazione del DNA nel fegato (95) *in vivo*, ma poiché le dosi testate erano simili o poco più basse della LD_{50}, tali effetti possono essere molto probabilmente attribuiti ad una conseguenza della citotossicità; studi più recenti hanno tuttavia evidenziato la formazione di rotture singole del DNA nei linfociti periferici umani trattati con dosi non citotossiche (CYN 0, 0,05, 0,1 and 0,5 µg/mL) (53). Nella linea cellulare epatica HepG2 (che ha qualche residua attività metabolica), la CYN (a 0,25 and 0,5 µg/mL per 24h) causa rotture senza danni ossidativi al DNA, né induzione di apoptosi, suggerendo che le cellule con DNA danneggiato non siano rimosse efficientemente con possibile aumento di rischio di mutazioni (96). Prolungando l'esposizione a 72h venivano indotte rotture doppie al DNA, cambiamenti morfologici e ridotta vitalità cellulare dose- e tempo-dipendenti non dovuta a citotossicità, come evidenziato dal mancato aumento della LDH (97).

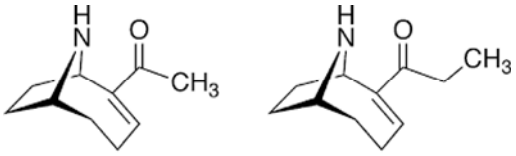
È disponibile un solo studio per evidenziare una possibile attività cancerogena indotta dalla CYN (98), estratti di *C. raciborskii* contenenti CYN (500 e 1500 µg/kg pc) sono stati somministrati per via orale nel topo (una dose ogni due settimane per 3 volte) seguita dalla somministrazione di 10 µg di O-tetradecanoyl-forbole 13-acetate (TPA), un promotore tumorale conosciuto, due volte a settimana per 30 settimane (98). I risultati suggeriscono una qualche attività cancerogena, sebbene l'inusuale disegno sperimentale (dosi molto alte e frequenza di somministrazione di un estratto invece della tossina, che come abbiamo visto può influire sull'attività genotossica), il numero limitato di animali usati e la mancanza sia di dose dipendenza che di significatività statistica, non permette al momento di trarre alcuna conclusione.

È stato ipotizzato che la CYN possa avere tossicità riproduttiva: la somministrazione ip di 50 µg/kg a topi femmine gravide nei giorni di gestazione (*Gestational Day*, GD) 13-17 riduce l'ampiezza della nidiata, il peso dei piccoli sopravvissuti, sanguinamento gastrointestinale e la ridotta crescita postnatale dei cuccioli maschi (99). Il periodo gestazionale della somministrazione sembra avere un peso, infatti la dose di 50 µg/kg assunta nel periodo GD 8-12 (periodo dell'organogenesi) dava una più alta tossicità materna (50% di mortalità circa contro lo 0% della somministrazione a GD 13-17) (100), sorprendentemente senza tossicità fetale (99). La somministrazione ip e la presenza di tossicità materna non permettono di trarre conclusioni sui risultati di questi due studi e d'altro canto uno studio più recente con esposizione orale di ratti a dosi 0,03, 0,3 e 3 µg/kg (valori simili o più alti della *Tolerable Daily Intake*; *vedi* paragrafo

A4.2) durante la gravidanza non diede alcun effetto nè sulla capacità riproduttiva degli adulti né effetti teratogeni sulla prole (101).

A2.2.3. Anatossina-a e omoanatossina-a

L'anatossina-a (ATX-a) è un alcaloide biciclico con similarità strutturali ma non farmacologiche con la cocaina; la presenza di un addizionale gruppo metilico la differenzia dalla omoanatossina-a (HATX-a) (Figura A2.3), ma le loro proprietà tossicologiche sono praticamente identiche.



a **b**

Figura A2.3. Struttura chimica della anatossina-a (a) e della omoanatossina-a (b)

La ATX-a è un potente agente depolarizzante pre- e post-sinaptico, che lega i recettori nicotinici per l'acetilcolina nel sistema nervoso centrale e periferico e nelle giunzioni neuromuscolari (6). La tossicità differisce tra gli stereoisomeri dell'ATX-a: l'enantiomero (+)ATX-a mostra una più elevata affinità per i recettori nicotinici rispetto l'acetilcolina e la nicotina, provocando una più potente azione contrattile e iper-stimolazione muscolare (102, 103). ATX-a può interagire anche con i recettori muscarinici ma il legame sembra meno selettivo (104).

La tossina ha un'elevata tossicità acuta, la LD_{50} ip nel topo è 250-375 µg/kg pc e la morte è dovuta alla paralisi muscolare e all'insufficienza respiratoria che sopraggiunge in breve tempo (2-6 min) (105,106), mentre dopo somministrazione orale la LD_{50} è > 5000 µg/kg pc e la morte avviene dopo un periodo di latenza (107). L'iniezione diretta iv mostra una tossicità più alta (iv LD_{50}<60 µg/kg pc) (103) e una morte praticamente istantanea (108). La tossicità acuta dell'HATX-a è simile (ip LD_{50} =330 µg/kg pc nel topo) con sovrapposizione dei sintomi e morte entro 5-10 minuti (109). Quando somministrata oralmente per gavaggio anche la HATX-a è 10 volte meno tossica (110). In vitro è stata dimostrata l'attività citotossica dell'ATX-a in cellule non neuronali e l'induzione della formazione di ROS nei timociti coltivati di ratto (53).

La ATX-a è rapidamente assorbita dopo ingestione e ampiamente distribuita a vari tessuti incluso il cervello, successivamente è facilmente degradata, perciò si può ipotizzare che abbia un basso potenziale di bioaccumulo.

Sono disponibili alcuni studi di tossicità ripetuta per via orale (periodi di trattamento <2 mesi) per ATX-a (103, 108): in tutti non è stato osservato alcun effetto anche alle dosi più alte testate (120 e 510 µg/kg pc al giorno in due studi diversi), perciò non si è potuto derivare un vero a proprio valore di NOAEL, anche se la dose più alta testata potrebbe essere considerata con un apporccio molto conservativo come un valore di riferimento. Sembra quindi che siano gli effetti acuti di maggior interesse per la salute umana.

Quando l'ATX-a è stata somministrata a roditori durante la gravidanza, nella finestra gestazionale rilevante per lo sviluppo neurologico, nessuna anormalità fetale e nè effetti ritardati neuro-comportamentali sono stati evidenziati nei piccoli dopo esposizione in utero, nè alcun

effetto di tossicità materna (103, 106, 111). Successivamente altri studi hanno descritto l'insorgere di alcuni effetti comportamentali durante lo sviluppo, come il calo dell'attività locomotoria dovuto all'azione depolarizzante (112). Dopo somministrazione ip alle madri a dosi (200 µg/kg) in grado di indurre tossicità materna (diminuzione dell'attività motoria) fu evidenziato il calo del peso dei feti (103,106,111).

Nei topi maschi trattati ip ATX-a (50, 100 e 150 µg/kg al giorno) per 7 giorni, la tossina causò danni testicolari istopatologici dose dipendente (113). La somministrazione ip non è rappresentativa dell'esposizione umana e non possono perciò essere tirate conclusioni certe relativamente alla possibilità che l'esposizione a basse dosi ripetute di ATX-a possa causare problemi all'apparato riproduttivo maschile.

Per quanto riguarda la genotossicità dell'ATX-a o del suo omologo, è disponibile uno studio che ha valutatola capacità mutagena della ATX-a pura nel test di Ames a diverse concentrazioni (0,312, 0,625, 1,25, 2,5, 5 and 10 µg/mL): i risultati sono stati negativi in tutte le condizioni sperimentali testate (anche in combinazione con MC e CYN (54).

A2.2.4. Anatossina-a(s)

L'anatossina-a(s) (ATX-a(s)) è l'estere fosforico dell' N-idrossiguanidina (Figura 4): come gli insetticidi organofosforici, con cui condivide la struttura chimica, inibisce irreversibilmente l'attività dell'acetilcolinesterasi (AChE) nelle giunzioni neuromuscolari (87), bloccando l'idrolisi del neurotrasmettitore acetilcolina, il cui accumulo porta ipereccitabilità nervosa. L'attività anti-colinesterasica dell'ATX-a(s) è limitata al sistema nervoso periferico, infatti l'attività dell'AChE celebrale rimane inalterata anche a dosi letali di neurotossina (114). La sua affinità per l'AChE eritrocitaria umana è relativamente alta e perciò il rischio di intossicazioni acute nella popolazione non è trascurabile, ed è più alto di quello stimabile per alcune specie acquatiche (115).

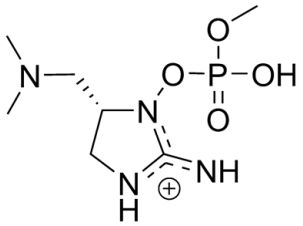


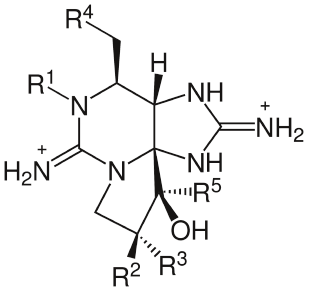
Figura A2.4. Struttura chimica della ATX-a(s)

La LD_{50} nel topo dopo iniezione ip è 20-40 µg/kg pc (tempo di sopravvivenza 5-30 minuti) (114,116,117). Sebbene abbia una struttura molto differente dall'ATX-a, ne condivide gli effetti indotti come causa del decesso (debolezza muscolare, dispnea e convulsioni prima dell'arresto respiratorio), seppure con un meccanismo diverso (118). Un sintomo tipico dell'ATX-a(s) è l'ipersalivazione visco-mucoide, infatti la "s" del suo nome sta per "salivazione".

Dati su somministrazione orale o sulla tossicità cronica e/o subcronica non sono al momento disponibili. L'ATX-a(s) dà risultati di mutagenicità negativi nel test di Ames con e senza attivazione metabolica testando fino a 2 µg, mentre in vitro fu osservato un aumento delle rotture cromosomali nei linfociti umani alla dose più elevate (0,8 µg/mL) (119).

A2.2.5. Saxitossina e analoghi

Le tossine PSP (*Paralytic Shellfish Poisoning*) sono una famiglia di più di 57 congeneri o analoghi (120). La molecola di base è formata da un gruppo tetra-idropurinico e due subunità di guanidina; sulla base dei sostituenti si dividono in 4 sottogruppi: i più importanti sono i carbamoil-derivati di cui fanno parte la saxitossina (STX) e la neo-saxitossina (NEO) che hanno struttura simile a quella dei carbammati (Figura A2.5).



R_1	R_2	R_3	R_4: —O—C(=O)—NH_2	—O—C(=O)—$NHSO_3^-$	—OH
H	H	H	STX	GTX5 (B1)	dcSTX
H	H	OSO_3^-	GTX2	C1	dcGTX2
H	OSO_3^-	H	GTX3	C2	dcGTX3
OH	H	H	NEO	GTX6 (B2)	dcNEO
OH	H	OSO_3^-	GTX1	C3	dcGTX1
OH	OSO_3^-	H	GTX4	C4	dcGTX4

STX: saxitossina
NEO: neo-saxitossina
GTX: gonyautossina

Figura A2.5. Struttura chimica delle principali tossine PSP

La maggior parte dei dati tossicologici riportati sono stati ottenuti con la STX prodotta da organismi marini, mentre sono limitate le informazioni disponibili per la STX prodotta dai cianobatteri d'acqua dolce. Comunque la struttura chimica e il profilo tossicologico delle tossine sono gli stessi, indipendentemente dalla sorgente. Le varie tossine PSP differiscono significativamente nella tossicità: la STX e la NEO sono le più potenti. Il meccanismo di azione è basato sul blocco dei canali del Na^+ nelle cellule neuronali con blocco della trasmissione nervosa e conseguente asfissia per paralisi dei muscoli respiratori (121, 122) e dei canali di K^+ e Ca^{2+} nelle cellule cardiache, che impedendo la propagazione del potenziale d'azione possono causare fatali aritmie cardiache (123, 124). Nel topo la LD_{50} ip per la STX è 10 µg/kg pc e la orale 263 µg/kg pc (125) e valori simili sono stati riportati anche nei ratti (126).

Non ci sono antidoti raccomandati e il trattamento nelle fasi iniziali dell'avvelenamento include l'eliminazione della tossina ancora non assorbita, usando carbone attivo e respirazione artificiale. L'emivita della STX nell'organismo è circa 90 minuti e le possibilità di sopravvivenza aumentano significativamente dopo 12 ore dall'esposizione iniziale (127). I mammiferi hanno di solito varie isoforme dei canali del Na^+ con differente sensibilità alla STX. Questa differenza è dovuta alla variazione nella sequenza di amminoacidi della sub-unità alfa del canale, perciò una singola mutazione può conferire l'insensibilità alla STX. Il gruppo guanidinico e gli ossidrili sul carbonio 12 come anche la catena laterale carbamoile sono coinvolti nel processo di legame al canale, cioè una molecola di STX legandosi si pone nel poro di conduzione ionica (127). La rimozione del gruppo carbamoile dà luogo a una molecola con circa il 60% della attività tossica originale. La tossicità degli analoghi della STX varia notevolmente: le tossine con struttura simile ai carbammati sono 10-100 volte più potenti degli N-sulfo-carbamoil derivati. Questi ultimi sono comunque labili e possono essere convertiti facilmente nei più tossici analoghi carbammici (127).

Il meccanismo biologico dell'azione è stato chiarito per il 50% degli analoghi naturali, suggerendo che potrebbe essere sostanzialmente uguale per tutte le tossine all'interno della

famiglia associata alle PSP, anche se la forma della curva dose/tempo di decesso dell'animale, alla base del *Mouse BioAssay* (MBA), non è simile per tutte le tossine (128).

Le tossine PSP possono bioaccumulare in crostacei e molluschi i quali sembrano essere resistenti agli effetti tossici (129), questo implica la possibilità di alti livelli di esposizione tra i predatori compreso l'uomo (130).

Recentemente è stato evidenziato *in vitro* con microsomi epatici umani l'ossidazione e la glucoronidazione della STX come pathway metabolico di detossificazione (131). È da sottolineare però che la biotrasformazione della STX in NEO via N-ossidazione potrebbe essere in realtà un processo di bioattivazione, perché il metabolita è tossico e recentemente è stata evidenziata la maggiore tossicità acuta della NEO per via orale (128). Sembra che tale reazione avvenga anche *in vivo* dopo l'ingestione: infatti la NEO è stata ritrovata nei tessuti e nelle urine di vittime di avvelenamenti che avevano ingerito campioni contaminati da STX ma non da NEO, risultata assente nel contenuto gastrico (132). Questo è quindi un aspetto da tener presente nella valutazione del rischio per l'uomo.

I composti N-sulfocarbamoile sono sensibilmente meno tossici delle corrispondenti tossine carbamoiliche. Comunque in condizioni acide, come nell'ambiente gastrico, il gruppo solfato ($SO3^-$) si perde, convertendo la tossina nell'analogo carbamoilico (133), con incremento di tossicità fino a 40 volte. Anche questa conversione può perciò avere rilevanti conseguenze sulla salute, poiché anche se il prodotto ittico dovesse contenere tossine N-sulfocarbamoiliche debolmente tossiche, queste ultime possono dar luogo a episodi di avvelenamento severo dopo ingestione e idrolisi acida nello stomaco. I numerosi casi di intossicazioni umane hanno permesso di studiare gli effetti acuti dovuti all'ingestione di STX direttamente sull'uomo, ricavandone informazioni importanti per la derivazione di valori di riferimento (134-136) (*vedi* capitolo A4).

Alcune evidenze di attività teratogena sono state ottenute nei pesci e nelle larve di anfibi nei quali le concentrazioni di STX $\geq$10 µg/L hanno causato ritardo nella crescita con malformazioni e mortalità a 500 µg/L (137,138). Sui mammiferi non sono disponibili dati.

Per valutare la contemporanea esposizione a più analoghi della STX, aventi differente tossicità, è stato proposto un modello per prevedere gli effetti neurotossici combinati di miscele binarie e ternarie di STX (126, 139). Il modello indica che la tossina più potente è la componente più rilevante, mentre gli analoghi meno tossici avrebbero bisogno di essere un ordine di grandezza più concentrati per contribuire significativamente alla potenza cumulativa tossica (126).

Come riportato nel report della *European Food Safety Authority* (EFSA) del 2009 sulle tossine marine (140) non ci sono dati sugli effetti cronici delle tossine del gruppo STX sia negli animali che nell'uomo, per cui il CONTAM Panel non ha potuto stabilire una TDI. Il fatto che il gruppo sia costituito da una serie di congeneri con potenziale di tossicità diversa ha indotto l'EFSA a calcolare i valori di *Toxicity Equivalence Factor* (TEF) per le varie tossine del gruppo delle STX, valutando così le potenze tossiche relative da utilizzate per la valutazione del rischio, dando più peso ai dati più recenti e a quelli dove si sono usati materiali di riferimento certificati. Sono stati valutati vari studi che utilizzavano il mouse bioassay (MBA) per calcolare le potenze relative della STX e i suoi analoghi e studi in vitro sul blocco dei canali del sodio in culture di cellule neuronali (141). Tali TEF sono riferiti alle singole tossine e non calcolabili per le possibili miscele. La maggior parte dei dati sono ottenuti con il MBA che usando l'iniezione ip come via di somministrazione non rappresentano la reale via di esposizione umana e lo stesso Panel EFSA conclude nel report che a supporto di questi TEF sono necessari ulteriori dati tossicologici ottenuti con somministrazione orale.

Molto recentemente alcuni autori (128) hanno evidenziato che il TEF calcolato sul MBA può essere diverso da quello calcolato usando altri parametri tossicologici come LD_{50} orale. In

questo studio sono riportati i dati di tossicità acuta di STX, NEO, e altri analoghi usando due vie di somministrazione orale (gavaggio e dieta) e dopo iniezione ip. La LD_{50} ip per la STX è 8,3 µg/kg pc mentre quella orale =356 µg/kg pc (gavaggio) e 958 µg/kg pc (dieta) con un NOAEL orale dopo gavaggio di 163 µg/kg pc. Per la NEO invece la LD_{50} ip è pari a 2,8 µg/kg pc mentre la orale era 221 e 397 µg/kg pc per gavaggio e dieta con un NOAEL di 87 µg/kg pc. I sintomi dell'intossicazione erano simili dopo somministrazione orale e ip con comparsa ritardata, dopo 20-40 min dal dosaggio, nel caso della somministrazione orale. L'assunzione con la dieta portava a una morte ritardata rispetto alla somministrazione per gavaggio come anche il recupero degli animali trattati con dosi sub letali. La curva dose risposta ip è molto ripida (LD_0 meno del 10 % inferiore alla LD_{50}) mentre la dose per gavaggio che non ha dato effetto era tra il 34 -55% della LD_{50} orale (128). Inoltre viene evidenziato che non c'è correlazione positiva tra la LD_{50} ip e i risultati del MAB per le tossine PSP testate proponendo di calcolare il TEF usando la LD_{50} orale. Ad esempio, la NEO avrebbe un TEF >1, essendo più tossico della STX che è usata come sostanza di riferimento, mentre usando il MBA sarebbe pari a 1, come riportato nel parere EFSA (128), con una conseguente possibile sottostima della sua tossicità.

A2.2.6. β-N-metilamino-L-alanina (BMAA)

È stato evidenziato che tutti i cianobatteri conosciuti possedendo i geni che codificano per gli enzimi coinvolti con la sua biosintesi (118) possono produrre a livelli significativi la BMAA un amminoacido non essenziale (142) (Figura A2.6). La BMAA è stata finora identificata in Inghilterra (143), Perù (144), Sud Africa (145), Cina (146) e Florida (147).

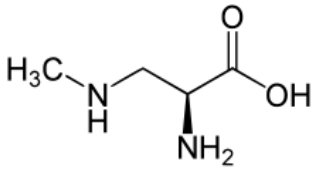


Figura A2.6. Struttura della BMAA

Sebbene con opinioni contrastanti, alla BMAA sono stati attribuiti effetti neurotossici (148,149). Agisce principalmente sui neuroni motori per fissazione sui recettori del glutammato, in aggiunta può causare anche errato ripiegamento (*misfolding)* della proteina intraneuronale caratteristica della neurodegenerazione (150). Studi successivi (149, 151, 152) hanno confermato effetti simili in vari neuroni importanti come quelli motori spinali, corticali ecc. Più recentemente comunque è stato ipotizzato che la BMAA potrebbe essere erroneamente incorporata come un amminoacido nelle proteine attraverso meccanismi traslazionali. Questa possibile incorporazione potrebbe rappresentare un meccanismo di azione alternativo, poiché la formazione di aggregati proteici mal ripiegati (*misfolded*) nella struttura terziaria è uno delle caratteristiche di diverse malattie neurodegenerative come la SLA, l'Alzheimer, il Parkinson e la demenza. La BMAA può essere associata a proteine endogene, dando luogo a concentrazioni elevate legate ai tessuti umani (*sink*), il successivo rilascio lento potrebbe spiegare la fase di latenza tra l'esposizione e la fine della malattia neurodegenerativa.

La correlazione tra BMAA e neuro-degenerazione sembra essere supportata da un numero crescente di studi che sottolineano l'apparente bioaccumulo del metabolita nella catena alimentare e l'evidenza sperimentale a sostegno degli effetti tossicologici sulla funzione

neuronale e della memoria (153-158). Infatti diversi studi sui ratti trattati in età neonatale (9-10 giorni) con dosi che andavano dai 50 ai 600 mg/kg pc hanno mostrato effetti transienti neuro-comportamentali con iperattività nei neonati e presenza di BMAA in alcune regioni celebrali come l'ippocampo e lo striato, così come disturbi cognitivi a lungo termine negli adulti anche alle dosi più basse, che non davano morte cellulare acuta o a lungo termine (153,158).

Il dibattito legato alla BMAA deriva dalla presenza di molti dati contrastanti. È stato dimostrato *in vitro* su 3 linee cellulari umane che la tossicità della BMAA è bassa con una ED_{50} di 1430-1604 μM che è comparabile a quella del supplemento nutrizionale beta-alanina, ed è 300-400 volte meno tossica dell'acido glutammico, il più abbondante amminoacido nell'organismo (159). Gli autori hanno evidenziato che tali risultati erano simili a quelli già ottenuti su linee cellulari non umane (149, 151). Altri autori d'altra parte hanno sottolineato che tali linee cellulari sono cellule immortalizzate altamente proliferative che differiscono significativamente nelle caratteristiche fisiologiche dai neuroni normali *in vivo* (160). La bassa citotossicità *in vitro* tuttavia sembra in accordo con gli studi *in vivo* in cui per avere degli effetti neurotossici nei primati dovevano essere somministrati 100-350 mg/kg pc/giorno di BMAA per molte settimane, dosi elevate che comunque nei topi non davano alcun effetto (161,162). Tali dosi sarebbero per un adulto di 50 kg pari all'assunzione giornaliera di 25 mg BMAA per diverse settimane e considerando il contenuto di BMAA nella farina di semi di cicas (circa 5 μg/g) ipotizzata come fonte principale di esposizione per l'uomo nell'isola di Guam, corrisponderebbe ad un consumo di 1 kg al giorno per raggiungere la dose di 100 mg/kg pc.
Comunque è interessante notare che, anche se da sola la BMAA è improbabile possa causare deficit neurologici a meno che non vengano usate dosi molto elevate, le concentrazioni a partire da 10-30 μM possono potenziare l'azione di altri agenti neurotossici (149), portando allo sviluppo di malattie neurologiche dopo esposizione cronica.

A2.3. Effetti dovuti ad esposizione per la via cutanea

Alla via di esposizione cutanea sono essenzialmente associati gli effetti topici su pelle e occhi, e le tossine maggiormente coinvolte sono le endotossine lipopolisaccaridiche (LPS). Tuttavia anche attraverso le altre vie potrebbero essere evidenziati effetti al sito di contatto, così come a seguito di assorbimento attraverso la cute (che però generalmente funziona da barriera e ha una permeabilità inferiore rispetto all'epitelio gastro-intestinale e a quello respiratorio) anche una esposizione cutanea potrebbe causare effetti sistemici.

Si conoscono anche altre tossine, come le aplasia- e lingbia-tossine responsabili di effetti topici, ma al momento la loro presenza è stata descritta solo in acque tropicali e subtropicali e quindi non sembrano essere rilevanti alle nostre latitudini.

A2.3.1. Endotossine LPS

Le endotossine LPS sono componenti esterni delle membrane cellulari della maggior parte dei cianobatteri come anche dei batteri gram-negativi. La molecola consiste di tre regioni: un glicolipide interno acilato (lipide A) e un'area centrale di liposaccaridi che lega la subunità interna con il polimero carboidrato specifico esterno (catena O-specifica) (163) (Figura A2.7). Tra i batteri questa sub-unità esterna mostra la principale diversità ed è la base della specificità sierologica ma anche il lipide A è variabile. Le endotossine LPS cianobatteriche differiscono poco da quelle tipiche degli altri batteri, anche se hanno la presenza di piccole quantità di fosfati (164, 165).

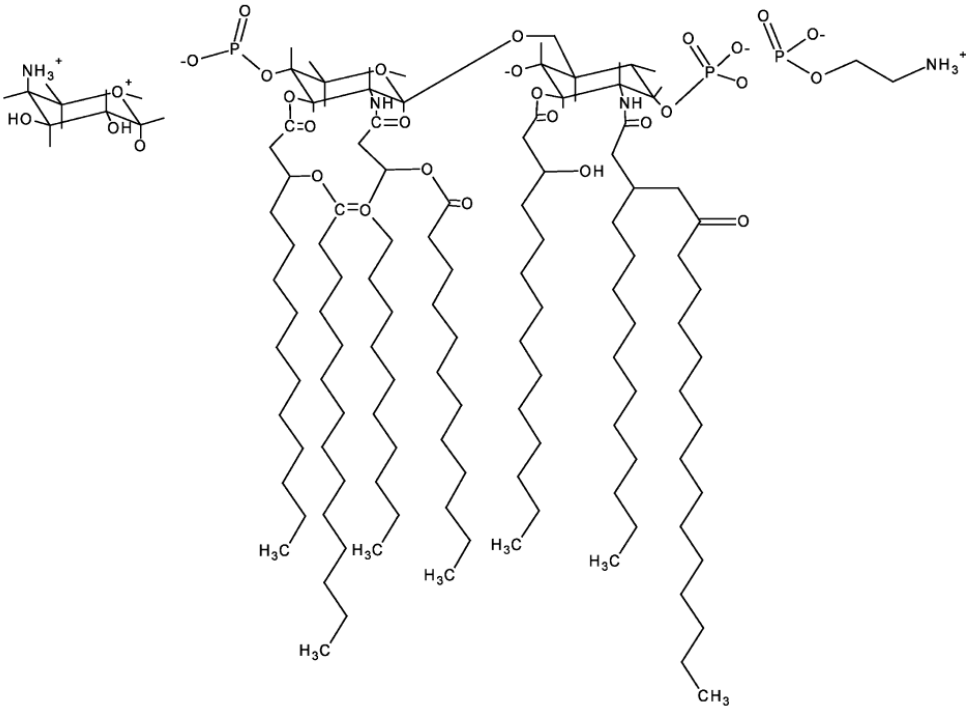


Figura A2.7. Struttura generica delle endotossine LPS

L'esposizione alle endotossine LPS è stata associata ad effetti locali dovuti a contatto diretto tra cui irritazione oculare e cutanea, problemi gastrointestinali o reazioni allergiche. Comunque questi tipi di effetti non sono stati mai riprodotti sperimentalmente e il loro meccanismo di azione è sconosciuto. Infatti la potenziale induzione di gastroenteriti e problemi infiammatori è stata spesso presunta in analogia con gli effetti dei LPS da batteri gram-negativi che sono estesamente studiati.

La tossicità delle endotossine LPS è associata all'interazione con fattori mediati dall'ospite. Le LPS si legano a recettori trans-membrana della famiglia *Toll-like* iniziando una cascata di risposte mediate dall'ospite, tra le quali il rilascio di citochine e altri mediatori dell'infiammazione, stimolazione di monociti e macrofagi e aggregazione di neutrofili e piastrine microcapillari con conseguente danno vascolare (166).

Alcuni dati indiretti hanno suggerito un ruolo delle LPS nelle intossicazioni cianobatteriche. Infatti risultati da test di massimizzazione hanno indicato che differenti estratti cianobatterici inducono alto grado di sensibilizzazione cutanea indipendente dalla produzione di tossina intracellulare (167). Più recentemente uno studio ha mostrato che le LPS cianobatteriche ottenute da *Microcystis* spp. stimolano nella microglia del cervello di ratto la produzione e il rilascio di mediatori neuro-infiammatori inclusi radicali superossido, citochine/chemochine, interleuchine, il fattore necrotico tumorale-α (*tumor necrosis factor-α,* TNF-α) e altre proteine collegate, ma tale attività è stata osservata solo a dosi considerevolmente alte: le LPS da *Microcystis* spp.sono risultate circa 1.000 volte meno potenti delle LPS di *Escherichia coli* (168). Gli effetti pro-infiammatori delle LPS da campioni di colture di laboratorio o di fioritura di *Microcystis* spp.sono stati usati su un modello *ex vivo* di sangue umano ed è stato visto anche in questo caso che rispetto alle LPS batteriche quelle da *Microcystis* spp. hanno una potenza pirogena almeno 12 volte più bassa (169).

Tra i differenti batteri gram-negativi la porzione lipide A è considerata la componente LPS responsabile degli effetti tossici i quali possono essere estremamente variabili, fino ad avere LPS completamente inattive (170). La struttura della sub-unità lipide A nella molecola LPS cianobatterica non è stata finora chiaramente identificata, ma probabilmente le differenze sopra descritte rispetto alle tossine batteriche potrebbe essere attribuita proprio a variazione della porzione del Lipide A. Comunque è utile ricordare che durante la fioritura cianobatterica molti altri composti organici (tra cui aldeidi, terpenoidi e chetoni), alcuni dei quali sono dotati di proprietà irritanti e sensibilizzanti, sono dissolti in acqua. Perciò è possibile che gli effetti irritanti e sensibilizzanti osservati finora erano dovuti alla concomitante presenza di differenti agenti eziologici.

Si sa molto poco sugli effetti sistemici delle endotossine LPS, alcuni dati sulla mortalità dei topi dopo iniezione di estratti di LPS da differenti cianobatteri indicano che la LD_{50} varia tra 40 e 190 mg/kg pc, sebbene alcuni estratti non abbiano causato morte a 250 mg/kg pc. In aggiunta sono state descritte lesioni dermo-necrotiche nella pelle dei conigli dopo la sequenziale iniezione sottocutanea e iv degli stessi estratti LPS (170).

Negli embrioni di zebrafish sono stati evidenziati effetti delle LPS estratte da *Microcystis* spp. su diversi *pathway* ed enzimi di detossificazione: sono state riportati riduzione delle glutatione-transferasi in tutti i trattamenti (250 µg/L), moderato aumento della glutatione perossidasi mentre la glutatione-reduttasi è rimasta invariata. I livelli totali di glutatione erano elevati negli embrioni trattati ma i livelli relativi di glutatione ridotto e ossidato non erano alterati, suggerendo che lo stress ossidativo non è coinvolto in questi effetti, come supportato dalla mancanza di effetti sulla superossido dismutasi e la catalasi. Tali effetti erano comparabili a quelli indotti dalle LPS di *E. coli* (171).

Un altro effetto biologico delle LPS cianobatteriche è il potenziamento della tossicità dei metalli pesanti (cadmio) almeno negli embrioni di zebrafish anche se apparentemente non dovuto a calo dell'attività delle glutatione transferasi (172).

A2.3.2. Altre cianotossine

Sospensioni acquose algali di fioriture sia di *Microcystis* spp.che di *Anabaena* spp.mostrano basso potenziale per l'irritazione cutanea e danno risultati contrastanti per l'irritazione oculare, mentre nei test di sensibilizzazione cutanea si hanno chiari risultati positivi. Comunque è probabile che siano presenti negli estratti algali altri componenti oltre le cianotossine intacellulari con possibile potenziale irritativo e sensibilizzante. Infatti, non è mai stata trovata correlazione tra il contenuto di tossine e l'effetto.

La MC-LR mostra debole capacità sensibilizzante anche quando è stata testata ad alte concentrazioni (1,5 mg/mL) (167). Inoltre i ceppi axenici sono risultati allergenici (167).

La capacità irritante della CYN è stata testata nei conigli con test intradermico per iniezione di 0,2 mL di estratto liofilizzato da *Aphanizomenon ovalisporum*. I risultati hanno mostrato una moderata risposta irritativa della pelle (167). Per valutare la sensibilizzazione cutanea è stato fatto il test di massimizzazione usando sia l'estratto liofilizzato di *C. raciborskii* contenente 0,015 mg CYN/g che l'estratto di ceppo non tossico di *A. ovalisporum*.ottenendo in entrambi i casi un chiaro risultato positivo (167). Conseguentemente l'alta azione sensibilizzante mostrata dagli estratti di cianobatteri non può essere associata con la presenza di CYN e potrebbe essere attribuita ad altri costituenti cellulari come le endotossine LPS.

A2.3.3. Tossine tropicali

Altre cianotossine sono state identificate, soprattutto nelle zone costiere marine delle Hawaii e dell'Indo-Pacifico, indicate genericamente come dermatotossine, tra le quali ci sono la aplysiatossina, la debromoaplysiatossina e la lyngbyatossina.

Queste tossine sono state indicate come gli agenti causanti dermatiti da contatto ('scabbia del nuotatore') nelle Hawaii (173), irritazione oculare e delle vie respiratorie (174) e di intossicazioni dovute ad ingestione di carne contaminata di una tartaruga marina, *Cheloniamidas* (175), che dipendono, come effetto primario, dalla tossicità locale al sito di contatto nella mucosa gastro-intestinale. Negli anni 1993-1998 in Madagascar il consumo di carne da tartarughe marine ha portato ad alcuni episodi di avvelenamento: di 414 persone intossicate 29 sono decedute. I sintomi descritti includevano gastriti acute, ulcere alla bocca, bruciore della mucosa boccale e della lingua con la comparsa di papule, salivazione, mal di testa, debolezza e febbre (176).

L'aplysiatossina è un bislattone fenolico (Figura A2.8), che iniettato ip nel topo ha un valore di LD_{50} di 100-120 µg/kg pc. Le cause della morte sono il sanguinamento dell'intestino tenue preceduto dalla dilatazione dei vasi linfatici e congestione dei capillari nella lamina propria (177,178). A dosi subletali il principale effetto è rappresentato da diarrea indotta da ipersecrezione per edema nell'intestino ceco (177).

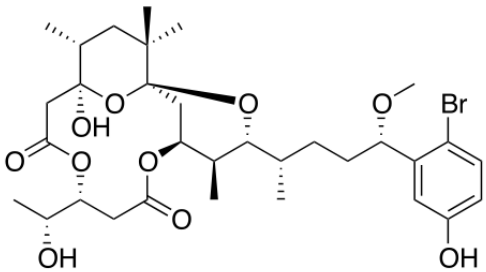


Figura A2.8. Struttura della aplysiatossina

Dopo somministrazione orale la tossicità è ridotta e gli effetti subletali dell'intestino tenue furono osservati a dosi molto più alte (3 mg/kg pc). Per iniezione iv (100 mg/kg) i vasi sanguigni bersaglio sono quelli nel polmone, la deposizione di fibrina nell'arteria polmonare dilatata causa la comparsa di una fessura nella parete dell'arteria con conseguente sanguinamento. Inoltre effetti di sanguinamento erano anche presenti nell'intestino tenue dovuto a deposizione di fibrina nel lumen per distensione della parete del capillare (178).

Anche la debromoaplysiatossina è un bislattone fenolico e differisce dall'aplysiatossina poiché non ha un atomo di Br legato all'anello fenolico. Entrambe causano severe irritazioni oculari e cutanee ma considerando la possibile esposizione inalatoria è stato suggerito che possano anche indurre differenziazione squamosa terminale nelle cellule epiteliali bronchiali umane (179).

La lyngbyatossina è un alcaloide indolico (Figura A2.9) ed ha molte similarità nel meccanismo di tossicità con l'aplysiatossina; infatti iniezioni ip di dosi letali nel topo (250 µg/kg pc) indussero danni gravi nei capillari dei villi portando a sanguinamento dell'intestino tenue.

Dosi subletali causarono erosione nello stomaco e nell'intestino tenue e crasso e infiammazione del polmone (LD_{50} orale 250 µg/kg pc) (180). Dopo somministrazione orale l'esito patologico a dosi subletali fu per lo più lo stesso ma gli effetti comparirono a dosi più alte (600-1.000 µg/kg pc). Sono state identificate tre sue isoforme: a, b, c, ma la b e la c hanno rispettivamente un'attività pari a 1/200 e 1/20 della isoforma a.

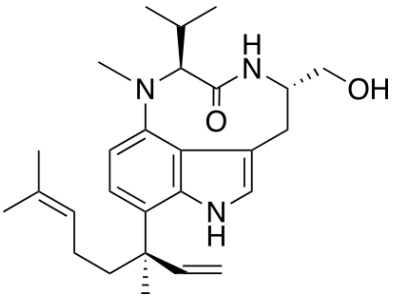


Figura A2.9. Struttura della lyngbyatossina a

Le lyngbyatossine sono debolmente lipofile, la penetrazione attraverso la pelle dopo un'ora di esposizione è pari a 26 µg/cm^2 quindi circa il 6% della dose è assorbita (179): è quindi possibile che possano verificarsi anche effetti sistemici, soprattutto durante attività di balneazione, in cui gran parte della superficie corporea è esposta, dando luogo a livelli circolanti tutt'altro che trascurabili.

Al momento non sono disponibili dati su la tossicità sistemica per dosi ripetute indotta da aplysiatossina o lyngbyatossina ma sono noti come potenti promotori tumorali, come anche la debromoaplysiatossina, agendo attraverso il potenziamento della proteina chinasi-C come fa il TPA anche se non con la stessa capacità (181-183).

A2.4. Effetti dovuti ad esposizione per la via inalatoria

Recentemente si sta considerando come non trascurabile anche l'esposizione inalatoria data la possibilità durante le attività ricreazionali in acqua di formazione di aerosol respirabili durante le fioriture e anche la presenza di cianobatteri nelle polveri desertiche (184-186).

I dati sugli animali per questa via espositiva sono limitati. Nel 1994 è stato condotto uno studio che riportava che la tossicità di MC per applicazione intratracheale risultava comparabile a quelli indotti dall'iniezione ip (107), anche se entrambe le vie sono poco rappresentative della reale esposizione inalatoria. I danni erano prodotti alle mucose del tratto respiratorio superiore (necrosi estesa della mucosa olfattiva e respiratoria nasale) che progrediva alla zone respiratorie più profonde fino agli alveoli. La LD_{50} era 250 µg/kg pc e veniva osservate lesioni dose-dipendenti al fegato. Inoltre la somministrazione di una dose subletale di MC-LR (31,3 µg/kg pc) per via intranasale aveva un effetto cumulativo per la tossicità acuta della ATX-a, abbassandone di 4 volte la LD_{50}. La somministrazione giornaliera ripetuta per 7 giorni di MC (31,3 µg/kg pc) produceva un effetto cumulativo con un incremento finale del peso del fegato del 75% (107), simile all'effetto prodotto da una singola dose di 500 µg/kg pc, somministrata per la stessa via (87% di aumento del peso del fegato).

In uno studio più recente è stata somministrata per via inalatoria a topi BALB/c maschi 260–265 µg/m^3 di MC per 7 giorni, evidenziando degenerazioni multifocali da minime a moderate, necrosi dell'epitelio respiratorio e atrofia di quello olfattivo (187). Il NOAEL per le lesione nasali è stato stimato di 3 µg/kg pc o 20 ng/cm^2 di epitelio nasale (187).

Recentemente è stato evidenziato anche un effetto sui polmoni da CYN somministrata a topi per via intratracheale (di nuovo poco rappresentativa della via reale di esposizione): una dose subletale (70 µg/kg pc) di CYN semi-purificata causa compromissione della meccanica polmonare preceduta da infiammazione del parenchima polmonare e stress ossidativo (188).

A causa del fatto che i frammenti della parete cellulare sono prontamente trasformati in aerosol, l'inalazione di LPS potrebbe contribuire a spiegare gli effetti negativi correlati ai cianobatteri noti come "sintomi simil-influenzali' (*flu-like symptoms*), caratterizzati da tosse, brividi, mal di gola e febbre. Comunque nessuna chiara associazione è stata trovata e perciò può essere concluso che le implicazioni sanitarie dei LPS cianobatterici sono scarsamente comprese e questo argomento richiederebbe ulteriori ricerche.

Bibliografia

1. Welker M, von Dohren H. Cyanobacterial peptides-Nature's own combinatorial biosynthesis. *FEMS Microbiol Rev* 2006;30:530-63.
2. Funari E, Testai E. Human health risk assessment related to cyanotoxins exposure. *Crit Rev Toxicol* 2008;38:97-125.
3. Vichi S, Lavorini P, Funari E, Scardala S, Testai E. Contamination by Microcystis and microcystins of blue-green algae food supplements (BGAS) on the Italian market and possible risk for the exposed population. *Food Chem Toxicol* 2012;50:4493-9.
4. Kaasalainen U, Fewer DP, Jokela J, Wahlsten M, Sivonen K, Rikkinen J. Cyanobacteria produce a high variety of hepatotoxic peptides in lichen symbiosis. *PNAS* 2012;109:5886-91.
5. Chen Y, Shen D, Fang D. Nodularins in poisoning. *Clin Chim Acta* 2013;425:18-29.
6. Carmichael WW. Toxins of fresh water cyanobacteria. In: Tu A (Ed.). *Handbook of natural toxins*. New York and Basel: Dekker, Inc.; 1988. Vol 3. p. 121-47.
7. Gehringer M.M. Microcystin-LR and okadaic acid-induced cellular effects: a dualistic response. *FEBS Letters* 2004;557:1-8.
8. Hoeger SJ, Schmid D, Blom JF, Ernst B, Dietrich DR. Analytical and functional characterization of microcystins [Asp3]MC-RR and [Asp3,Dhb7]MC-RR: consequences for risk assessment? *Environ Sci Technol* 2007;41: 2609-16.
9. Monks NR, Liu S, Xu J, Yu H, Bendelow AS, Moscow JA. Potent cytotoxicity of the phosphatase inhibitor microcystin LR and microcystin analogues in OATP1B1- and OATP1B3-expressing HeLa cells. *Mol Cancer Ther* 2007;6:587-98.
10. Fischer A, Hoeger SJ, Stemmer K, Feurstein DJ, Knobeloch D, Nussler A, Dietrich DR. The role of organic anion transporting polypeptides (OATPs/SLCOs) in the toxicity of different microcystin congeners in vitro: A comparison of primary human hepatocytes and OATP-transfected HEK293 cells. *Toxicol Appl Pharmacol* 2010;245:9-20.
11. Vesterkvist PSM, Misiorek JO, Spoof LEM, Toivola DM, Meriluoto JAO. Comparative Cellular Toxicity of Hydrophilic and Hydrophobic Microcystins on Caco-2 Cells. *Toxins* 2012;4:1008-23.
12. Gutierrez-Praena D, Jos A, Pichardo S, Moreno IM, Camean AM. Presence and bioaccumulation of microcystins and cylindrospermopsin in food and the effectiveness of some cooking techniques at decreasing their concentrations: A review. *Food Chem Toxicol* 2013;53:139-52.
13. Chen T, Cui J, Liang Y, Xin X, Young DO, Chen C, Shen PP. Identification of human liver mitochondrial aldehyde dehydrogenase as a potential target for microcystin-LR. *Toxicol* 2006;220:71-80.
14. Azevedo SM, Jochimsen EM, Rinehart KL, Lau S, Shaw GR., Eaglesham GK. Human intoxication by microcystins during renal dialysis treatment in Caruaru-Brazil. *Toxicology* 2002; 181:441-6.
15. Lowe J, Souza-Menezes J, Freire DS, Mattos LJ, Castiglione RC, Barbosa CM, Santiago L, Ferrão FM, Cardoso LH, da Silva RT, Vieira-Beiral HJ, Vieyra A, Morales MM, Azevedo SM, Soares

RM. Single sublethal dose of microcystin-LR is responsible for different alterations in biochemical, histological and physiological renal parameters. *Toxicon* 2012;9:601-9.

16. Feurstein D, Stemmer K, Kleinteich J, Speicher T, Dietrich DR. Microcystin congener- and concentration-dependent induction of murine neuron apoptosis and neurite degeneration. *Toxicol Sci* 2011;124:424-31.
17. Li GY, Cai F, Yan W, Li C, Wang J. A proteomic analysis of MCLR-induced neurotoxicity: implications for Alzheimer's disease. *Toxicol Sci* 2012;127:485-95.
18. Li GY, Yan W, Cai F, He Y, Chen N, Wang JH. Spatial learning impairment and pathological change in rats induced by acute exposure to microcystin-LR. *Environ Toxicol* 2012;22:1-8.
19. Metcalf JS, Codd GA. Cyanobacteria, neurotoxins and water resources: Are there implications for human neurodegenerative disease? *Amyotrofic Lateral Scler* 2009;10:74-8.
20. Stipa G, Taiuti R, de Scisciolo G, Arnetoli G, Tredici MR, Biondi N, Barsanti L, Lolli F. Sporadic amyotrophic lateral sclerosis as an infectious disease: a possible role of cyanobacteria? *Med Hypotheses* 2006;67:1363-71.
21. Meriluoto JAO, Nygard S, Dahlelm AM, Eriksson JE. Synthesis, organotropism and hepatocellular uptake of two tritium-labeled epimers of dihydro-microcystin-LR, a cyanobacterial peptide toxin analog. *Toxicon* 1990;29:1439-46.
22. Pflugmacher S, Wiegand C, Oberemm A, Beattie KA, Krause E, Codd GA, Steinberg CEW. Identification of an enzymatically formed glutathione conjugate of the cyanobacterial hepatotoxin microcystin-LR: the first step of detoxication. *Biochim Biophys Acta* 1998;1425:527-33.
23. Kondo F, Ikai J, Oka H, Masanao O, Ishikawa N, Harada K-I, Matsuura K, Murata H, Suzuki M. Formation, characterization and toxicity of the glutathione and cysteine conjugates of toxic heptapeptide microcystins. *Chem Res Toxicol* 1992;5:591-6.
24. Kondo F, Matsumoto H, Yamada S, Ishikawa N, Ito E, Nagata S, Ueno Y, Suzuki M, Harada K-I. Detection and identification of metabolites of microcystins in mouse and rat liver. *Chem Res Toxicol* 1996;9:1355-9.
25. Dittmann E, Wiegand C. Cyanobacterial toxins – occurrence, biosynthesis and impact on human affairs. *Mol Nutr Food Res* 2006;50:7-17.
26. Šetlíková I, Wiegand C. Hepatic and branchial glutathione S-transferases of two fish species: substrate specificity and biotransformation of microcystin-LR. *Comp Biochem Physiol, Part C* 2009;149:515-23.
27. Takenaka S. Covalent glutathione conjugation to cyanobacterial hepatotoxin microcystin LR by F344 rat cytosolic and microsomal glutathione S-transferases. *Environ Toxicol Pharmacol* 2001;9:135-9.
28. Pflugmacher S, Wiegand C, Beattie KA, Krause E, Steinberg CE, Codd GA. Uptake, effects, and metabolism of cyanobacterial toxins in the emergent reed plant Phragmites australis (cav.) trin. ex steud. *Environ Toxicol Chem* 2001;20:846-52.
29. Pflugmacher S, Wiegand C, Werner S, Schröder H, Kankaanpää H. Activity and substrate specificity of cytosolic and microsomal glutathione S-transferase in Australian black tiger prawns (Penaeus monodon) after exposure to cyanobacterial toxins. *Environ Toxicol* 2005;20:301-7.
30. He J, Chen J, Xie P, Zhang D, Li G, Wu L, Zhang W, Guo X, Li S. Quantitatively evaluating detoxification of the hepatotoxic microcystins through the glutathione and cysteine pathway in the cyanobacteria-eating bighead carp. *Aquat Toxicol* 2012;116-117:61-8.
31. Wu L, Xie P, Chen J, Zhang D, Liang G. Development and validation of a liquid chromatography–tandem mass spectrometry assay for the simultaneous quantitation of microcystin-RR and its metabolites in fish liver. *J Chromatog A* 2010;1217:1455-62.

32. Huang WM, Xing W, Li DH, Liu YD. The role of Glutathione metabolism in tolerance of tobacco BY-2 suspension cells to Microcystin-RR. *Bull Environ Contam Toxicol* 2008;80:215-9.
33. Buratti FM, Scardala S, Funari E, Testai E. Glutathione Transferases catalyzing the conjugation of the hepatoxin Microcystin-LR. *Chem Res Toxicol* 2011;24:926-33.
34. Buratti FM, Scardala S, Funari E, Testai E. The conjugation of microcystin-RR by human recombinant GSTs and hepatic cytosol. *Toxicol Lett* 2013;219:231-8.
35. Fawell JK, James CP, James HA. *Toxins from blue-green algae: toxicological assessment of microcystin-LR and a method for its determination in water.* Marlow, UK: Foundation of Water Research; 1994. (Report No. FR 0359/2/DoE 3358/2).
36. Fawell JK, Mitchell RE, Everett DJ, Hill RE. The toxicity of cyanobacterial toxins in the mouse: I Microcystin-LR. *Human Exp Toxicol* 1999;18:162-7.
37. Nishiwaki R, Ohta T, Sueoka E, Suganuma M, Harada K-I, Watanabe MF, Fujiki H. Two significant aspects of microcystin-LR: specific binding and liver specificity. *Cancer Lett* 1994;83:283-9.
38. Robinson NA, Miura GA, Matson CF, Dinterman RE, Pace JG. Characterization of chemically tritiated microcystin-LR and its distribution in mice. *Toxicon* 1989;27:1035-42.
39. Robinson NA, Pace JG, Matson CF, Miura GA, Lawrence WB. Tissue distribution, excretion and hepatic biotransformation of microcystin-LR in mice. *J Pharmacol Exp Ther* 1991;256:176-82.
40. Zurawell RW, Chen H, Burke JM, Prepas EE. Hepatotoxic cyanobacteria: a review of the biological importance of microcystins in freshwater environments. *J Toxicol Environ Health Part B* 2005;8:1-37.
41. Kotak BG, Kenefick SL, Fritz DL, Rousseaux CG, Prepas E, Hrudey SE. Occurrence and toxicological evaluation of cyanobacterial toxins in Alberta lakes and farm dugouts. *Water Res* 1993;27:495-506.
42. Wolf HU, Frank C. Toxicity assessment of cyanobacterial toxins mixtures. *Environ. Toxicol.* 2002;17:395-9.
43. Harada K, Ogawa K, Matsuura K, Murata H, Suzuki M, Watanabe MF, Itezono Y, Nakayama N. Structural determination of geometrical isomers of microcystins LR and RR from cyanobacteria by two-dimensional NMR spectroscopic techniques. *Chem Res Toxicol* 1990;3:473-81.
44. Harada K, Imanishi S, Kato H, Mizuno M, Ito E, Tsuji K. Isolation of ADDA from microcystin-LR by microbial degradation. *Toxicon* 2004;44:107-9.
45. Schaeffer DJ, Malpas PB, Barton LL. Risk assessment of microcystin in dietary Aphanizomenon flos-aquae. *Ecotoxicol Environ Safety* 1999;44:73-80.
46. Chernoff N, Hunter ES, Hall LL, Rosen MB, Brownie CF, Malarkey D, Marr M, Herkovits J. Lack of teratogenicity of microcystin-LR in the mouse and toad. *J Appl Toxicol* 2002;22:13-7.
47. Dvorakova D, Dvorakova K, Blaha L, Marsalek B, Knotkova Z. Effects of cyanobacterial biomass and purified microcystins on malformations in *Xenopus laevis*: teratogenesis assay (FETAX). *Environ Toxicol* 2002;17:547-55.
48. Buryskova B, Hilscherova H, Babica M, Vrskova D, Marsalek B, Blaha L. Toxicity of complex cyanobacterial samples and their fractions in *Xenopus laevis* embryos and the role of microcystins. *Aquat Toxicol* 2006;80:346-54.
49. Wang X, Ying F, Chen Y, Han X. Microcystin (-LR) affects hormones level of male mice by damaging hypothalamic-pituitary system. *Toxicon* 2012;59:205-14.
50. Chen Y, Xu J, Li Y, Han X. Decline of sperm quality and testicular function in male mice during chronic low-dose exposure to microcystin-LR. *Reprod Toxicol* 2011;31:551-7.

51. Wu J, Shao S, Zhou F, Wen S, Chen F, Han X. Reproductive toxicity on female mice induced by microcystin-LR. *Environ Toxicol Pharmacol* 2013.
52. Runnegar M.T.C., Falconer I.R. The *in vivo* and *in vitro* biological effects of the peptide hepatotoxin from the blue-green alga *Microcystis aeruginosa. S Afr J Sci* 1982;78:363-6.
53. Žegura B, Štraser A, Filipic M. Genotoxicity and potential carcinogenicity of cyanobacterial toxins. A review. *Mutat Res* 2011;727:16-41.
54. Sieroslawska A. Assessment of the mutagenic potential of cyanobacterial extracts and pure cyanotoxins. *Toxicon* 2013;74:76-82.
55. Ding WX, Shen HM, Zhu HG, Lee BL, Ong CN. Genotoxicity of microcystic cyanobacteria extract of a water source in China. *Mutat Res* 1999;442:69-77.
56. Rao PVL, Bhattacharya R, Parida MM, Jana AM, Bhaskar ASB. Freshwater cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* (UTEX 2385) induced DNA damage *in vivo* and in vitro. *Environ Toxicol Pharmacol* 1998;5:1-6.
57. Zhan L, Sakamoto H, Sakuraba M, Wu D-S, Zhang L-S, Suzuki T, Hayashi M, Honma M. Genotoxicity of microcystin-LR in human lymphablastoid TK6 cells. *Mut Res* 2004;557:1-6.
58. Ito E. Kondo F, Terao K, Harada K-I. Neoplastic nodular formation in mouse liver induced by repeated intraperitoneal injections of microcystin-LR. *Toxicon* 1997;35:1453-57.
59. Hirota F, Masami S. Tumor promoters - Microcystin-LR, Nodularin and TNF-α and human cancer development. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry* 2011;11:4-18.
60. Nishiwaki-Matsushima R, Ohta T, Nisshiwaki S. Liver tumor promotion by the cyanobacterial cyclic peptide toxin microcystin-LR. *J Cancer Res Clin Oncol* 1992;118:420-4.
61. Wangth HB, Zhuth HG. Promoting activity of microcystins extracted from waterblooms in SHE cell trasaformation assay. *Biomed Environ Sci* 1996;9:46-51.
62. Sekijima M, Tsutsumi T, Yoshida T, Harada T, Tashiro F, Chen G, Yu S, Ueno Y. Enhancement of glutathione S-transferase placental-form positive liver cell foci development by microcystin-LR in aflatoxin B1-initiated rats. *Carcinogenesis* 1999;20:161-5.
63. IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Ingested nitrate and nitrite, and cyanobacterial peptide toxins. *IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum* 2010;94:v-vii, 1-412.
64. Vesterkvist PS, Meriluoto JA. Interaction between microcystins of different hydrophobicities and lipid monolayers. *Toxicon* 2003;41:349-55.
65. Faassen EJ, Lürling M. Occurrence of the microcystins MC-LW and MC-LF in Dutch surface waters and their contribution to total microcystin toxicity. *Mar Drugs* 2013;11:2643-54.
66. Yoshigawa S, Matsushima R, Watanabe MF, Harada K-I, Ichihara A, Carmichael WW, Fujiki H. Inhibition of protein phosphatases by microcystis and nodularin associated with hepatotoxicity. *J Cancer Res Clin Oncol* 1990;116:609-14.
67. Ufelmann H, Krüger T, Luckas B, Schrenk D. Human and rat hepatocyte toxicity and protein phosphatase 1 and 2A inhibitory activity of naturally occurring desmethyl-microcystins and nodularins. *Toxicology* 2012;293:59-67.
68. 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 phosphatase 1 and 2A, is a new environmental carcinogen in male F344 rat liver. *Cancer Res* 1994;54:6402-6.
69. Falconer IR, Hardy SJ, Humpage AR, Froscio SM, Tozer GJ., Hawkins P.R. Hepatic and renal toxicity of the blue-green alga (cyanobacterium) *Cylindrospermopsis raciborskii* in male Swiss albino mice. *Environ Toxicol* 1999;14:143-50.

70. Ohtani I, Moore RE, Runnegar MTC. Cylindrospermopsin- a potent hepatotoxin from the blue-green alga *Cylindrospermopsis raciborskii. J Am Chem Soc* 1992;114:7941-7942.
71. 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). Environ Toxicol* 1999; 14: 235-142.
72. Terao K, Ohmori S, Igarashi K, Ohtani I, Watanabe MF, Harada K-I, Ito E, Watanabe M. Electron microscopic studies on experimental poisoning in mice induced by cylindrospermopsin isolated from blue-green alga *U. natans.Toxicon* 1994;32:833-43.
73. Chong MWK, Wong BSF, Lam PKS, Shaw GR, Seawright AA. Toxicity and uptake mechanism of cylindrospermopsin and lophyrotomin in primary rat hepatocytes. *Toxicon* 2002;40:201-11.
74. Norris R, Seawright AA, Shaw GR, Smith MJ, Chiswell RK, Moore MR. Distribution of ^{14}C-cylindrospermopsin *in vivo* in the mouse. *Environ Toxicol* 2001;16:498-505.
75. Norris RL, Seawright AA, Shaw GR, Senogles P, Eaglesham GK, Smith MJ, Chiswell RK, Moore MR. Hepatic xenobiotic metabolism of cylindrospermopsin *in vivo* in the mouse. *Toxicon* 2002;40:471-6.
76. Runnegar MT, Kong SM, Zhong YZ, Ge JL, Lu SC. The role of glutathione in the toxicity of a novel cyanobacterial alkaloid cylindrospermopsin in cultured rat hepatocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 1994;201:235-41.
77. Runnegar MT, Kong SM, Zhong YZ, Lu SC. Inhibition of reduced glutathione synthesis by cyanobacterial alkaloid cylindrospermopsin in cultured rat hepatocytes. *Biochem Pharmacol* 1995;49:219-25.
78. Chorus I, Bartram J (Ed.). *Toxic cyanobacteria in water: a guide to their public health consequences, monitoring and management*. London, New York: E&FN Spon; 1999. (Published on behalf of WHO).
79. Froscio SM, Humpage AR, Burcham PC, Falconer IR. Cell-free protein synthesis inhibition assay for the cyanobacterial toxin cylindrospermopsin. *Environ Toxicol* 2001;16:408-12.
80. Froscio SM, Humpage AR, Burcham PC, Falconer IR. Cylindrospermopsin-induced protein synthesis inhibition and its dissociation from acute toxicity in mouse hepatocytes. *Environ Toxicol* 2003;18:243-51.
81. Bazin E, Mourot A, Humpage AR, Fessard V. Genotoxicity of a freshwater cyanotoxin, cylindrospermopsin, in two human cell lines: Caco-2 and HepaRG. *Environ Mol Mutagen* 2010;51:251-9.
82. Bain P, Shaw G, Patel B. Induction of p53-regulated gene expression in human cell lines exposed to the cyanobacterial toxin cylindrospermopsin. *J Toxicol Environ Health A* 2007;70:1687-93.
83. Fessard V, Bernard C. Cell alterations but no DNA strand breaks induced *in vitro* by cylindrospermopsin in CHOK1 cells. *Environ Toxicol* 2003;18:353-9.
84. Froscio SM, Fanok S, Humpage AR. Cytotoxicity screening for the cyanobacterial toxin cylindrospermopsin. *J Toxicol Environ Health A* 2009;72:345-9.
85. Gutiérrez-Praena D, Pichardo S, Jos A, Moreno FJ, Cameán AM. Biochemical and pathological toxic effects induced by the cyanotoxin Cylindrospermopsin on the human cell line Caco-2. *Water Res* 2012;46:1566-75.
86. Neumann C, Bain P, Shaw G. Studies of the comparative in vitro toxicology of the cyanobacterial metabolite deoxycylindrospermopsin. *J Toxicol Environ Health A* 2007;70:1679-86.
87. Liebel S, Oliveira Ribeiro CA, Silva RC, Ramsdorf WA, Cestari MM, Magalhães VF, Garcia JR, Esquivel BM, Filipak Neto F. Cellular responses of *Prochilodus lineatus* hepatocytes after cylindrospermopsin exposure. *Toxicol In Vitro* 2011;25:1493-1500.

88. Lopez-Alonso H, Rubiolo JA, Vega F, Vieytes MR, Botana LM. Protein synthesis inhibition and oxidative stress induced by cylindrospermopsin elicit apoptosis in primary rat hepatocytes. *Chem Res Toxicol* 2013;26:203-12.
89. Humpage AR, Falconer IR. Oral toxicity of the cyanobacterial toxin cylindrospermopsin in male Swiss Albino mice: determination of No Observed Adverse Effect level for deriving a Drinking Water Guideline Value. *Environ Toxicol* 2003;18:94-103.
90. Dillenberg HO, Dehnel MK. Toxic waterbloom in Saskatchewan. *Can Med Assoc* 1960;83:1151-4.
91. Sukenik A, Reisner M, Carmeli S, Werman M. Oral toxicity of the cyanobacterial toxin cylindrospermopsin in mice: long-term exposure to low doses. *Environ Toxicol* 2006;21:575-82.
92. 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. *Mutat Res* 2000;472:155-61.
93. Humpage AR, Fontaine F, Froscio S, Burcham P, Falconer IR. Cylindrospermopsin genotoxicity and cytotoxicity: role of cytochrome P450 and oxidative stress. *J Toxicol Environ Health Part A* 2005;68:739-53.
94. Shaw G, Seawright AA, Moore RE, Lam PK. Cylindrospermopsin, a cyanobacterial alkaloid: evaluation of its toxicological activity. *Ther Drug Monit* 2000;22:89-92.
95. Shen XY, Lam PKS, Shaw GR, Wickramasinghe W. Genotoxicity investigation of a cyanobacterial toxin, cylindrospermopsin. *Toxicon* 2002;40:1499-501.
96. Štraser A, Filipic M, Gorenc I, Žegura B. The influence of cylindrospermopsin on oxidative DNA damage and apoptosis induction in HepG2 cells. *Chemosphere* 2013;92:24-30.
97. Štraser A, Filipic M, Novak M, Žegura B. Double strand breaks and cell-cycle arrest induced by the cyanobacterial toxin cylindrospermopsin in HepG2 cells. *Mar Drugs* 2013;11:3077-90.
98. Falconer IR, Humpage AR. Preliminary evidence for *in vivo* tumor initiation by oral administration of extracts of the blue-green alga *Cylindrospermopsis raciborskii* containing the toxin cylindrospermopsin. *Environ Toxicol* 2001;16:192-5.
99. 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;49:855-64.
100. Chernoff N, Rogers EH, Zehr RD, Gage MI, Malarkey DE, Bradfield CA, Liu Y, Schmid JE, Jaskot RH, Richards JH, Wood CR, Rosen MB. Toxicity and recovery in the pregnant mouse after gestational exposure to the cyanobacterial toxin, cylindrospermopsin. *J Appl Toxicol* 2011;31:242-54.
101. Sibaldo de Almeida C, Costa de Arruda AC, Caldas de Queiroz E, Matias de Lima Costa HT, Fernandes Barbosa P, Araújo Moura Lemos TM, Nunes Oliveira C, Pinto E, Schwarz A, Kujbida P. Oral exposure to cylindrospermopsin in pregnant rats: Reproduction and foetal toxicity studies. *Toxicon* 2013;74:127-9.
102. Swanson KL, Allen CN, Aronstam RS, Rapoport H, Albuquerque EX. Molecular mechanisms of the potent and stereospecific nicotinic receptor agonist (+)-anatoxin-a. *Mol Pharmacol* 1986;129:250-7.
103. Fawell JK, Mitchell RE, Hill R., Everett DJ. The toxicity of cyanobacterial toxins in the mouse: II Anatoxin-a. *Human Exp Toxicol* 1999;18:168-73.
104. Osswald J, Rellán S, Gago A, Vasconcelos V. Toxicology and detection methods of the alkaloid neurotoxin produced by cyanobacteria, anatoxin-a. *Environ Int* 2007;33:1070-89.

105. Fawell JK, James HA. *Toxins from blue-green algae: toxicological assessment of anatoxin-a and a method for its determination in reservoir water*. Marlow, UK: Foundation of Water Research; 1994. (Report No.FR0434/DoE 3728).

106. Rogers EH, Hunter ES, Moser VC, Phillips PM, Herkovits J, Muñoz L, Hall LL, Chernoff N. Potential developmental toxicity of anatoxin-a, a cyanobacterial toxin. *J Appl Toxicol* 2005;25:527-34.

107. Fitzgeorge RB, Clark SA, Keevil CW. Routes of intoxication. In: Codd GA, Jefferies TM, Keevil CW, Potter E (Ed.). *Detection methods for cyanobacterial toxins*. Cambridge: The Royal Society of Chemistry; 1994. p. 69-74.

108. Astrachan NB, Archer BG, Hilbelink DR. Evaluation of the sub-acute toxicity and teratogenicity of anatoxin-a. *Toxicon* 1980;18:684-8.

109. 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;42:533-8.

110. Lilleheil G, Andersen RA, Skulberg OM, Alexander J. Effects of a homoanatoxin-a-containing extract from *Oscillatoria formosa* (Cyanophyceae/Cyanobacteria) on neuromuscular transmission. *Toxicon* 1997;35:1275-89.

111. MacPhail RC, Farmer JD, Jarema KA, Chernoff N. Nicotine effects on the activity of mice exposed prenatally to the nicotinic agonist anatoxin-a. *Neurotoxicol Teratol* 2008;27:593-8.

112. Jarema KA, Poling A, MacPhail RC. Effects of weekly exposure to anatoxin-a and nicotine on operant performance of rats. *Neurotoxicol Teratol* 2008;30:220-7.

113. Yavasoglu A, Karaaslan MA, Uyanikgil Y, Sayim F, Yavasoglu UK. Toxic effects of anatoxin-a on testes and sperm counts of male mice. *Exp Toxicol Pathol* 2008;60:391-6.

114. Cook WO, Beasley VR, Dahlelm AM, Dellinger JA, Harlin KS, Carmichael WW. Comparison of effects of anatoxin-a(s) and paraoxon, physostigmine and pyridostigmine on mouse brain cholinesterase activity. *Toxicon* 1988;26:750-3.

115. Carmichael WW, Mahmood NA, Hyde EG. Natural toxins from cyanobacteria (bue-green algae). In: Hall S, Strichartz G (Ed.). *Marine Toxins: origins, structure and molecular pharmacology*. Washington, DC: American Chemical Society; 1990. p. 87-106.

116. Mahmood WA, Carmichael WW. Anatoxin-a(s), an anticholinesterase from the cyanobacterium *Anabaena flos-aquae* NRC-525-17. *Toxicon* 1987;25:1211-27.

117. Matsunaga S, Moore RE, Niemczura WP, Carmichael WW. Anatoxin-a(s), a potent anticholinesterase from *Anabaena flos-aquae. J Am Chem Soc* 1989;111:8021-3.

118. Aráoz R, Molgó J, Tandeau de Marsac N. Neurotoxic cyanobacterial toxins. *Toxicon* 2010;56:813-28.

119. Repavich WM, Sonzogni WC, Standridge JH, Wedepohl RE, Meisner LF. Cyanobacteria (blue-green algae) in Wisconsin waters: Acute and chronic toxicity. *Water Res* 1990;24:225-31.

120. Wiese M, D'Agostino PM, Mihali TK, Moffitt MC, Neilan BA. Neurotoxic alkaloids: saxitoxin and its analogs. *Mar Drugs* 2010;8:2185-211.

121. Kao CY. Paralytic shellfish poisoning. In: Falconer IR (Ed.) *Algal Toxins in seafood and drinking water*. San Diego, CA: Academic Press Inc; 2008. p. 75-86.

122. Rossini GP, Hess P. Phycotoxins: chemistry, mechanisms of action and shellfish poisoning. In: Luch A (Ed.). *Molecular, clinical and environmental toxicology*. Basel: Birkhäuser; 2010. p. 65-122.

123. Su Z, Sheets M, Ishida H, Barry WH. Saxitoxin blocks L-type ICa. *J Pharmacol Exp Ther* 2004;308:324-9.

124. Wang J, Salata JJ, Bennett PB. Saxitoxin is a gating modifier of HERG K^+ channels. *J Gen Physiol* 2003;121:583-98.

125. Mons MN, Van Egmond HP., Speijers G.J.A. Paralytic shellfish poisoning: A review. *RIVM* 1998;Report 388802 005.

126. Llewellyn LE. The behaviour of mixture of paralytic shellfish toxins in competitive binding assay. *Chem Res Toxicol* 2006;19:661-7.

127. Pearson L, Mihali T, Moffitt M, Kellmann M, Neilan B. On the Chemistry, toxicology and genetics of the cyanobacterial toxins, microcystin, nodularin, saxitoxin and cylindrospermopsin. *Mar Drugs* 2010;8:1650-80.

128. Munday R, Thomas K, Gibbs R, Murphy C, Quilliam MA. Acute toxicities of saxitoxin, neosaxitoxin, decarbamoyl saxitoxin and gonyautoxins 1&4 and 2&3 to mice by various routes of administration. *Toxicon* 2013;76:77-83.

129. Llewellyn LE, Bell PM, Moczydlowski EG. Phylogenetic survey of soluble saxitoxin-binding activity in pursuit of the function and molecular evolution of saxiphilin, a relative of transferrin. *Proc Biol Sci* 1997;264:891-902.

130. Negri AP, Jones GJ. Bioaccumulation of paralytic shellfish poisoning (PSP) toxins from the cyanobacterium *Anabaena circinalis* by the freshwater mussel *Alathyria condola*. *Toxicon* 1995;33:667-78.

131. Garcia C, Barriga A, Diaz JC, Lagos M, Lagos N. Route of metabolization and detoxication of paralytic shellfish toxins in humans. *Toxicon* 2010;55:135-44.

132. Garcia C, del Carmen Bravo M, Lagos M, Lagos N. Paralytic shellfish poisoning: post-mortem analysis of tissue and body fluid samples from human victims in the Patagonia fjords. *Toxicon* 2004;43:149-58.

133. Aune T. Risk assessment of toxins associated with DSP, PSP and ASP in seafood. In: De Koe WJ, Samson RA, Van Egmond P, Gilbert J, Sabino M (Ed.). *Mycotoxins and phycotoxins in perspective at the turn of the millennium*. Wageningen, Netherlands: Ponsen & Looyen; 2001. p. 515-26.

134. FAO. *Marine biotoxins*. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations; 2004. (FAO Food And Nutrition Paper 80). Disponibile all'indirizzo: http://Www.Fao.Org/Docrep/007/Y5486e/Y5486e00.HTM; ultima consultazione 6/11/14.

135. Shumway SE. Phycotoxin-related shellfish poisoning: bivalve mollusc are not the only vectors. *Fish Sci* 1995;3:1-31.

136. Orr PT, Jones GJ, Hamilton GR. Removal of saxitoxins from drinking water by granular activated carbon, ozone and hydrogen peroxide-implications for compliance with Australian drinking water guidelines. *Water Res* 2004;38:4455-61.

137. International Programme on Chemical Safety. Aquatic marine and freshwater biotoxins. In: World Health Organization (Ed). *Environmental health criteria*. Geneva: WHO; 1984. Vol 37. Disponibile all'indirizzo: http://www.who.int/ipcs/publications/ehc/ehc_numerical/en/; ultima consultazione 15/12/14.

138. Oberemm A, Becker J, Codd GA, Steinberg C. Effects of cyanobacterial toxins and aqueous crude extracts of cyanobacteria on the development of fish and amphibians.*Environ Toxicol Water Qual* 1999;14:107-15.

139. Llewellyn LE. Predicitive toxinology: An initial foray using calculated molecular descriptors to decribe toxicity using saxitoxin as a model. *Toxicon* 2007;50:901-7.

140. EFSA Panel on Contaminants in the food chain. Marine biotoxins in shellfish - Saxitoxin group. *EFSA Journal* 2009;1019:1-76.

141. Vale C, Alfonso A, Vieytes MR, Romarís XM, Arévalo F, Botana AM, Botana LM. *In vitro* and *in vivo* evaluation of paralytic shellfish poisoning toxin potency and the influence of the pH of extraction. *Anal Chem* 2008;80:1170-6.

142. Cox PA, Banack SA, Murch SJ, Rasmussen U, Tien G, Bidigare RR, Metcalf JS, Morrison LF, Codd GA, Bergman B. Diverse taxa of cyanobacteria produce beta-N-methylamino-L-alanine, a neurotoxic amino acid. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005;102:5074-8.

143. Metcalf JS, Banack SA, Lindsay J, Morrison LF, Cox PA, Codd GA. Co-occurrence of beta-*N*-methylamino-L-alanine, a neurotoxic amino acid with other cyanobacterial toxins in British waterbodies, 1990-2004. *Environ Microbiol* 2008;10:702-8.

144. Johnson HE, King SR, Banack SA, Webster C, Callanaupa WJ, Cox PA. Cyanobacteria (Nostoc commune) used as a dietary item in the Peruvian highlands produce the neurotoxic amino acid BMAA. *J Ethnopharmacol* 2008;118:159-65.

145. Esterhuizen M, Downing TG. Beta-N-methylamino-L-alanine (BMAA) in novel South African cyanobacterial isolates. *Ecotoxicol Environ Safety* 2014;71:309-16.

146. Li A, Tian Z, Li J, Yu R, Banack SA, Wang Z. Detection of the neurotoxin BMAA within cyanobacteria isolated from freshwater in China. *Toxicon* 2010;55:947-53.

147. Brand LE, Pablo J, Compton A, Hammerschlag N, Mash DC. Cyanobacterial blooms and the occurrence of the neurotoxin beta-N-methylamino-l-alanine (BMAA) in South Florida aquatic food Webs. *Harm Algae* 2010;9:620-35.

148. Miller G. Guam's deadly stalker: on the loose worldwide. *Science* 2006;313:428-31.

149. Lobner D, Piana PMT, Salous AK, Peoples RW. β-N-methylamino-L-alanine enhances neurotoxicity through multiple mechanisms. *Neurobiol Desease* 2007;25:360-6.

150. Banack SA, Caller TA, Stommel EW. The cyanobacteria derived toxin Beta-N-Methylamino-L-Alanine and Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Toxins* 2010;2:2837-50.

151. Rao SD, Banack SA, Cox PA, Weiss JH. BMAA selectively injures motor neurons via AMPA/kainate receptor activation. *Exp Neurol* 2006;201:244-52.

152. Cucchiaroni ML, Viscomi MT, Bernardi G, Molinari M, Guatteo E, Mercuri NB. Metabotropic glutamate receptor 1 mediates the electrophysiological and toxic actions of the cycad derivative beta-*N*-Methylamino-L-alanine on substantia nigra pars compacta DAergic neurons. *J Neurosci* 2010;30:5176-88.

153. Karlsson O, Roman E, Brittebo EB. Long-term cognitive impairments in adult rats treated neonatally with beta-*N*-Methylamino-L-Alanine. *Toxicol Sci* 2009;112:185-95.

154. Karlsson O, Lindquist NG, Brittebo EB, Roman E. Selective brain uptake and behavioral effects of the cyanobacterial toxin BMAA (b-N-Methylamino-L-alanine) following neonatal administration to rodents. *Toxicol Sci* 2009;109:286-95.

155. Liu X, Rush T, Zapata J, Lobner D. (beta)-*N*-methylamino-L-alanine induces oxidative stress and glutamate release through action on system Xc. *Exp Neurol* 2009;217:429-33.

156. Purdie EL, Metcalf JS, Kashmiri S, Codd GA. Toxicity of the cyanobacterial neurotoxin beta-N-methylamino-L-alanine to three aquatic animal species. *Amyotroph Lateral Scler* 2009;10:67-70.

157. Karlsson O, Roman E, Berg A-L, Brittebo EB. Early hippocampal cell death, and late learning and memory deficits in rats exposed to the environmental toxin BMAA ([beta]-*N*-methylamino-L-alanine) during the neonatal period. *Behav Brain Res* 2011;219:310-20.

158. Karlsson O, Berg A-L, Lindström A-K, Hanrieder J, Arnerup G, Roman E, Bergquist J, Lindquist NG, Brittebo EB, Andersson M. Neonatal exposure to the cyanobacterial toxin BMAA induces

changes in protein expression and neurodegeneration in adult hippocampus. *Toxicol Sci* 2012;130:391-404.

159. Lee M, McGeer PL. Weak BMAA toxicity compares with that of the dietary supplement beta-alanine. *Neurobiol Aging* 2012;33:1440-7.
160. Chiu AS, Gehringer MM, Welch JH, Neilan BA. Does β-Amino-N-methylaminopropionic Acid (BMAA) play a role in neurodegeneration? *Int J Environ Res Public Health* 2011;8:3728-46.
161. Perry TL, Bergeron C, Biro AJ, Hansen S. Beta-*N*-methylamino-L-alanine. Chronic oral administration is not neurotoxic to mice. *J Neurol Sci* 1989;94:173-80.
162. Cruz-Aguado R, Winkler D, Shaw CA. Lack of behavioral and neuropathological effects of dietary beta-methylamino-alanine (BMAA) in mice. *Pharmacol Biochem Behav* 2006;84:294-9.
163. Jann K and Jann B. Structure and biosynthesis of O-antigens. In: Rietschel ET (Ed.) Handbook of endotoxin Amsterdam, Elsevier;1984. p. 138-86.
164. Mayer H, Wecksser J. 'Unusual' lipid A's: structures, taxonomical relevance and potential value for endotoxin research. In: Rietschel ET (Ed.) *Chemistry of endotoxin*. Amsterdam: Elsevier; 1984. p. 221-47.
165. Kaya K. Toxic microcystis. In: Watanabe M, Harada K.-I, Carmichael WW, Fujiki H (Ed.). *Toxicology of microcystins*. Boca Raton, UK: CRC Press; 1996. p. 175-202.
166. Heumann D, Glauser MP, Calandra T. The generation of inflammatory responses. In: Sussman M (Ed.). *Molecular medical microbiology.* London: Academic Press; 2002. p. 687-727.
167. Torokne A, Palovics A, Banckine M. Allergenic (sensitization, skin and eye irritation) effects of freshwater cyanobacteria – experimenatl evidence. *Environ Toxicol* 2001;32:512-16.
168. Mayer AMS, Clifford JA, Aldulescu M, Frenkel JA, Holland MA, Hall ML, Glaser KB, Berry J. Cyanobacterial *Microcystis aeruginosa* lipopolysaccharide elicits release of superoxide anion, thromboxane B2, cytokines, chemokines and matrix metalloproteinase-9 by rat microglia. *Toxicol Sci* 2011;121:63-72.
169. Bláhová L, Adamovský O, Kubala L, Svihálková Sindlerová L, Zounková R, Bláha L. The isolation and characterization of lipopolysaccharides from *Microcystis aeruginosa*, a prominent toxic water bloom forming cyanobacteria. *Toxicon* 2013;76:187-96.
170. Stewart I, Webb PM, Schluter PJ, Shaw GR. Cyanobacterial lipopolysaccharides and human health – a review. *Environ Health Glob Acc Sci Source* 2006;5:7.
171. Jaja-Chimedza A, Gantar M, Mayer GD, Gibbs PD, Berry JP. Effects of cyanobacterial lipopolysaccharides from microcystis on glutathione-based detoxification pathways in the zebrafish (*Danio rerio*) embryo. *Toxins* 2012;4:390-404.
172. Notch EG, Miniutti DM, Mayer GD. Cyanobacterial LPS potentiates cadmium toxicity in zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Environ Toxicol* 2011;26:498-505.
173. Serdula M, Bartolini G, Moore RE, Gooch J, Wiebenga N. Seaweed itch on windward Oahu. *Hawaii Med J* 1982;41:200-1.
174. Osborne NJT, Webb PM, Shaw GR. The toxins of *Lyngbya majuscula* and their human and ecological health effects. *Environ Int* 2001;27:381-92.
175. Yasumoto T. Fish poisoning due to toxin of microalgal origins in the Pacific. *Toxicon* 1998;36:1515-8.
176. Champetier RG, Ranaivonson G, Ravaonindrina N, Rakotonjanabelo AL, Rasolofonirina N, Roux JF, Yasumoto T. Un problème de santè publique réémergent à Madagascar: les intoxications collectives per consummation d'animaux marins. Aspect èpidemiologiques, cliniques et toxicologiques des episodes notifies de Janvier a Janvier 1998. *Arch Inst Pasteur* 1998;64:71-6.

177. Ito E, Nagai H. Morphological observations of diarrhea in mice caused by aplysiatoxin the causative agent of the red alga *Gracilaria coronopifolia* poisoning in Hawaii. *Toxicon* 1998;36:1913-20.

178. Ito E, Nagai H. Bleeding from the small intestine caused by aplysiatoxin, the causative agent of the red alga *Gracilaria coronopifolia* poisoning. *Toxicon* 2000;38:123-32.

179. Rzymski P, Poniedziatek B. Dermatotoxins synthesized by blue-green algae (*Cyanobacteria*). *Post Dermatol Alergol* 2012;1:47-50.

180. Ito E, Satake M, Yasumoto T. Pathological effects of lyngbyatoxin A upon mice. *Toxicon* 2002;40:551-6.

181. Fujiki H, Mori M, Nakayasu M, Terada M, Sagimura R, Moore RE. Indole alkaloids: dihydroteleocidin B. teleocidin and lyngbyatoxin A as members of a new class of tumor promoters. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981;78:3872-6.

182. Fujiki H. Saganuma M, Nakayasu M, Hoshino H, Moore RE, Sagimura T. The third class of new tumor promoters, polyacetates (debromoaplysiatoxin and aplysiatoxin), can differentiate biological actions relevant to tumor promoters. *Gann* 1982;73:497-9.

183. Fujiki H, Sugimura T, Moore RE. New classes of environmental tumor promoters: indole alkaloids and polyacetates. *Environ Health Perspect* 1983;50:85-90.

184. Backer LC, McNeel SV, Barber T, Kirkpatrick B, Williams C, Irvin M, Zhou Y, Jhonson TB, Nierenberg K, Aubel M, LePrell L, Chapman A, Foss A, Corum S, Hill VR, Kieszak SM, Cheng Y-S. Recreational exposure to microcystins during algal blooms in two California lakes. *Toxicon* 2010;55:909-21.

185. Wood SA, Dietrich DR. Quantitative assessment of aerosolized cyanobacterial toxins at two New Zealand lakes. *J Environ Monit* 2011;13:1617-24.

186. Metcalf JS, Richer R, Cox PA, Codd GA. Cyanotoxins in desert environments may present a risk to human health. *Sci Total Environ* 2012;421-422:118-23.

187. Benson JM, Hutt JA, Rein K, Boggs SE, Barr EB, Fleming LE. The toxicity of microcystin LR in mice following 7 days of inhalation exposure. *Toxicon* 2005;45:691-8.

188. Oliveira VR, Carvalho GMC, Avila MB, Soares RM, Avezedo SMFO, Ferreira TS, Valença SS, Faffe DS, Araujo Zin W. Time-dependence of lung injury in mice acutely exposed to cylindrospermopsin. *Toxicon* 2012;60:764-72.

A3. EFFETTI SULL'UOMO ASSOCIATI AD ESPOSIZIONE A CIANOBATTERI E CIANOTOSSINE

Emanuela Testai*, Franca M. Buratti
Dipartimento di Ambiente e Connessa Prevenzione Primaria, Istituto Superiore di Sanità, Roma
**emanuela.testai@iss.it*

A3.1. Introduzione

L'uomo può essere esposto alle cianotossine attraverso diverse vie, caratteristiche per ciascuno scenario di esposizione (1). Escludendo l'esposizione per via parenterale, possibile a seguito dell'uso per l'emodialisi di acqua superficiale proveniente da corpi idrici contaminati da cianobatteri e non opportunamente purificata (2-4), l'uso ricreativo delle acque comporta l'esposizione, anche contemporanea, attraverso le altre tre principali vie: orale, cutanea e inalatoria. Ovviamente l'esposizione può avvenire anche attraverso usi diversi dell'acqua e di altri prodotti contaminati. Infatti l'esposizione orale può derivare dal consumo di acqua e cibo contaminati, dall'uso di integratori alimentari a base di liofili o estratti cianobatterici. Inoltre l'ingestione accidentale o involontaria di acqua può avvenire durante le attività balneari e ricreative,per esempio. nuotando, cadendo inaspettatamente da imbarcazioni o durante la pratica di sport acquatici e nel caso di bambini, giocando sul bagnasciuga e/o mettendo in bocca le mani dopo avere avuto contatto con l'acqua. D'altro canto nello svolgimento delle suddette attività ricreative, sportive o anche professionali (es. per pescatori e bagnini), l'esposizione cutanea per contatto diretto e quella per via inalatoria sono sicuramente rilevanti. La via inalatoria può essere considerata rilevante non solo per chi svolge attività in acqua ma anche per chi staziona sulla spiaggia o nelle zone prospicienti alla zona interessata dalla fioritura, inclusi i mesi più freddi, non compresi nella stagione balneare vera e propria. D'altra parte la possibilità di inalazione dopo formazione di materiale derivato da schiume seccatesi sulla riva fa pensare a possibili implicazioni per la salute, in analogia a quanto osservato a seguito del ritrovamento di Microcistine (MC) nelle croste desertiche (5).

Ovviamente lo scenario e la via espositiva influenzano la potenzialità di indurre effetti locali al punto di contatto (es. pelle, occhi, epitelio gastro-intestinale e delle vie respiratorie) e la biodisponibilità che determina la dose interna di cianotossina dalla quale dipendono gli effetti tossici sistemici.

Di seguito verranno sinteticamente presentate le varie segnalazioni riportate in letteratura e gli studi epidemiologici che hanno evidenziato effetti sulla salute dell'uomo a seguito di esposizione a cianobatteri e/o cianotossine a seguito di i) attività ricreative e balneari, ii) emodialisi, iii) consumo di acqua potabile e cibo contaminati.

A3.2. Attività balneari e ricreative

Considerando la stagionalità della fioritura delle diverse specie di cianobatteri da un lato e il periodo limitato nel quale è praticata la balneazione nelle zone a clima temperato come il nostro Paese, gli scenari espositivi legati alle attività ricreative in corpo idrici risultano più associabili ad un rischio a breve termine (sub-cronico) piuttosto che ad una esposizione giornaliera molto

prolungata nel tempo (rischio cronico). Lo svolgimento di attività ricreative in acque infestate da elevate densità di cianobatteri tossici (fioriture o schiume) potrebbe dar luogo ad effetti acuti. In effetti, sono stati descritti tre casi: un solo caso di decesso, negli USA ed effetti acuti risoltisi dopo le opportune cure mediche dopo alcuni giorni. Il decesso, attribuito a posteriori da un *coroner*, è stato associato all'esposizione di un adolescente ad anatossina-a (ATX-a), a seguito di caduta accidentale in uno stagno di un campo da golf (e conseguentemente ad ingestione involontaria). La tossina fu infatti ritrovata *post-mortem* nel sangue e nelle feci del ragazzo. Ci sono comunque alcune incertezze su tale associazione per la latenza tra esposizione e morte (48 h) che non concorda con il tempo di letalità che si osserva negli studi sperimentali sugli animali relativamente all'attività neurotossica della tossina che è di poche ore (6).

Un altro caso legato alla ingestione involontaria di acqua (si stima di circa 240 mL) a seguito di caduta accidentale in acqua è stato documentato in un lago canadese: il soggetto adulto dopo poche ore ha sviluppato un disturbo gastroenterico acuto, progredito successivamente in una sintomatologia simil-influenzale, caratterizzata da febbre, forte mal di testa, dolori articolari e mialgia (7). In entrambi i casi l'ingestione è stata determinata dallo stimolo del cosiddetto riflesso immersione-deglutizione, che ha una probabilità maggiore di essere indotto quando la temperatura dell'acqua è inferiore ai 25°C (8). Quindi cadute accidentali o immersioni in acque relativamente fredde rappresentano un rischio maggiore di ingestione rispetto alle acque tiepide delle stagioni calde.

Recentemente è stato riportato un caso-studio di intossicazione acuta durante un'attività sportiva balneare di un giovane in Argentina, accidentalmente caduto in acqua dove è rimasto immerso per circa 2 ore. Il lago era affetto da una forte fioritura di *Microcystis* spp. nell'acqua sono stati trovati 48,6 μg/L di MC-LR disciolta. Quattro ore dopo l'esposizione, che comprendeva contatto diretto, ingestione e inalazione, il ragazzo cominciò ad avere nausea, dolore addominale e febbre. Nei giorni successivi i disturbi progredirono con segnalazione di dispnea e difficoltà respiratoria con diagnosi ospedaliera di una polmonite atipica che escludeva altri agenti eziologici come batteri, virus e funghi ma non altre tossine presenti nell'acqua. Infine a una settimana dall'esposizione il giovane sviluppò una epato-tossicosi con un significativo incremento dei biomarker di danno epatico (Alanina aminotransferasi, ALT, Aspartato aminotransferasi, AST e γ-glutamiltransferasi, γGT). Il completo recupero degli effetti avvenne entro 20 giorni (9).

Effetti acuti simili a quelli dovuti alle cianotossine dopo esposizione balneare, ma con un grado di gravità molto maggiore, sono stati descritti per esposizione alla debromoaplysiatossina e alla lyngbyatossina, tossine prodotte durante la fioritura di *Lyngbya majuscula,* un cianobatterio marino, diffuso nel mondo in più di 98 località con climi tropicali, sub tropicali e temperati (10); nonostante la sua presenza sia stata segnalata in Francia, attualmente non sembra essere rilevante alle nostre latitudini. Gli effetti più frequentemente descritti sono le reazioni dermatologiche di chi si trova a contatto con l'acqua, con lesioni acute cutanee più o meno serie specialmente nelle zone coperte dal costume (10,11). Vengono riportati anche irritazione oculare e delle vie respiratorie ed effetti gastroenterici dopo ingestione (12), verosimilmente legati ad azione locale con fenomeni di forte irritazione della mucosa gastrointestinale, compatibili con il meccanismo di azione di queste tossine.

I vari dati disponibili fino al 2006 relativi sia a segnalazioni e report di tipo aneddotico che a studi epidemiologici sugli effetti sulla salute a seguito di attività di balneazione sono stati esaurientemente descritti in una rassegna (13): i risultati dell'analisi evidenziavano un range di sintomi diversificati associati a questa via espositiva, anche se in nessun caso la valutazione dell'esposizione (quando presente) è sufficiente per definire valori soglia per l'induzione di tali effetti.

Tre studi analitici trasversali (14-16) sono stati condotti nel Regno Unito sui frequentatori di sei bacini interni, 5 dei quali infestati dalle fioriture di cianobatteri, evidenziando similitudine negli effetti riportati indipendentemente dai siti. Nella maggior parte dei casi sono stati segnalati sintomi gastro-intestinali (nausea, vomito, gastroenteriti), dermatologici (arrossamento cutaneo, irritazione cutanea e oculare e delle mucose), sintomi respiratori, generalmente non gravi. Tuttavia in alcuni casi sono stati anche riportati alcuni malesseri acuti seri come polmonite, febbre, mialgia, vertigine e forte mal di testa, e presenza di vesciche e ulcerazioni alla mucosa buccale (7,17-19).

Sono riportate anche se non frequentemente (20) evidenze di risposte allergiche, spesso collegate agli effetti cutanei osservati, legate a sintomi come riniti, congiuntiviti, asma e orticaria, indice di risposte mediate da ipersensibilità. Il quadro sintomatologico legato agli effetti infiammatori/allergici è compatibile con il profilo tossicologico delle endotossine lipopolisaccaridiche (LPS), visto che le altre tossine, testate come molecole pure su modelli animali, hanno mostrato di non avere (MC) o di avere solo un debole potenziale (Cilindrospermopsina, CYN) per l'induzione di effetti di sensibilizzazione (21,22), al contrario degli estratti cianobatterici. Uno studio è stato condotto su una popolazione di 259 soggetti (età 7-78 anni) affetti da rinite allergica e perciò sottoposti a un test allergologico (*skin-prick testing*): utilizzando come possibile allergene preparati cianobatterici privi di tossine, lo studio ha evidenziato che circa il 30% degli individui è risultato positivo ad almeno una delle specie testate. La severità della risposta e il numero di specie in grado di elicitare una risposta erano molto strettamente correlate. Lo studio dimostra chiaramente che l'allergenicità associata ad esposizione a cianobatteri è legata a componenti di questi organismi diversi dalle tossine prodotte (23), ulteriormente avvalorando l'ipotesi che il ruolo principale possa essere svolto dalle tossine LPS.

Inoltre, deve essere tenuto conto che i) durante le fioriture dei cianobatteri altri composti organici come aldeidi, terpenoidi e chetoni possono essere dissolti nell'acqua e alcuni di loro mostrano proprietà irritanti e sensibilizzanti quindi non può essere escluso il loro contributo negli effetti evidenziati (1); e ii) uno studio recente ha suggerito che la comunità batterica associata ai cianobatteri, particolarmente i ceppi di *Aeromonas*, può contribuire significativamente, se non essere responsabile dei sintomi gastrointestinali riportati a seguito di esposizione a fioriture cianobatteriche durante le attività ricreazionali (24).

A seguito di una estesa fioritura di *Anabaena circinalis* in un fiume australiano, fu condotto uno studio caso-controllo (25): un significativo aumento del rischio di effetti gastro-intestinali (GI) e di patologie dermatologiche fu trovato nei partecipanti che avevano usato l'acqua non trattata per usi domestici e non per il sottogruppo (50 soggetti) che avevano praticato attività ricreative.

Lo studio epidemiologico relativo ad attività ricreative più citato è stato condotto in Australia nel 1997 (26): sui risultati descritti nello studio sono basate in gran parte le linee guida sulle acque di balneazione dell'OMS (Organizzazione Mondiale della Sanità) (27) per prevenire il rischio di irritazioni e di effetti più severi causati da MC (senza tenere conto di altre possibili tossine). Lo studio prospettico riporta che persone esposte per più di 1 ora durante le attività ricreative in acque contenenti elevate concentrazioni di cianobatteri (>5.000 cellule/mL) più facilmente riportavano nei successivi 7 giorni almeno un sintomo rispetto a chi era stato esposto ad acqua non contaminata, mentre non risultavano significative le differenze nei sintomi tra esposti e non esposti a due giorni dall'esposizione. Questo studio mostra diverse limitazioni commentate anche da altri autori (1, 13), tra cui il numero ridotto di individui esposti e non (93 soggetti esposti e 43 non esposti); la mancata correlazione con i livelli di MC, che fa presupporre che l'agente etiologico non sia legato alla produzione di tali tossine; il fatto che le reazioni allergiche ritardate attribuite all'esposizione ai cianobatteri, osservate dopo 7 giorni, non sarebbero compatibili con i tempi tipici di queste reazioni, generalmente 4-24 ore dall'esposizione.

Più recentemente è stato condotto uno studio prospettico di coorte più accurato, che ha reclutato 1.331 soggetti da 19 bacini con strutture ricreative nell'est dell'Australia e nella Florida centrale e del nord-est (6). Nello studio i controlli erano gruppi di bagnanti in laghi localizzati nei pressi di quelli scelti per il reclutamento dei casi ma non affetti da fioriture di cianobatteri. Questa caratteristica rende lo studio qualitativamente migliore rispetto a quello del 1997, nel quale i controlli erano persone che non avevano avuto contatto con l'acqua. Le categorie di esposizione livello basso, medio ed elevato di cianobatteri, furono stabilite considerando la superficie cellulare, piuttosto che la densità espressa in n. cell/mL. La scelta fu determinata dal fatto che in molti casi i laghi oggetto di studio erano dominati da picoplankton come *Aphanocapsa* spp. and *Merismopedia* spp.con diametro ≤1µm, mentre gli altri cianobatteri come *A. circinalis* hanno un diametro medio di circa 6-8,5 µm (28): la conta cellulare avrebbe portato quindi ad una sovrastima della biomassa. È stata preferita la superficie cellulare alla misura del biovolume in quanto il picoplankton ha un elevato rapporto superficie/volume, e il biovolume avrebbe portato ad una sottostima dell'esposizione alle cellule più piccole e soprattutto per il contatto diretto la superficie è ritenuta un parametro importante. Per derivare questa grandezza è stata presa come struttura rappresentativa una cellula sferica di 6,2 µm di diametro (tipica di *Microcystis aeruginosa* o *A. circinalis*), per cui 20.000 cell/mL corrispondono ad una superficie cellulare di 2,4 mm^2/mL e 100.000 cell/mL a 12,0 mm^2/mL. Anche questo metodo ha qualche limitazione, in quanto i) prende in considerazione solo cellule sferiche o cilindriche, escludendo altre forme (es. ellissoidali); ii) non tiene conto di aggregati cellulari in cui la superficie cellulare disponibile al contatto con la pelle è decisamente inferiore rispetto a quella di cellule singole.

Un confronto della diversa allocazione nei tre gruppi espositivi dei soggetti arruolati utilizzando i tre modi per misurare l'esposizione (che in ogni caso sono stime in quanto i prelievi dei campioni di acqua non sono stati fatti contestualmente al contatto degli individui arruolati, secondo il disegno dello studio prospettico) è riportata nella Figura A3.1. È evidente che utilizzando la densità cellulare un numero maggiore di individui è incluso nel gruppo ad elevata esposizione.

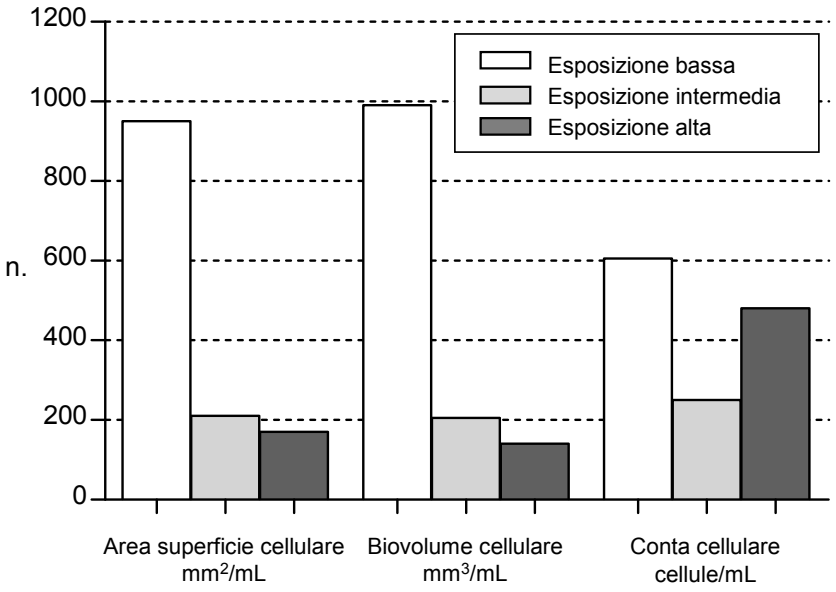


Figura A3.1. Allocazione dei tre gruppi espositivi in base a differenti parametri per misurare la presenza dei cianobatteri cellulari

Lo studio ha evidenziato un aumento statisticamente significativo dei sintomi respiratori e di altri blandi sintomi generici tra i partecipanti esposti a densità elevate di cianobatteri (>12 mm^2/mL). È interessante notare che le persone che avevano usato moto d'acqua nei laghi con alta concentrazione di cianobatteri (superficie cellulare >12,0 mm^2/mL) riportavano sintomi, in particolare respiratori, in maniera doppia delle persone che avevano fatto la stessa attività in laghi dove la concentrazione di cianobatteri era bassa (superficie cellulare<2,4 mm^2/mL). Una correlazione positiva ai livelli elevati di esposizione, anche se non statisticamente significativa, fu trovata anche per i sottogruppi con sintomi cutanei, ma poiché spesso tali sintomi sono non specifici e con regressione spontanea tale da non richieder assistenza medica, potrebbero essere stati largamente sottostimati dai partecipanti. D'altro canto i sintomi GI e le dermatiti possono anche essere erroneamente associati all'esposizione a cianobatteri, perché questi disturbi possono essere causati da altre sostanze disciolte in acqua durante la fioritura e/o alla possibile presenza di altri agenti eziologici come batteri, virus o stimoli fisici che possono provocare orticaria non allergica (6).

Studi relativi ad esposizione ricreazionale (attività di sci d'acqua o su imbarcazioni) sono stati condotti in California, prendendo in considerazione come parametro espositivo la presenza di tossina in aerosol (<0,1 ng MC/m^3) o tamponi nasali, per considerare quantitativamente l'eventuale esposizione per inalazione (29,30) e nel sangue dei soggetti esposti. Nello studio caso-controllo (30) 81 persone tra adulti e bambini (casi) furono reclutate tra quelle che frequentavano due laghi con fioriture di *M. aeruginosa* e altre 7 che frequentavano un lago non contaminato (controlli). La concentrazione totale di MC nell'acqua del lago risultava tra 15-350 µg/L, con la MC-LA come congenere dominante, mentre la concentrazione nell'aerosol (campionato utilizzando campionatori personali per circa 2 ore) era mediamente 0,052 ng MC/m^3 con valori fino 2,89 ng/m^3. La stima dell'esposizione inalatoria risultava molto variabile sia per l'andamento bimodale della dimensione della particelle dell'aerosol (0,23 mm e 2,64 mm), sia per l'interferenza della matrice nel saggio ELISA (*Enzyme-linked immunosorbent assay*) per la quantificazione delle MC dai tamponi nasali pre- e post esposizione (30). Nel plasma dei soggetti non fu mai determinata tossina superiore al limite di determinazione (*Limit of Detection*, LoD) (1 µg/L). Questo risultato pone alcuni dubbi sulla reale biodisponibilità della tossina MC-LR e sulla possibilità di assorbimento a seguito di inalazione tale da dar luogo ad effetti sistemici. D'altra parte gli stessi autori, pur ipotizzando la possibilità dell'esposizione inalatoria, ritengono che i sintomi riportati dalle persone considerati 'casi' avessero valore limitato sia per la scarsa numerosità degli individui arruolati, specie dei controlli, che non permette di evidenziare la possibile differenza tra gruppo esposto e controllo, sia perché i sintomi respiratori e dermatologici riportati potevano essere dovuti anche all'esposizione ad altri contaminanti (30).

Relativamente all'esposizione per inalazione, uno studio recente ha determinato livelli in aria di 16,2 pg/m^3 di nodularina (NOD) e 1,8 pg/m^3 di MC utilizzando per 4, 12 and 24 h campionatori ad alto volume in due laghi in Nuova Zelanda durante una fioritura ed è stato valutato se tali concentrazioni potessero rappresentare un rischio per la popolazione (31). Assumendo il limite della MC per l'acqua potabile definito dall'OMS (1 µg/L), il consumo di 2 litri d'acqua e una biodisponibilità per la via inalatoria 10 volte più alta rispetto alla via orale (sulla base di studi che mostrano che gli effetti acuti della MC-LR somministrata per deposizione intratracheale sono paragonabili a quelli ip nel topo), la concentrazione massima inalabile giornalmente sarebbe circa 200 ng per un uomo di 60 kg. Quindi assumendo una ventilazione media di 30,3 L/min per 24 h, la concentrazione della tossina nell'aerosol non dovrebbe superare i 4,58 ng MC-LR/m^3. È pur vero che differenti tipi di attività corrispondono a velocità di inalazione diverse; quindi è stata presa in considerazione un'attività pesante in base alla quale le tossine potenzialmente inalate dalla popolazione prospiciente ai laghi in 24 ore raggiungevano valori massimi di 1,7 ng e 0,18 ng

per la NOD e la MC, rispettivamente. Quindi la quantità delle due cianotossine aerosolizzate misurate nei due laghi neozelandesi non poneva nessun rischio associato ad inalazione prolungata nella popolazione esposta (31), e a maggior ragione nemmeno un rischio acuto. Considerando il valore limite nell'aerosol stimato sulla base della TDI (*Tolerable Daily Intake*) come derivato dallo studio sopra citato (31), anche il valore più elevato di 2,89 ng MC /m^3 di aerosol, descritto in lavori precedenti (29, 30), non configurerebbe rischi per la salute.

D'altro canto più recentemente è stata riportata la presenza di MC nelle polveri desertiche in Qatar a livelli di 1,5-53,7 ng/g (5). Gli autori ipotizzano che la quantità inalata da una persona potrebbe superare il valore di TDI di 1-2 ng/kg pc al giorno per un adulto di 60 kg (basato sul NOAEL inalatorio di 3 µg/kg pc nel topo definito precedentemente (32). Secondo gli autori quantità al di sotto di 5-10 pg/L non rappresenterebbero un rischio inaccettabile per la salute.

Recentemente è stato pubblicato un report dei *Centers for Disease Control and prevention* (CDC) degli USA che raccoglie i dati di sorveglianza sanitaria su malattie trasmesse dall'acqua ricreazionale per gli anni 2009-2010 (33).

Nel biennio, degli 81 *outbreak*, 24 (30%) sono stati associati all'uso ricreazionale di acque non trattate, il 96% delle quali era relativo a bacini di acqua dolce. In 11 casi (46% del totale) l'agente eziologico 'cianobatteri' fu confermato (attraverso la determinazione di fioriture con ≥20 µg/L MC nei campioni di acqua prelevati durante o al massimo entro 24 h dall'esposizione) o sospetto (MC <20 µg/L; determinazione di altre tossine indipendentemente dal loro livello). Le cianotossine rilevate principalmente furono MC, CYN, ATX-a, e saxitossina (STX) ma in alcuni casi è stata riportata co-presenza di più cianotossine. L'83% degli eventi fu registrato durante giugno, luglio e agosto (il 79% dei 14 eventi riportati dal 1978 al 2008, indicando un incremento notevole del fenomeno negli anni). Gli *outbreak* confermati hanno coinvolto almeno 61 persone (2 ospedalizzati; 7 visitati in una struttura di pronto soccorso e 34 ricorsi comunque a cure mediche), per lo più (66%) con età inferiore ai 19 anni. Gli 11 eventi hanno avuto una durata media di 9 giorni (*range*: 0-44 gg) con il manifestarsi dei sintomi riportato entro poche ore del giorno di esposizione fini a 2 giorni dopo.

Le esposizioni durante le attività ricreazionali furono sia per contatto che per ingestione e inalazione di aerosol. Più del 70% degli effetti era associato alla via espositiva. Gli effetti evidenziati furono dermatologici come *rash* cutaneo, irritazione di pelle e occhi, gonfiore e ulcerazioni (essenzialmente a seguito di contatto diretto); sintomi gastrointestinali (crampi addominali, nausea, vomito, diarrea) quando era riportata ingestione di acqua; e respiratori (tosse, congestione nasale, difficoltà respiratorie), a seguito di inalazione. Febbre, mal di testa, otiti e segni neurologici (tra cui anche stato confusionale, disturbi alla vista) sono stati riportati nel 75% dei casi in cui i campioni di acqua contenevano anche ATX-a e STX. Considerando che le persone colpite in maggioranza avevano un' età inferiore o uguale a 19 anni, i bambini potrebbero avere un rischio più alto di effetti sulla salute associati alle fioriture algali per la maggiore frequenza di esposizione e la più grande quantità di acqua ingerita durante le attività balneari (33).

Nel report non sono indicate le densità cellulari associate ai diversi *outbreak*, ma in 8 casi sono state misurate le concentrazioni di cianotossine: le MC erano sempre presenti, anche se solo in 4 casi superavano i 20 µg/L indicati come soglia dalle linee guida OMS per un rischio moderato per la salute (27) (Tabella A3.1).

È evidente dalla tabella che nell'*outbreak* 8 che ha i livelli più alti di MC-LReq (>2.000 µg/L) e la presenza contemporanea di altre tossine si è segnalato uno dei due casi di ospedalizzazione; non sono riportate informazioni sui livelli presenti nell'*outbreak* 11, che ha dato luogo all'altro caso di ricovero. È anche evidente che nell'*outbreak* 5 (dove la concentrazione di MC-LReq era >1.000 µg/L) si è verificata la segnalazione del numero più alto dei casi sintomatici. Al momento non sono stabiliti limiti per le altre cianotossine nelle acque di balneazione, nè informazioni riguardanti possibili interazioni.

Tabella A3.1. Tipo di esposizione, assistenza sanitaria fornita e indicatori di qualità delle acque relativi agli *outbreak* associati a cianobatteri negli Stati Uniti per gli anni 2009-2010

***Outbreak*/ Stato**	**Casi**	**Tipo di assistenza sanitaria[a]**			**Tipo di esposizione**	**Indicatori di qualità delle acque[b]**				
		MF	**PS**	**H**		**CYAN**	**ATX-a** (µg/L)	**CYN** (µg/L)	**MC** (µg/L)	**STX** (µg/L)
1 New York	2	1	0	0	Contatto	X	_	_	112,5	_
2 New York	2[c]	0	0	0	Contatto	_	_	_	_	_
3 New York	2	0	0	0	Contatto	X[g]	_	_	_	_
4 Ohio	3	1	0	0	Contatto, ingestione, inalazione	_	0,05-0,1	NR	4,6	NR
5 Ohio	19	19	0	0	Contatto, ingestione, inalazione	_	_	_	>1000	_
6 Ohio[ef]	7[d]	2	0	0	Contatto, ingestione, inalazione	X[h]	NR	NR	0,2	0,03
7 Ohio[f]	9	3	2	0	Contatto	_	_	NR	20,8	NR
8 Ohio[ef]	8	5	5	1	Contatto, ingestione, inalazione	_	15,0	9,0	>2000	0,09
9 Ohio	2	0	0	0	Contatto, ingestione	_	0,2	0,3	0,3	NR
10 Washington	3	2	0	0	Ignota	_	_	_	<6,0[i]	_
11 Washington	4	1	0	1	Ingestione	_	_	_	_	_

Modificato da (33)

MF: Medico di famiglia; PS: Pronto soccorso; H: ospedalizzati
CYAN: Cianobatteri
NR= non rilevato (tossine nei campioni al di sotto del LoD).

a. Differenti livelli di assistenza sanitaria a cui le persone hanno avuto accesso. Nessun decesso
b. L'identificazione dei livelli di *E. coli* non è stata riportata (analisi fatte entro il giorno 1 dopo il periodo di esposizione).
c. Informazioni sull'assistenza sanitaria non note per entrambi i casi.
d. Informazioni sull'assistenza sanitaria non note per un caso.
e. Sono stati riportati malesseri e decessi di cani e pesci (nel caso dell'*outbreak* 8 anche di uccelli).
f. Esposizione è avvenuta nei pressi del lago che era anche fonte di acqua potabile. Nei campioni di acqua dopo trattamento la concentrazione di cianotossine era sotto il LoD).
g. Entrambe le esposizioni sono di un singolo giorno. *Microcystis* fu identificata per microscopia 3 giorni dopo la data di esposizione.
h. Fioritura mista di cianobatteri tossicogenici in successione: inizialmente *Anabaena* spp., poi *Cylindrospermopsis raciborskii*, *Aphanizomenon* spp. e *Planktolyngbya limnetica*. 4 giorni dopo la data dell'ultima esposizione MC non è stata rilevata, STX misurata a 0,05 µg/L e ATX-a è stata misurata a 0,05-0,1 µg/L.
i. MC fu >6 µg/L durante la settimana prima dell'outbreak

Lo studio prospettico più recente riguarda 466 residenti sulle rive di 3 laghi canadesi, sotto osservazione per un periodo di 8 settimane. Uno dei laghi, Lake Champlain's Missisquoi Bay (MB), fornisce acqua potabile dopo trattamento (34), per cui i dati dello studio non sono limitati

ad esposizione per uso ricreativo, ma almeno per una parte dei partecipanti, rappresentano una esposizione mista, che comprende l'uso domestico e potabile dell'acqua. Uno degli altri due laghi, Lake William (LW), inoltre ha mostrato una presenza di cianobatteri significativamente inferiore agli altri due (densità più alta circa 50.000 cell/L, contro >>10^6 negli altri due laghi), dando luogo ad un sottogruppo di residenti esposti a livelli più bassi. La concentrazione di MC nel campionamento vicino alla riva del lago LW era nella maggior parte dei casi sotto il limite di determinazione, con un valore massimo di 0,63 µg/L; nel lago Roxton (LR) era nel range: 0,008–108,8 µg/L con 16% dei campioni >1 µg/L e 2% >20 µg/L; nel lago MB il range era da non determinabile a 773 µg/L con il 44% e il 10% dei valori superiori, rispettivamente a 1 e 20 µg/L. I sintomi valutati andavano da quelli gastrointestinali, a quelli cutanei e respiratori, otiti e congiuntiviti, dolori muscolari, mal di testa. Solo i sintomi gastrointestinali furono associati al contatto ricreazionale. Il rischio relativo (RR) di avere sintomi gastrointestinali era correlato alla densità dei cianobatteri (<20.000 cell/mL: RR=1,52, Intervallo di Confidenza (IC) 95%=0,65-3,51; 20.000-100.000 cell/mL: RR=2,71, IC 95%=1,02-7,16; >100.000 cell/mL: RR=3,28, IC 95%=1,69-6,37; significatività dell'incremento: p-trend=0,001). Curiosamente i sintomi GI erano correlati positivamente solo per gli individui che riportavano un contatto limitato con l'acqua, e non c'era correlazione in caso di contatto completo. Gli autori spiegano tale anomalia con la consapevolezza dei partecipanti allo studio di possibili implicazioni sanitarie associate alla balneazione in caso di fioriture, che li hanno portati ad evitare il contatto diretto completo. Tuttavia la concentrazione di MC non sembra essere associata con la frequenza dei sintomi registrati; tuttavia è da notare che sintomi dopo contatto sono stati registrati anche a concentrazioni di 7,65 µg/L, più bassa rispetto al limite di riferimento di 20 µg/L (35, 36). Tuttavia gli stessi autori non escludono la presenza di altri agenti eziologici come altre cianotossine o le comunità batteriche associate ai cianobatteri (24).

A3.3. Emodialisi

La possibilità di esposizione attraverso la via parenterale si verifica quando acque provenienti da corpi idrici superficiali vengono utilizzate per emodialisi. Questa via espositiva rappresenta un notevole rischio per l'uomo poiché la via parenterale rende immediatamente e totalmente biodisponibile la dose interna di tossine introdotta in circolo. Inoltre interessando un gruppo specifico di individui (i pazienti sottoposti al trattamento terapeutico) con stato di salute già parzialmente compromesso, questa via di esposizione rappresenta, per le sue caratteristiche, un rischio maggiore per i soggetti esposti. L'episodio di maggiore rilevanza sanitaria più importante si è verificato in Brasile nel 1996 dove 131 pazienti furono sottoposti a emodialisi con acqua contaminata da MC presenti nel bacino idrico usato per l'approvvigionamento. Centodieci pazienti svilupparono danni epatici acuti, causa di 56 decessi (3, 37).

Le Autorità sanitarie brasiliane hanno reso obbligatorio l'uso di filtri ad osmosi inversa, ma questo sistema senza una manutenzione e un controllo adeguati non garantisce per sé la sicurezza delle acque con esso preparate (38). Infatti in Brasile nel 2001 è stata riscontrata una contaminazione dell'acqua usata per la dialisi a livelli di 0,4 µg/L e di 0,32 µg/L nel filtro di carbone attivo usato nel passaggio intermedio di trattamento per la dialisi. Su 44 pazienti, 13 avevano nel sangue concentrazioni di MC-LR equivalenti superiori al LoD e furono reclutati per un follow-up (4). La concentrazione media nel plasma era di 0,33 ng/mL con un massimo di 0,61 ng/mL; i livelli erano molto più bassi di quelli dei pazienti dell'incidente del 1996 dove la concentrazione stimata di esposizione fu 19,5 ng/mL. Una correlazione negativa e significativa è stata identificata tra i parametri di coagulazione sanguigna (es. tempo di protrombina), che aumentano in presenza di danno epatico, e il massimo di concentrazione circolante delle MC. In

generale i parametri biochimici ed ematologici dei pazienti indicavano la presenza di danni epatici misti. Seppur questo tipo di pazienti siano eparinizzati, a causa della loro terapia cronica, ciò non ha influito sui risultati, ma d'altro canto l'interpretazione di dati relativi a pazienti con patologia non è semplice, in quanto che possono avere risposte ad eventuali danni epatici diversi dalla popolazione generale.

Una limitazione dello studio è relativa alla quantificazione della MC sierica, determinata col metodo ELISA che quantifica solo la tossina libera (trascurando una frazione che potrebbe essere consistente di MC legate alle proteine) per cui la concentrazione misurata non rappresenta la reale dose di esposizione. Il livello circolante di MC persiste a lungo durante il follow-up; ciò era stato notato anche dopo l'episodio di intossicazione del 1996, con MC nel siero determinata anche almeno 90 giorni dopo l'esposizione. Non è chiaro se questo dato sia coerente con il metabolismo delle MC, ma soprattutto se i livelli siano mantenuti da qualche sorgente di esposizione al momento non considerata dopo quella iniziale (4).

A3.4. Acqua potabile

Effetti acuti o a breve termine associati con il consumo di acqua contaminata possono derivare dall'inefficienza dei processi di trattamento delle acque per la rimozione di cianobatteri e cianotossine disciolte; livelli significativi di cianotossine disciolte nelle acque grezze possono essere dovuti sia alla naturale lisi cellulare legata alla senescenza della fioritura che a lisi artificiale dovuta ad inappropriati trattamenti di purificazione. In dipendenza di questi fattori nelle acque per uso umano può essere presente un ampio *range* di livelli di cianotossine e alcuni episodi di intossicazioni acute per consumo di acque contaminate hanno chiaramente dimostrato la plausibilità di una tale eventualità.

Tra gli episodi descritti è stata riportata in Brasile una epidemia con 2000 casi di gastroenteriti e 88 morti in un periodo di 42 giorni attribuita alla fioritura di *Anabaena* e *Microcystis* (39). In Australia a causa del trattamento della fioritura di cianobatteri con solfato di rame si causò lisi cellulare e 140 bambini e 10 adulti furono ricoverati in una settimana in ospedale con danni epatici e renali fortunatamente recuperabili dopo opportuno trattamento terapeutico (40). Successivamente l'intossicazione fu imputata alla *Cylindrospermopsis raciborskii* (41). Sono stati riportati anche diversi altri episodi di gastroenteriti e danni epatici potenzialmente associati con acqua da bere contaminata (25, 42-44).

A causa dei trattamenti a cui le acque destinate al consumo umano sono sottoposte nei Paesi industrializzati questo scenario di esposizione è quello più ragionevolmente legato ad un eventuale rischio cronico. In proposito sono stati condotti in passato alcuni studi epidemiologici, ma le informazioni in genere sono limitate e non permettono di trarre alcuna conclusione. Infatti, in nessuno degli studi è stato possibile provare che le cianotossine fossero il vero agente causale degli effetti osservati, ma semplicemente uno dei più plausibili (45-47).

L'associazione tra l'alta incidenza di tumori epatici nella popolazione cinese e il consumo di acqua non trattata contenente MC (45) è infatti fortemente questionabile per il fatto che l'acqua proveniente direttamente da stagni e corpi idrici non controllati poteva presentare contaminazioni chimiche e microbiologiche non limitate alle cianotossine (e non considerate dagli autori). Inoltre il concomitante consumo di cibo contenente aflatossina B1, un noto cancerogeno epatico, inficia la validità dello studio essendo un fattore confondente molto rilevante.

Analogamente nessuna conclusione può essere tratta da due studi circa la possibile associazione in Florida tra tumori epatici e colon-rettali e consumo di acqua potenzialmente contaminata con cianotossine (46, 47). Alla luce della qualità dei dati epidemiologici disponibili

la IARC (*International Agency for Research on Cancer*) (48) ha concluso che non è possibile associare la maggiore incidenza di carcinoma epatico e cancro colon-rettale in maniera specifica con l'esposizione a MC, indicando anche una assenza di informazioni che dimostrino una attività genotossica, ma ha comunque classificato la MC-LR in categoria 2B, a causa dei dati disponibili su modelli animali che indicano chiaramente un meccanismo di promozione tumorale.

È proprio a questo tipo di attività che potrebbe essere attribuito il risultato ottenuto da uno studio epidemiologico in Serbia, Paese in cui circa l'80% dei bacini idrici, utilizzati come fonte di approvvigionamento di acque destinate al consumo umano, nei passati 80 anni sono stati affetti da fioriture di cianobatteri. I livelli di MC-LR erano fino a 650 µg/L nelle acque grezze e di 2,5 µg/L nell'acqua potabile (49,50), livello più che doppio rispetto alla linea guida indicata dall'OMS (51). Lo studio ha mostrato negli ultimi 10 anni un aumento significativo di cancro epatico primario (*Primary Liver Cancer*, PLC), specialmente in quei distretti dove l'acqua potabile consumata dalle popolazioni proviene da *reservoir* interessati da fioriture, rispetto a regioni come la Vojvodina che si approvvigionano essenzialmente con acque sotterranee (50). Non è stata trovata alcuna correlazione tra incidenza di PLC e altri fattori di rischio rilevanti quali la cirrosi e virus dell'epatite.

Come mostra la Figura A3.2, nella regione della Vojvodina a nord della Serbia centrale l'incidenza di PLC nel periodo 1999-2008 è risultata di 7,2 per 100.000 abitanti ed è rimasta più o meno costante nel tempo; nella Serbia centrale, l'incidenza è più elevata, 14 per 100.000, ma possono essere identificate due regioni in cui l'incidenza di PLC sale a 27. Nella figura sono evidenziati i corpi idrici maggiormente affetti da fioriture e utilizzati come fonte di acqua potabile: come si può vedere le aree coincidono.

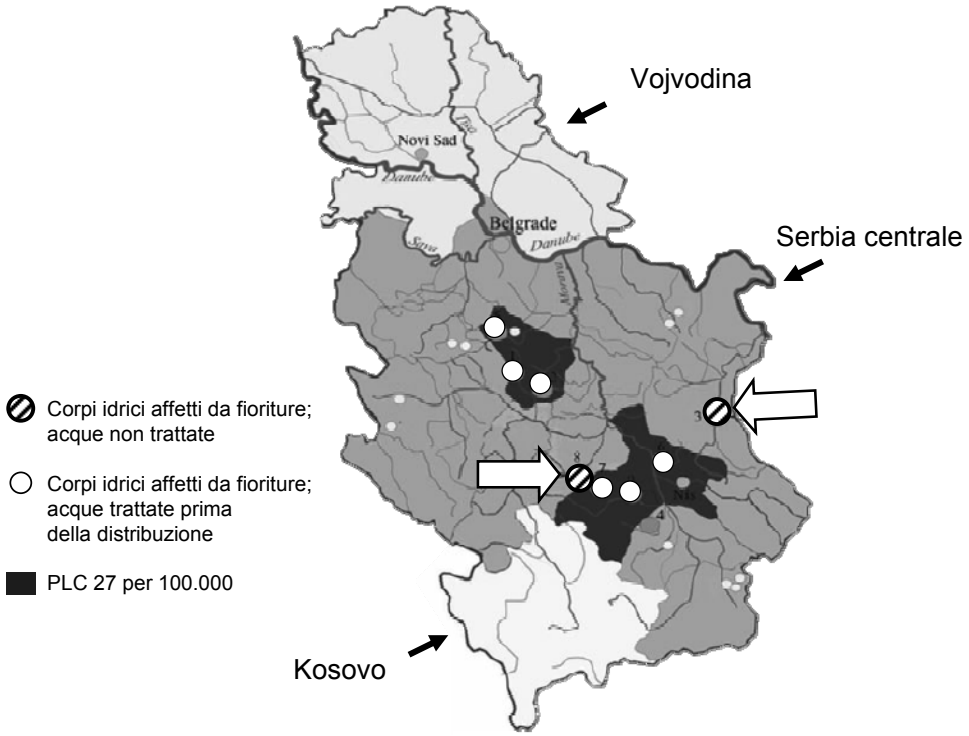


Figura A3.2. Incidenza di PLC (*Primary Liver Cancer*) nelle varie aree della Serbia e indicazione dei corpi idrici maggiormente affetti da fioriture di cianobatteri

È interessante notare che i due cerchi indicati dalle frecce bianche che si trovano al di fuori delle aree a maggior incidenza di PLC corrispondono a due corpi idrici le cui acque sono trattate con procedure di ozonizzazione prima di essere distribuite alla popolazione (50). Essendo le MC in grado di causare danni epatici ed essere dei promotori tumorali, è ben probabile che possano agire sinergicamente con altri fattori di rischio per il tumore epatico, facilitando l'insorgenza di PLC diminuendo i tempi di latenza e aumentando la progressione della patologia, determinando un problema sanitario di notevole rilevanza.

A3.5. Esposizione attraverso la dieta

La dieta rappresenta per l'uomo un'altra possibile fonte di esposizione cronica alle cianotossine che potrebbero essere ingerite attraverso:

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

I dati relativi alla contaminazione di carni e latte sono molto limitati e si riferiscono solo alla MC-LR. I risultati di studi su bovini trattati con MC o estratti di *M. aeruginosa* indicano l'assenza di residui nelle carni e nel latte (52, 53), compatibilmente con le caratteristiche di idrosolubilità della molecola. Tuttavia non sono disponibili dati per le altre cianotossine, inclusi i congeneri lipofili delle MC.

È stata documentata la presenza di cianotossine in prodotti vegetali, specialmente a foglia larga, a seguito di irrigazione con acque contenenti cianobatteri. Ciò è stato attribuito inizialmente al contenuto intracellulare di cellule di cianobatteri depositate sulle foglie (54), ma successivamente sono stati prodotti dati relativi al possibile assorbimento delle tossine disciolte da parte di piante eduli, tra cui rapa e riso, se esposte ad acque contenenti MC-LR equivalenti fino a 3 mg/L contenevano livelli massimi di 651 e 5,4 ng/g peso fresco (55). Anche nei legumi, mais, grano, alfalfa (56) e crucifere (*Brassica* spp., *Sinapsis alba*), queste ultime capaci di accumulare 10-21% della CYN somministrata assorbita attraverso le radici, si sono raggiunti livelli di 49 µg/g (peso fresco) nelle foglie (57).

Deve essere tuttavia notato che negli studi descritti sono state utilizzate acque interessate da livelli di cianotossine corrispondenti a fioriture sostenute e a schiume. Non solo questa condizione non può che essere un evento episodico e di durata limitata per poter essere rilevante per un consumo cronico, ma è stato riportato che in alcuni casi quei livelli di MC sono in grado di inibire la crescita delle piante e di causare fenomeni visibili di fitotossicità (presenza di foglie gialle e brune), che ovviamente limitano la possibilità che tali prodotti possano venire consumati dalla popolazione (55). Quando vegetali come i broccoli sono stati irrigati con acque contenenti livelli di MC comparabili a quelli misurati in acque superficiali (1-10 µg/L), le tossine sono rilevabili solo nelle radici, a livelli che non corrispondono ad alcun rischio apprezzabile per la salute umana (58).

Rispetto alle tossine prodotte da alghe tossiche in acque salmastre, il bioaccumulo delle tossine cianobatteriche nella catena alimentare e le relative conseguenze per la salute umana sono stati molto meno studiati. Una delle ragioni più plausibili è che fino ad oggi non sono stati documentati casi di intossicazione umana (o di animali domestici) attribuibile a consumo di cibi contaminati da tossine cianobatteriche. D'altra parte i prodotti ittici d'acqua dolce, vale a dire il tipo di alimento finora più studiato al riguardo, rappresentano una piccola percentuale del pescato consumato: la FAO (*Food and Agriculture Organization*) ha stimato che nel 2008 a

livello globale siano state consumate 90 milioni di tonnellate di pescato, di cui solo 10 milioni provenienti da acque interne (59). La quantità di prodotti ittici di acqua dolce non è tuttavia certo trascurabile e un numero crescente di dati è stato pubblicato negli ultimi anni a testimonianza della presenza di tossine cianobatteriche a vari livelli trofici, sia nei muscoli che nelle viscere di molluschi e pesci, incluse specie consumate direttamente dall'uomo.

Una recente rassegna (60) riporta tutti i dati ad oggi disponibili, dai quali è evidente che le MC (sia come MC-LR o MC-LRequivalenti) sono quelle più frequentemente ritrovate, a livelli generalmente bassi (nell'ordine dei nanogrammi per grammo) ma con punte di 0,337 µg/g e 0,867 µg/g in due pesci commestibili (Tilapia e *Goodea* sp., rispettivamente). Sono state ritrovate anche ATX-a a livelli di 23,6 µg/g in avannotti di trota e 0,205 µg/g di CYN in alcune specie di gamberetti.

Data la idrosolubilità della maggior parte delle cianotossine, non è chiaro quale sia il meccanismo di accumulo nei tessuti dei prodotti ittici e per questo è stato ipotizzato che queste tossine lungo la catena trofica seguano più un percorso di bio-diluizione piuttosto che di bio-magnificazione (60-63). D'altra parte la presenza di cianotossine in specie direttamente consumate dall'uomo dimostra che anche in assenza di biomagnificazione l'esposizione umana attraverso questa via è comunque plausibile.

I fattori che maggiormente influiscono sul trasferimento nella catena trofica e quindi sulla reale esposizione umana sono la selezione, la biodisponibilità e la cinetica delle tossine nelle diverse specie, che determina il livello e la durata della contaminazione.

La selezione è il fattore che probabilmente limita inizialmente il consumo di cellule di cianobatteri da parte delle specie che si nutrono di plankton (60), così come la selettività del consumo umano, che preferisce specie ittiche marine, e nel caso in cui scelga specie di acqua dolce preferisce quelle di livello trofico superiore, generalmente scartando i visceri, dove sono stati misurati i livelli più elevati di cianotossine. Le informazioni sulla biodisponibilità, il secondo fattore, sono estremamente carenti. Generalmente ci si riferisce al contenuto di tossina libera presente nei tessuti dei pesci, senza considerare che per esempio le MC hanno la possibilità di legarsi covalentemente alle proteine (ad esempio, attraverso il legame tra Mdha, N-metildeidroalanina, e i residui proteici di cisteina), tanto che solo circa il 24% di MC somministrata ip a salmoni si recupera in forma libera con i classici metodi di estrazione con solventi (64, 65) e anche nel plasma umano al massimo il 50% si trova in forma libera (66).

Se la porzione di tossina legata sia o meno biodisponibile per l'organismo e possa rappresentare una fonte di tossina nel tempo, non è noto. Sono disponibili solo alcuni studi non conclusivi sul ruolo di alcuni enzimi digestivi, della temperatura e delle modalità di conservazione e cottura (67-70).

Le uniche informazioni disponibili relative ad effetti legati al consumo di cibo contaminato da MC sono state ottenute su popolazioni cinesi. È stata determinata nel siero di 35 pescatori cinesi la presenza di MC-LReq a livelli medi di 0,39 ng/mL. Erano residenti sulle rive di laghi interessati da fioriture di cianobatteri con un'esposizione giornaliera cronica, dovuta a consumo di prodotti ittici e uccelli acquatici ma anche acqua, stimata nel range di 2,2–3,9 µg MC-LReq. La concentrazione circolante di MC-LReq in 11 pescatori su 35 (31%) correlava positivamente con biomarker di danno epatico (ALT, AST, lattato deidrogenasi LDH e fosfatasi alcalina ALP). Seppur più del 90% dei pescatori era negativo agli anticorpi dell'epatite altri fattori confondenti non sono stati considerati (71).

Sempre riguardo l'esposizione cronica a MC, uno studio ha preso in considerazione 1.322 bambini cinesi tra i 7 e i 15 anni che consumavano acqua e cibo (pesce e anatra) da due laghi e 4 pozzi. I bambini sono stati divisi in tre gruppi, in dipendenza dei livelli di esposizione: non esposti (11% del totale); esposti a basse (14%) e ad alte dosi (75%). Considerando la media di concentrazione di MC determinata nell'acqua dei due laghi nell'arco di 5 anni e il consumo di

cibo è stato stimato un intake di 0,36 e 2,03 µg giornalieri, rispettivamente, per il gruppo a bassa e alta esposizione. In 50 partecipanti per gruppo, per confermare l'esposizione, fu dosata la MC nel siero: la MC circolante aveva livelli medi di 0,4 µg e 1,3 µg MC-LReq/L per i gruppi di bassa e alta esposizione, rispettivamente. I valori medi di AST e ALP erano più alti nei bambini esposti anche tenendo conto di fattori interferenti come le infezioni da epatite B e l'uso di farmaci epatotossici (72).

Il fatto che le tossine PSP (*Paralytic Shellfish Poisoning*), tra cui le STX, siano prodotte da organismi marini e che possano bioaccumulare in crostacei e molluschi implica la possibilità di alti livelli di esposizione tra i predatori, compreso l'uomo, sia sicuramente maggiore rispetto a tutte le altre cianotossine. Attraverso le informazioni raccolte a causa dei numerosi casi di intossicazione riportati è stato possibile, seppur con un certo grado di incertezza, ricavare valori di riferimento per la protezione della popolazione.

Le STX sono facilmente assorbibili dal tratto GI, sono distribuite largamente ai vari distretti corporei, diffondono attraverso la barriera ematoencefalica e sono escrete principalmente nelle urine. Studi sul loro metabolismo sono molto scarsi, comunque l'osservazione clinica per 24 h di pazienti sopravvissuti ad intossicazioni suggerisce che le PSP subiscono una rapida eliminazione dovuta sia ad escrezione che a metabolismo di ossidazione e successiva glucoronidazione. Sono state descritte alcune interconversioni sia di natura enzimatica che semplicemente per idrolisi acida in ambiente gastrico tra diversi congeneri con tossicità diversa (*vedi* capitolo A2.2.5). Questo è quindi un aspetto da tener presente nella valutazione del rischio per l'uomo: anche se il prodotto ittico dovesse contenere tossine N-sulfocarbamoiliche debolmente tossiche, queste ultime possono dar luogo a episodi di avvelenamento severo dopo ingestione e idrolisi acida nello stomaco.

I livelli a cui avvengono le intossicazioni da tossine PSP nell'uomo variano considerevolmente, infatti un consumo orale di circa 300 µg di PST per persona in un caso è stato riportato come non tossico, mentre in un altro è stato addirittura fatale. In accordo con il report FAO del 2004 (73), una ingestione totale acuta nel range di 0,144-1,66 mg STXeq per persona induce principalmente sintomi blandi mentre per consumi in un range sovrapponibile di dosi (0,456-12,4 mg STXeq per persona) è stato descritto un ampio spettro di effetti dai sintomi moderati alla paralisi e morte. Questa alta variabilità può essere attribuita ai differenti approcci e metodi applicati per quantificare il reale livello di esposizione, come anche le differenze nella suscettibilità individuale. Ciò che determina la severità degli effetti sono la specifica tossicità della PSP nel cibo ingerito, la quantità di cibo e la velocità di eliminazione della tossina dal corpo e la diversa sensibilità dei canali del Na^+. Quando i sintomi vanno dal blando al moderato il recupero da una intossicazione da STX è di solito completo. Nei casi fatali la paralisi respiratoria avviene tra le 2 e le12 ore dopo l'assunzione del cibo contaminato.

L'EFSA nel 2009 ha usato i dati disponibili su intossicazioni umane dovuti a STX di fitoplankton marino comprendenti più di 500 individui, per calcolare un LOAEL (*Lowest Adverse Effect Level*) per la tossicità acuta pari a 1,5 µg STXeq/kg pc. Poiché molti individui non mostrarono effetti avversi ad intake più alti si è pensato che questo valore fosse vicino alla soglia degli effetti per gli individui più sensibili e fosse perciò considerabile come un LOAEL. Perciò l'EFSA ha deciso di applicare un ulteriore fattore 3 di incertezza nella valutazione del rischio (74).

Recentemente si è andato diffondendo nei Paesi industrializzati l'uso come integratori alimentari di estratti di alghe verde-azzurre (*Blue Green Algae Supplements*, BGAS), principalmente a base di *Aphanizomenon flos-aquae* e *Spirulina* spp., in passato diffuse in Paesi orientali come Cina e India (75). Di solito sono ottenuti per raccolta in ambienti naturali, dove potenzialmente sono presenti anche cianobatteri tossici e in effetti sono stati riportati molti

lavori che dimostrano una contaminazione da parte di vari congeneri di MC, inclusa la MC-LR, a livelli molto variabili fino a 35 µg/g di peso secco (76-79).

Gli integratori vengono consumati per le loro presunte attività di migliorare l'umore, aiutare nella perdita di peso durante diete ipocaloriche e come fonte energetica (80) e sono anche somministrati a bambini in età scolare che soffrono di disturbi dell'attenzione e iperattività (sindrome dell'*Attention Deficit Hyperactivity Disorder*, ADHD) come terapia alternativa. L'assunzione è strettamente dipendente da scelte individuali e può difficilmente essere controllata per la valutazione della esposizione.

È stato pubblicato un caso di decesso in una donna 34enne per tossicità epatica. Sebbene una diretta relazione causa-effetto non sia ancora stata stabilità con certezza, la morte è stata correlata all'assunzione cronica di BGAS, di cui la paziente era abituale consumatrice, dal momento che: i) i prodotti in suo possesso sono risultati contaminati da MC (2,62-4,06 µg MC-LReq/g di peso secco); ii) sezioni epatiche della paziente sono risultate positive ad analisi immunoistochimiche con anticorpi anti-MC; e iii) i danni epatici non sono risultati compatibili con cirrosi da consumo di alcol, ma tipici degli effetti prodotti da MC (81).

A3.6. Un caso particolare: cianotossine e malattie neurodegenerative

Un cluster di alta incidenza della malattia neurodegenerativa atipica definita "complesso Sclerosi Laterale Amiotrofica-Parkinson Demenza" (SLA-PDC) è rappresentato dalla popolazione Chamorro dell'isola di Guam, dove l'insorgenza della patologia è stata messa in relazione al consumo di pipistrelli capaci di bioaccumulare l'aminoacido potenzialmente neurotossico β-metilamminoalanina (BMAA) (82). Questa molecola è prodotta da cianobatteri del genere *Nostoc,* simbionti delle radici della C*ycas circinalis*, dei cui semi si nutrono i pipistrelli e in letteratura sono disponibili altri esempi che indicano che pur essendo generalmente autotrofi, i cianobatteri possono comportarsi come eterotrofi e simbionti con vari organismi. Tuttavia altri autori criticano l'ipotesi del ruolo della BMAA nella SLA/PDC e nell'Alzheimer a causa della alte dosi che devono essere somministrate ai primati per indurre effetti degenerativi e che corrispondono ad un consumo non realistico di cibo contaminato nell'uomo. In aggiunta la somministrazione di BMAA non è stata associata con effetti neurotossici in vivo nel topo (83) e inoltre per indurre morte neuronale *in vitro* sono necessarie alte concentrazioni di BMAA (1-3 mM) (84) (*vedi* capitolo A2.2.6).

È stata anche formulata una ipotesi alternativa che lega la SLA ai cianobatteri, basata sulla osservazione che alcuni studi in ambito neuro-epidemiologico hanno mostrato un'incidenza della SLA più alta tra agricoltori e allevatori e individui soggetti a prolungato esercizio fisico/traumi, come i giocatori di baseball e football negli USA e i calciatori in Italia (85). Uno dei fattori che sembra accomunare queste categorie è il manto erboso: considerando che l'irrigazione dei campi di calcio (e non solo) viene effettuata spesso con acque superficiali, che possono essere interessate dalla presenza di cianobatteri.Questi ultimi potrebbero essere 'internalizzati' attraverso varie vie infettando soggetti esposti geneticamente o immunologicamente sensibili, spiegando il comportamento epidemiologico della SLA (86). Questa ipotesi, per il momento né smentita né confermata, sembra avere una plausibilità, considerando che recentemente è stata dimostrata la capacità per un ceppo di *M. aeruginosa* di sopravvivere e crescere mantenendo le caratteristiche genetiche per la produzione della tossina in condizioni che mimano alcune caratteristiche del microambiente del lume gastro-intestinale (87).

Il dibattito a livello scientifico è ancora aperto, con produzione di molti dati discordanti tra loro, anche attribuibili a problemi di tipo metodologico nella determinazione delle tossine in matrici complesse (88,89). La presenza di BMAA fino a 6 µg/g in encefali di pazienti affetti da SLA-PDC e demenza di Alzheimer (90) in Canada, quindi lontano da Guam, l'assenza in campioni di pazienti deceduti per altre malattie neurodegerative strettamente ereditarie come l'Huntington (89) e la possibilità che la BMAA possa essere prodotta da vari cianobatteri, hanno supportato l'ipotesi che l'esposizione a questa tossina, ma anche altre cianotossine dotate di attività neurotossica (inclusi alcuni congeneri di MC tra cui la MC-LR e la MC-LF), possa avere un ruolo nella eziopatogenesi della SLA. A supporto di questa ipotesi è stato dimostrato che la BMAA viene erroneamente incorporata nelle proteine neuronali attraverso il sistema L-serina t-RNA-sintetasi (92,93); sono stati descritti cluster di SLA in zone soggette a fioriture di cianobatteri in varie regioni del mondo (942); è stato riportato un aumento significativo di incidenza di SLA (2,3 volte) in soggetti residenti entro mezzo miglio da un lago del New Hampshire affetto da forti fioriture (95) ed è stata ipotizzata nei veterani della Guerra del Golfo una associazione tra SLA ed esposizione a BMAA prodotta dai cianobatteri nella polvere del deserto (96).

Molto recentemente è stato utilizzato un approccio di modellistica eco-epidemiologica per caratterizzare la relazione spaziale tra alcune aree del New England, in cui l'incidenza di SLA è più elevato dell'atteso, e la qualità delle acque lacustri delle stesse zone (circa 6 ettari), attraverso *remote sensing* (considerando parametri generici di qualità delle acque come: clorofilla-a, trasparenza con disco di Secchi e azoto totale). Gli autori concludono che una scarsa qualità delle acque è significativamente associata all'aumento dell'incidenza di SLA della zona, anche se la semplice qualità delle acque non può essere direttamente e unicamente associata alla presenza di cianobatteri e cianotossine (94).

A3.7. Conclusioni

Per quanto riguarda il rischio associato alle attività ricreative in acque di balneazione, sembra opportuno premettere che in Paesi temperati, come il nostro, la stagione balneare è limitata ai 4-5 mesi più caldi dell'anno. Questo tipo di esposizione, legato anche alla stagionalità delle fioriture, ha pertanto le caratteristiche necessarie per prefigurare un rischio subcronico, piuttosto che una esposizione continuativa per tutta la vita. Tuttavia, considerando la possibilità di svolgere attività sportive e/o professionali anche al di fuori della balneazione in corpi idrici potenzialmente interessati da fioriture di cianobatteri diversi nei vari periodi dell'anno, la possibilità di avere specifiche esposizioni prolungate, dovute all'uso ricreativo delle acque, non può essere esclusa, anche se la stagionalità delle fioriture ne limita fortemente la probabilità.

I dati epidemiologici disponibili danno spesso quantificazioni dell'esposizione insufficienti alla identificazione di valori di riferimento, anche perché spesso come categorie espositive vengono indicate quelle definite nelle linee guida dell'OMS (27) (*vedi* capitolo A4). Tuttavia l'analisi dei sintomi indica chiaramente che tutte e tre le vie di esposizione (cutanea, orale e inalatoria) sono rilevanti; in particolare la via inalatoria può esserlo anche per coloro che risiedono nei pressi del corpo idrico e svolgono attività senza avere contatto diretto con l'acqua. Relativamente a quest'ultima via, molti dei sintomi descritti possono essere attribuiti ad un effetto locale sulla mucosa delle vie aeree superiori. Al momento non si conosce la dinamica di formazione dell'aerosol (es. condizioni ambientali e climatiche o attività da svolgere in acqua necessarie perché si abbia formazione significativa di aerosol), anche se può essere ipotizzato che vento forte e elevato idrodinamismo, sia dovuto alle condizioni climatiche che alla presenza

di navigazione di imbarcazioni a motore e ad attività sportive come sci d'acqua e canoa, che comportano un notevole spostamento di masse d'acqua, possano essere condizioni in grado di favorire formazione di aerosol. D'altro canto, non è nota nemmeno l'eventuale biodisponibilità delle tossine a dar luogo ad effetti sistemici dopo inalazione. Considerando l'estrapolazione di uno studio recente (*vedi* paragrafo A3.2) (31), sulla base della TDI è possibile stabilire un valore limite per le MCs nell'aerosol di 4,58 ng MC-LR/m^3 al di sotto del quale non si hanno rischi per la salute da inalazione cronica.

I dati nel loro insieme sembrano confermare che fino a 100.000 cell/mL (secondo le linee guida dell'OMS) (51) gli effetti eventualmente prodotti sono reversibili e di lieve entità, dovuti ad effetti locali (pelle, occhi e mucosa gastrointestinale e delle vie aeree superiori) tali da non richiedere il ricorso a cure mediche. È inoltre evidente dal Report dei CDC (33) che il gruppo maggiormente a rischio è costituito da bambini e adolescenti (età inferiore ai 19 anni), per i quali è necessaria un'attenzione specifica. Le linee guida OMS danno come corrispondenza di 100.000 cell/mL con 20 µg di MCeq/L: è importante notare che per gli effetti locali al punto di contatto (che corrispondono ai sintomi sia dermatologici, che GI e respiratori descritti) le MC non sembrano avere un ruolo determinante, dal momento che studi specifici indicano attività irritanti/infiammatorie/allergizzanti) a componenti cellulari diversi dalle tossine. Queste ultime sono invece il parametro più rilevante per gli effetti sistemici a seguito di ingestione involontaria di acqua contaminata. Non si hanno al momento informazioni utili per la via respiratoria. E in effetti, al superamento del suddetto limite si sono invece verificati anche casi più gravi, che hanno necessitato di ospedalizzazione. È importante che non ci si riferisca solo al numero delle cellule perché ad esempio quando le fioriture sono in fase di decadimento è possibile che le concentrazioni di tossine disciolte siano piuttosto elevate (97,98) a fronte di un numero di cellule basso. Il fenomeno è comunque limitato nel tempo a causa della forte diluizione all'interno del corpo idrico, del rimescolamento operato dal vento e da fenomeni di adsorbimento ai sedimenti e di (bio)degradazione.

In quei casi nei quali acque interessate da fioriture di cianobatteri in corpi idrici superficiali siano utilizzate a scopo potabile, può configurarsi un rischio da esposizione cronica alle cianotossine. Tuttavia i trattamenti di potabilizzazione ai quali sono sottoposte le acque superficiali prima della loro distribuzione dovrebbero essere condotti in modo da ottenere una forte riduzione dei livelli delle cellule dei cianobatteri e delle cianotossine disciolte. Ovviamente dovrebbero essere evitate le condizioni, come ad esempio l'uso di alcuni disinfettanti, in grado di causare la lisi cellulare con il conseguente rilascio delle tossine. I trattamenti di potabilizzazione sono oggi in grado di rimuovere >99% delle cellule e delle cianotossine disciolte nelle acque grezze, ma dovrebbero comunque essere calibrati sulla base delle conoscenze sul corpo idrico e in relazione al contenuto delle cianotossine totali e di quelle disciolte in acqua, per evitare di superare il valore identificato dalle linee guida dell'OMS per le acque potabili, e di conseguenza i possibili rischi per la salute umana che lo studio in Serbia ha mostrato.

La possibilità di avere esposizioni continuate non solo attraverso la via orale da varie fonti (acqua potabile, dieta nei suoi vari componenti e ingestione involontaria durante le attività ricreative), ma anche attraverso le altre vie, in particolare quella inalatoria, sottolinea però la necessità di procedere alla valutazione di esposizioni cumulative specialmente per alcuni gruppi di popolazione potenzialmente più esposti (bambini e adolescenti, esposti professionalmente, residenti nei pressi del corpo idrico che consumano prodotti locali). Al momento tuttavia, esiste ancora un notevole margine di incertezza e sono necessarie ricerche specifiche che possano supportare con una solida base scientifica le varie valutazioni di rischio.

Bibliografia

1. Funari E, Testai E. Human health risk assessment related to cyanotoxins exposure. *Crit Rev Toxicol* 2008;38:97-125.
2. Carmichael WW, Azevedo SM, An JS, Molica RJ, Jochimsen EM, Lau S, Rinehart KL, Shaw GR, Eaglesham GK. Human fatalities from cyanobacteria: chemical and biological evidence for cyanotoxins. *Environ Health Perspect* 2001;109:663-8.
3. Azevedo SM, Jochimsen EM, Rinehart KL, Lau S, Shaw GR, Eaglesham GK. Human intoxication by microcystins during renal dialysis treatment in Caruaru-Brazil. *Toxicol* 2002;181:441-6.
4. Hilborn ED, Soares RM, Servaites JC, Delgado AG, Magalhães VF, Charmichael WW, Avezedo SMFO. Sublethal microcystin exposure and biochemical outcomes among hemodialysis patients. *PLoS ONE* 2013;8: Available at: e69518. doi: 10.1371/journal.pone.0069518.
5. Metcalf JS, Richer R, Cox PA, Codd GA. Cyanotoxins in desert environments may present a risk to human health. *Sci Total Envirom* 2012;421-422:118-23.
6. Stewart I, Webb PM, Schluter PJ, Fleming LE, Burns JW, Gantar M, Backe LC, Shaw GR. Epidemiology of recreational exposure to freshwater cyanobacteria- an international prospective cohort study. *BMC Public Health* 2006;6:93.
7. Dillenberg HO, Dehnel MK. Toxic waterbloom in Saskatchewan. *Can Med Assoc* 1960;83:1151-4.
8. Stewart I, Charmichael WW, Sadler R, McGregor GB, Reardon K, Eaglesham GK, Wickramasinghe WA, Seawright AA, Shaw GR. Occupational and environmental hazard assessments for the isolation, purification and toxicity testing of cyanobacterial toxins. *Environ Health* 2009;8:1-12.
9. Giannuzzi L, Sedan D, Echenique R, Andrinolo D. An acute case of intoxication with cyanobacteria and cyanotoxins in recreational water in Salto Grande Dam, Argentina. *Mar Drugs* 2011;9:2164-75.
10. Taylor MS, Stahl-Timmins W, Redshaw CH, Osborne NJ. Toxic alkaloids in Lyngbya majuscula and related tropical marine cyanobacteria. *Harm Algae* 2014;31:1-8.
11. Werner KA, Marquart L, Norton SA. Lyngbya dermatitis (toxic seaweed dermatitis). *Int J Dermatol* 2012;51:59-62.
12. Osborne NJ, Shaw GR, Webb PM. Health effects of recreational exposure to Moreton Bay, Australia waters during a Lyngbya majuscula bloom. *Environ Int* 2007;33:309-314.
13. Stewart I, Webb PM, Schluter PJ, Shaw GR. Recreational and occupational field exposure to freshwater cyanobacteria – a review of anecdotal and case reports, epidemiological studies and the challenges for epidemiologic assessment. *Environ Health Glob Acc Sci Source* 2006;5:6.
14. Philipp R. Health risk associated with recreational exposure to blue-green algae (cyanobacteria) when dinghy sailing. *Health Hyg* 1992;13:110-4.
15. Philipp R, Bate AJ. Health-risks assessment of dinghy sailing in Avon and exposure to cyanobacteria (blue-green algae). *J Inst Water Environ Manag*1992;6:613-20.
16. Philipp R, Brown M, Bell R, Francis F. Health risks associated with recreational exposure to blue-green algae (cyanobacteria) when windsurfing and fishing. *Health Hyg* 1992;13:115-9.
17. Charmichael WW, Jones CLA, Mahomood NA, Theiss WC. Algal toxins and water-based diseases. *CRC Crit Rev Environ Cont* 1985;15:275-313.
18. Stewart I, Webb PM, Schluter PJ, Shaw GR. Cyanobacterial lipopolysaccharides and human health – a review. *Environ Health Glob Acc SciSource* 2006;5:7.
19. Turner PC, Gammie AJ, Hollirake K, Codd GA. Pneumonia associated with contact with cyanobacteria. *Br Med J* 1990;139:231-250.
20. Stewart I, Robertson IM, Webb PM, Schluter PJ, Shaw GR. Cutaneous hypersensitivity reactions to freshwater cyanobacteria--human volunteer studies. *BMC Dermatol* 2006;6:1-9.

21. Torokne A, Palovics A, Banckine M. Allergenic (sensitization, skin and eye irritation) effects of freshwater cyanobacteria – experimenatl evidence. *Environ Toxicol* 2001;32:512-6.
22. Stewart I, Seawright AA, Schluter PJ, Shaw GR. Primary irritant and delayed-contact hypersensitivity reactions to the freshwater cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* and its associated toxin cylindrospermopsin. *BMC Dermatol* 2014;6:1-12.
23. Bernstein JA, Ghosh D, Levin LS, Zheng S, Charmichael W, Lummus Z, Bernstein IL. Cyanobacteria: an unrecognized ubiquitous sensitizing allergen? *Allergy Asthma Proc* 2011;32:106-10.
24. Berg KA, Lyra C, Niemi M, Heens R, Hoppu K, Erkomaa K, Sivonen K, Rapala J. Virulence genes of Aeromonas isolates, bacterial endotoxins and cyanobacterial toxins from recreational water samples associated with human health symptoms. *J Water Health* 2011;670-8.
25. El Saadi OE, Esterman AJ, Cameron S, Roder DM. Murray River water, raised cyanobacterial cell counts, and gastrointestinal and dermatological symptoms. *Med J Aust* 1995;162:122-5.
26. Pilotto LS, Douglas RM, Burch MD, Cameron S, Beers M, Rouch GJ, Robinson P, Kirk M, Cowie CT, Hardiman S, Moore C, Attewell RG. Health effects of exposure to cyanobacteria (blue-gree algae) during recreational water-related activities. *Aust N Z J Public Health* 1997;21:562-6.
27. WHO. *Coastal and fresh waters. Guidelines for safe recreational water environment*. Geneva: World Health Organization; 2003.
28. Stewart I. *Recreational exposure to freshwater cyanobacteria: epidemiology, dermal toxicity and biological activity of cyanobacterial lipopolysaccharides*. Brisbane: University of Queensland; 2004.
29. Backer LC, Carmichael W, Kirkpatrick B, Williams C, Irvin M, Zhou Y, Johnson TB, Nierenberg K, Hill VR, Kieszak SM, Cheng Y-S. Recreational exposure to microcystins during a *Microcystis aeruginosa* bloom in a small lake. *Mar Drugs* 2008;6:389-406.
30. Backer LC, McNeel SV, Barber T, Kirkpatrick B, Williams C, Irvin M, Zhou Y, Johnson TB, Nierenberg K, Aubel M, LePrell L, Chapman A, Foss A, Corum S, Hill VR, Kieszak SM, Cheng Y-S. Recreational exposure to microcystins during algal blooms in two California lakes. *Toxicon* 2010;55:909-21.
31. Wood SA, Dietrich DR. Quantitative assessment of aerosolized cyanobacterial toxins at two New Zealand lakes. *J Environ Monit* 2011;13:1617-24.
32. Benson JM, Hutt JA, Rein K, Boggs SE, Barr EB, Fleming LE. The toxicity of microcystin LR in mice following 7 days of inhalation exposure. *Toxicon* 2005;45:691-8.
33. Hilborn ED, Roberts VA, Backer L, Deconno E, Egan JS, Hyde JB, Nicholas DC, Wiegert EJ, Billing LM., Diorio M, Mohr MC, Hardy JF, Wade TJ, Yoder JS, and Hlavsa MC. Algal bloom-associated disease outbreaks among users of freshwater lakes--United States, 2009-2010. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2014;63(1):11-5.
34. Lévesque B, Gervais M-C, Chevalier P, Gauvinb D, Anassour-Laouan-Sidi E, Gingras S, Fortind N, Brisson G, Greer C, Bird D. Prospective study of acute health effects in relation to exposure to cyanobacteria. *SciTotal Environ* 2014; 66-467:397-403.
35. Health Canada (HC). *Guidelines for Canadian recreational water quality. 3rd ed*. Ottawa, Ontario: Water, Air and Climate Change Bureau, Healthy Environments and Consumer Safety Branch, Health Canada; 2012.
36. Chorus I, Bartram J (Ed.). *Toxic cyanobacteria in water: a guide to their public health consequences, monitoring and management*. London, New York: E&FN Spon; 1999. (Published on behalf of WHO).

37. Jochimsen EM, Carmichael WW, An J, Cardo DM, Cookson ST, Holmes CEM, Antunes MB DeC, De Filho MDA, Lyra TM, Barreto VST, Avezedo SMFO, Jarvis WR. Liver failure and death after exposure to Microcystin at a hemodialysis center in Brazil. *N Engl J Med* 1998;338:873-8.
38. Soares RM, Yuan M, Servaites JC, Delgado A, Magalhães VF, Hilborn ED, Charmichael WW, Azevedo SMFO. Sub-lethal exposure from microcystins to renal insufficiency patients in Rio de Janeiro - Brazil. *Environ Toxicol* 2006;21:95-103.
39. Teixera MGLC., Costa MNC, Carvalho VLP, Pereira MS, Hage E. Gastroenteritis epidemic in the area of the Itaparica Dam, Bahia, Brazil. *Bull Pan Am Health Organ* 1993; 27:244-53.
40. Byth S. Palm Island mystery disease. *Med J Austr* 1980;2:40-2.
41. Hawkins PR, Griffiths DJ. Artificial destratification of a small tropical reservoir: effects upon the phytoplankton. *Hydrobiol* 1993;254:169-81.
42. Botes DP, Wessels PL, Kruger H, Runnegar MTC, Santikarn S, Smith RJ, Barna JCJ, Williams DH. Structural studies on cyanoginosins-LR, YR, YA, and -YM peptide toxins of *Microcystis aeruginosa*. *J Chem Society Perkin Trans* 1985;1:2742-8.
43. Falconer IR. Effects on human health of some toxic cyanobacteria (blue-green algae) in reservoirs, lakes and rivers. *Tox Assess* 1989;4:175-84.
44. Zielberg B. Gastroenteritis in Salisbury European children-a five year study. *Centr Afr J Med* 1996;12:164-8.
45. Ueno Y, Nagata S, Tsutsumi T, Hasegawa A, Watanabe MF, Park HD, Chen GC, Yu SH. Detection of microcystins, a blue-green algal hepatotoxin, in drinking water sampled in Haimen and Fusui, endemic areas of primary liver cancer in China, by highly sensitive immunoassay. *Carcinogen*1996;17:1317-21.
46. Fleming LE, Rivero C, Stephan WB, Burns J, Williams C. *Blue green algal exposure, drinking water and colorectal cancer study. The Florida Harmful Algal Bloom Taskforce Final Report*. St. Petersburg, Florida; 2001.
47. Fleming LE, Rivero C, Burns J, Williams C, Bean JA, Shea KA, Stinn J. Blue-green algal (Cyanobacterial) toxins, surface drinking water, and liver cancer in Florida. *Harm Algae* 2002;1:157-68.
48. IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Ingested nitrate and nitrite, and cyanobacterial peptide toxins. *IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum* 2010;94:v-vii, 1-412.
49. Svircev Z, Krstic S, Miladinov-Mikov M, Baltic V, Vidovic M. Freshwater cyanobacterial blooms and primary liver cancer epidemiological studies in Serbia. *J Environ Sci and Health, Part C* 2009;27:36-55.
50. Svircev Z, Drobac D, Tokodi N, Vidovic M, Simeunovic J, Miladinov-Mikov M, Baltic V. Epidemiology of primary liver cancer in Serbia and possible connection with cyanobacterial blooms. *J Environ Sci and Health, Part C: Environ Carcinogen Ecotoxicol Rev* 2013;31:181-200.
51. WHO. *Guidelines for drinking-water quality*. 3nd ed. Geneva: World Health Organization; 2008.
52. Orr PT, Jones GJ, Hunter RA, Berger K, De Paoli DA, Orr CLA. Ingestion of toxic *Microcystis aeruginosa* by dairy cattle and the implications for microcystin contamination of milk. *Toxicon* 2001;39:1847-54.
53. Feitz AJ, Lukondeh T, Moffitt MC, Burns BP, Naidoo D, Vedova JD, Golden JM, Neilan BA. Absence of detectable levels of cyanobacterial toxin (microcystin-LR) carry-over into milk. *Toxicon* 2002;40:1173-80.
54. Codd GA, Metcalf J, Beattie KA. Retention of *Microcystis aeruginosa* and microcystin by salad lettuce (Lactuca sativa) after spray irrigation with water containing cyanobacteria. *Toxicon* 1999;37:1181-6.

55. Chen J, Song L, Dai J, Gan N, Liu Z. Effects of micricystin on the growth nd the activity of superoxide dismutase and peroxidase of rape (*Brassica rapus* L.) and rice (*Oriza sativa* L.). *Toxicon* 2004;43:393-400.
56. Peuthert A, Chakrabarti S, Pflugmacher S. Uptake of microcystins-LR and-LF (cyanobacterial toxins) in seedlings of several important agricultural plant species and the correlation with cellular damage (lipid peroxidation). *Environ Toxicol* 2007;22:436-42.
57. Kittler K, Schreiner M, Krumbein A, Manzei S, Sascha R, Maul R. Uptake of the cyanobacterial toxin cylindrospermopsin in *Brassica* vegetables. *Food Chem* 2012;133:875-9.
58. Järvenpää S, Lundberg-Niinistö C, Spoof L, Sjövall O, Tyystjärvi E, Meriluoto J. Effects of microcystins on broccoli and mustard, and analysis of accumulated toxin by liquid chromatography-mass spectrometry. *Toxicon* 2007;49:865-74.
59. Food and Agriculture Organization. *The state of world fisheries and aquaculture*. Rome: FAO, Fisheries and Aquaculture Department; 2010.
60. Berry J. Cyanobacterial toxins in food-webs: implications for human and environmental health. *Current Topics in Public Health* 2013;536-89.
61. Ibelings BW, Bruning K, De Jonge J, Wolfstein K, Pires L, Postma J, Burger T. Distribution of microcystins in a lake foodweb: no evidence for biomagnification. *Microb Ecol* 2005;49:487-500.
62. Ibelings BW, Chorus I. Accumulation of cyanobacterial toxins in freshwater 'seafood' and its consequences for public health: A review. *Environ Pollut* 2007;150:177-92.
63. Kozlowsky-Suzuki B, Wilson AE, Ferrao-Filho A. Biomagnification or biodilution of microcystins in aquatic food-webs? Meta-analyses of laboratory and field studies. *Harm Algae* 2012;18:47-55.
64. Williams DE, Dawe SC, Kent ML, Andersen RJ, Craig M, Holmes CF. Bioaccumulation and clearance of microcystins from salt water mussels, *Mytilus edulis*, and in vivo evidence for covalently bound microcystins in mussel tissues. *Toxicon* 1997;35:1617-1625.
65. Williams DE, Craig M, McCready M, Dawe SC, Kent ML, Holmes CF, Andersen RJ. Evidence for covalently bound form of microcystin-LR in salmon liver and Dungeness crab larvae. *Chem Res Toxicol* 1997;10:463-9.
66. Hilborn ED, Carmichael WW, Soares RM, Yuan M, Servaites JC, Barton HA, Azevedo SMFO. Serologic evaluation of human microcystin exposure. *Environ Toxicol* 2007;22:459-63.
67. Smith JL, Schulz KL, Zimba PV, Boyer, G L. Possible mechanism for the foodweb transfer of covalently bound microcystins. *Ecotoxicol Environ Safety* 2010;73:757-761.
68. Morais J, Augusto M, Carvalho AP, Vale M, Vasconcelos VM. Cyanobacteria hepatotoxins, microcystins: bioavailability in contaminated mussels exposed to different environmental conditions. *Eur Food Res Technol* 2008;227:949-952.
69. Zhang D, Xie P, Chen J. Effects of temperature on the stability of microcystins in muscle of fish and its consequences for food safety. *Bull Environ Contam Toxicol* 2010;84:202-7.
70. Gutiérrez-Praena D, Jos A, Pichardo S, Moreno IM, Camean AM. Presence and bioaccumulation of microcystins and cylindrospermopsin in food and the effectiveness of some cooking techniques at decreasing their concentrations: A review. *Food Chem Toxicol* 2013;53:139-52.
71. Chen J, Xie P, Li L, Xu J. First identification of the hepatotoxic microcystins in the serum of a chronically exposed human population together with indication of hepatocellular damage. *Toxicol Sci* 2009;108:81-9.
72. Li Y, Chen J, Zhao Q, Pu C, Qiu Z, Zhang R, Shu W. A Cross-Sectional Investigation of chronic exposure to microcystin in relationship to childhood liver damage in the three Gorges Reservoir Region, China. *Environ Health Perspect* 2011;119:1483-8.

73. Food and Agriculture Organization of the United Nations/Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO/World Health Organization (Ed.). *Report of the Joint FAO/IOC/WHO ad hoc Expert Consultation on Biotoxins in Bivalve Molluscs.* Oslo, Norway, September 26-30, 2004.
74. EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain. Marine biotoxins in shellfish - Saxitoxin group *EFSA Journal* 2009;1019:1-76.
75. Charmichael WW, Drapeau C, Anderson DM. Harvesting of *Aphanizomenon flos-aquae* Ralfs ex Born. and Flah. var. *flos-aquae* (Cyanobacteria) from Klamath Lake for human dietary use. *J Appl Phycol* 2000;12:585-95.
76. Gilroy DJ, Kauffman KW, Hall RA, Huang X, Chu FS. Assessing potential health risks from microcystin toxins in bluegreen algae dietary. *Environ Health Perspect* 2000;108:435-9.
77. Saker ML, Jungblut A-D, Neilan BA, Rawn DFK, Vasconcelos VM. Detection of microcystin synthase genes in health food supplements containing the freshwater cyanobacterium *Aphanizomenon flos-aquae. Toxicon* 2005;46:555-62.
78. Dietrich D, Hoeger S. Guidance values for microcystins in water and cyanobacterial supplement products (blue green algal supplements): a reasonable or misguided approach? *Toxicol Appl Pharmacol* 2005;203:273-89.
79. Vichi S, Lavorini P, Funari E, Scardala S, Testai E. Contamination by Microcystis and microcystins of blue-green algae food supplements (BGAS) on the Italian market and possible risk for the exposed population. *Food Chem Toxicol* 2012;50:4493-9.
80. Jensen GS, Ginsberg DJ, Drapeau C. Blue-green algae as an immuno-enhancer and biomodulator. *JAMA* 2001;3:24-30.
81. Dietrich DR, Ernst B, De Koe WJ. Human consumer death and algal supplement consumption: a post mortem assessment of potential microcystin-intoxication via microcystin immunoistochemical (MC-ICH) analyses. In: *7th International Conference on Toxic Cyanobacteria (ICTC),* Brazil, August 5-12,2007. p. 132.
82. Cox PA, Banak SA, Murch SJ. Biomagnification of cyanobacterial neurotoxins and neurodegenerative disease among the Chamorro people of Guam. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:13380-3.
83. Cruz-Aguado R, Winkler D, Shaw CA. Lack of behavioral and neuropathological effects of dietary beta-methylamino-alanine (BMAA) in mice. *Pharmacol Biochem Behav* 2006; 84:294-9.
84. Ross SM, Seelig M, Spencer PS. Specific antagonism of excitotoxic action of 'uncommon' amino acids assayed in organotypic mouse cortical cultures. *Brain Res* 1987;425:120-127.
85. Chiò A, Benzi G, Dossena M, Mutani R, Mora G. Severely increased risk of amyotrophic lateral sclerosis among Italian professional football players. *Brain* 2005;128:472-6.
86. Stipa G, Taiuti R, de Scisciolo G, Arnetoli G, Tredici MR, Biondi N, Barsanti L, Lolli F. Sporadic amyotrophic lateral sclerosis as an infectious disease: a possible role of cyanobacteria? *Med Hypoth* 2006;67:1363-71.
87. Stefanelli M, Vichi S, Stipa G, Funari E, Testai E, Scardala S, Manganelli M. Survival, growth and toxicity of Microcystis aeruginosa PCC 7806 in experimental conditions mimicking some features of the human gastro-intestinal environment. *Chem Biol Interact* 2014;215:54-61.
88. Montine TJ, Li K, Perl DP, Galasko D. Lack of beta-methylamino-L-alanine in brain from controls, AD, or Chamorros with PDC. *Neurol* 2005; 65: 768-9.
89. Snyder LR, Cruz-Aguado R, Sadilek M, Galasko D, Shaw CA, Montine TJ. Lack of cerebral bmaa in human cerebral cortex. *Neurol* 2009;72:1360-1.
90. Murch SJ, Cox PA, Banack SA. A mechanism for slow release of biomagnified cyanobacterial neurotoxins and neurodegenerative disease in Guam. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;1:12228-31.

91. Pablo J, Banack SA, Cox PA, Papapetropoulos S, Bradley WG, Buck A, Mash DC. Cyanobacterial neurotoxin BMAA in ALS and Alzheimer's disease. *Acta Neurol Scand* 2009; 120:216-25.
92. Dunlop R, Rodgers K. Proteins containing BMAA form autofluorescent aggregates and induce cell death. *Amyotroph Lateral Scler.* 2011;12:156.
93. Dunlop RA, Cox PA, Banack SA, Rodgers KJ. The non-protein amino acid BMAA is misincorporated into human proteins in place of L-serine causing protein misfolding and aggregation. *PLoS ONE* 2013;8:1-8.
94. Torbick N, Hession S, Stommel E, Caller T. Mapping amyotrophic lateral sclerosis lake risk factors across northern New England. *Int J Health Geographics* 2014;13:1-14.
95. Caller TA, Doolin JW, Haney JF, Murby AJ, West KG, Farrar HE, Ball A, Harris BT, Stommel EW. A cluster of amyotrophic lateral sclerosis in New Hampshire: A possible role for toxic cyanobacteria blooms. *Amyotroph Lateral Scler.* 2009;10 (Suppl. 2):101-8.
96. Cox PA, Richer R, Metcalf JS, Banack SA, Codd GA, Bradley WG. Cyanobacteria and BMAA exposure from desert dust: a possible link to sporadic ALS among Gulf War veterans. *Amyotroph Lateral Scler* 2009;10(suppl 2):109-17.
97. van Apeldoorn ME, Van Egmond HP, Speijers GJA, Bakker GJI. Toxins of cyanobacteria. *Mol Nutr Food Res* 2007;51:7-60.
98. Jones GJ, Orr PT. Release and degradation of microcystin following algicide treatment of a *Microcystis aeruginosa* bloom in a recreational lake, as determined by HPLC and protein phosphatase inhibition assay. *Water Res* 1994;28:871-6.

A4. VALUTAZIONE DEL RISCHIO ASSOCIATO ALL'ESPOSIZIONE ALLE CIANOTOSSINE

EmanuelaTestai*, Enzo Funari
Dipartimento di Ambiente e Connessa Prevenzione Primaria, Istituto Superiore di Sanità, Roma
** emanuela.testai@iss.it*

A4.1. Introduzione

I dati disponibili sull'uomo mostrano che l'esposizione ad elevati livelli di alcune cianotossine è in grado di causare effetti anche gravi alla salute delle persone esposte (es. emodialisi, acque potabili, balneazione, integratori alimentari). Tuttavia, nel loro insieme, i dati sull'uomo sono molto carenti, certamente non sufficienti per una valutazione quantitativa del rischio associato all'esposizione alle cianotossine.

Queste carenze possono essere almeno in parte colmate utilizzando le conoscenze acquisite attraverso gli studi disponibili riguardanti le caratteristiche tossicologiche delle cianotossine.

Sulla base di queste conoscenze sono possibili le seguenti valutazioni del rischio, in relazione alle diverse tipologie di esposizione note alle cianotossine. Una esposizione cronica, vale a dire per una porzione considerevole del tempo di vita medio, può ragionevolmente avvenire attraverso il consumo di acqua potabile, ed eventualmente attraverso la dieta: la via di esposizione è quindi essenzialmente quella orale. Esposizioni molto prolungate potrebbero realizzarsi per residenti, che consumino prodotti locali provenienti da zone interessate da fioriture diverse nei diversi periodi dell'anno.

Alcuni scenari di esposizione umana comunque configurano rischi non necessariamente legati ad esposizioni croniche: ad esempio appare estremamente poco probabile che un individuo consumi pesce o integratori alimentari contaminati da cianotossine tutti i giorni della propria vita ed è molto più realistico ipotizzare che tale eventualità possa verificarsi per un periodo di tempo limitato ma discreto, ad esempio in relazione alla stagione di fioritura dei cianobatteri nel corpo idrico di interesse. Analogamente, nei Paesi a clima temperato, dove la stagione balneare è limitata ai 4-5 mesi più caldi dell'anno, può essere considerato subcronico il rischio associato alle attività ricreative in acque di balneazione. Anche per chi svolge attività sportive e/o professionali nei mesi più freddi in corpi idrici potenzialmente interessati da fioriture di cianobatteri, è importante tenere presente la stagionalità del fenomeno. I rischi di tipo subcronico possono avvenire per tutte e tre le vie di esposizione (orale, cutanea e inalatoria), anche contemporaneamente.

L'eventualità di avere situazioni di rischio acuto possono verificarsi quando il corpo idrico superficiale utilizzato per l'approvvigionamento idropotabile è interessato da fioriture di cianobatteri o da schiume, che contengono livelli particolarmente elevati di cianotossine, anche di decine di mg/L (Chorus & Bartram, 1999). In riferimento alla balneazione, lo svolgimento di attività ricreative in acque infestate da elevate densità di cianobatteri tossici (fioriture o schiume) come descritto nel capitolo 3 ha dato luogo ad effetti acuti e a breve termine anche gravi. Questo rischio, se si escludono situazione accidentali, non dovrebbe riguardare le persone adulte, non attratte da un corpo idrico interessato dalla presenza di fioriture o schiume, ma particolare attenzione deve essere usata con i bambini e gli adolescenti, vale a dire il gruppo di popolazione maggiormente colpito secondo Hilborn *et al.* (2014).

Se queste acque vengono usate anche per scopo potabile tal quali, le quantità di cianotossine presenti in un volume d'acqua ridotto, come quello di un comune bicchiere da tavola, possono essere sufficienti per causare effetti di tipo acuto. Ovviamente queste situazioni possono verificarsi solo se vengono utilizzate acque grezze non sottoposte a trattamenti di potabilizzazione; in caso di avarie al sistema di potabilizzazione; o a seguito dell'utilizzo di agenti di disinfezione che causano il rilascio di grandi quantità di cianotossine intracellulari non intercettate successivamente dal sistema di purificazione.

Relativamente alla dieta, il consumo di prodotti ittici e di integratori alimentari con elevati livelli di contaminazione potrebbe configurare una fonte di esposizione in grado di comportare un possibile rischio acuto. Infatti, nelle viscere di pesci (fegato e intestino) sono stati riportati livelli di microcistine (MC) piuttosto elevati e sebbene il consumo di viscere non rientri nelle comuni abitudini alimentari, esistono alcune specie che vengono consumate interamente, per cui il rischio di effetti acuti può essere elevato anche con consumi di una normale porzione (intorno ai 100-200 g).

A4.2. Rischio cronico

La valutazione del rischio cronico può essere effettuata derivando il valore di dose giornaliera accettabile o tollerabile per esposizioni a lungo termine (*Acceptable Daily Intake/Tolerable Daily Intake,* ADI/TDI), seguendo l'approccio utilizzato a livello internazionale da varie organizzazioni e seguito anche dall'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS).

Generalmente il valore di TDI si ottiene dal rapporto tra il NOAEL (*No Observed Adverse Effect Level*) per l'effetto tossicologicamente rilevante e una serie di fattori (*Uncertainty Factors*, UF; identificati anche come *Safety Factors* SF o *Assessment Factors*, AF) che tengano conto delle incertezze del dato sperimentale e dei possibili fattori di variabilità, utilizzando considerazioni di tipo conservativo per dare adeguati margini di sicurezza alla protezione della salute dell'uomo, secondo la formula:
TDI= NOAEL/UF .

Per nessuna tossina sono disponibili studi a lungo termine: una delle ragioni principali sta nella difficoltà di disporre di quantità sufficienti di cianotossine pure per i trattamenti previsti su un numero sufficiente di animali. Lavorare con gli estratti non sembra la soluzione più idonea, anche perché in molti casi gli estratti hanno mostrato un livello di tossicità maggiore rispetto alle ciano tossine pure, suggerendo che possano esserci altre componenti della cellula ciano batterica corresponsabili degli effetti o in grado di interagire con le cianotossine, aumentandone la tossicità (Falconer, 2007).

Il data-base più ricco di informazioni è sicuramente quello relativo ad un congenere delle MC, la MC-LR, l'unica tossina per la quale l'OMS ha ritenuto di poter derivare una TDI.

In assenza di uno studio di tossicità cronica, è stato considerato come valido il valore di NOAEL subcronico derivante dallo studio a 13 settimane sul topo, pari a 40 µg/kg peso corporeo pc/giorno (Fawell *et al.*, 1999a). La scelta di questo valore rappresenta un esempio di applicazione di un approccio conservativo; infatti il NOAEL è stato derivato da uno studio sul topo, che almeno rispetto agli effetti acuti della MC-LR si è dimostrato più sensibile rispetto al ratto; nello studio le dosi testate sono molto distanti e il LOAEL (*Lowest Observed Adverse Effect Level*) (dose immediatamente superiore al NOAEL) è 200 µg/kg pc/giorno con effetti molto leggeri e presenti solo in un numero limitato degli animali trattati, per cui il valore di NOAEL potrebbe essere verosimilmente più elevato di 40 µg/kg pc/giorno; infine la via di esposizione è il gavaggio piuttosto che la somministrazione attraverso la dieta. Quest'ultima

modalità di trattamento è stata utilizzata in un altro studio subcronico che ha fornito un NOAEL più alto (300 µg/kg pc/giorno), sulla base del fatto che il gavaggio introduce una dose 'bolo' nel tratto gastro-intestinale con il raggiungimento di dosi interne più elevate, mentre attraverso la dieta l'introduzione è graduale e i sistemi di detossificazione possono essere più efficienti.

Al valore del NOAEL si applica un fattore di incertezza di 1.000, calcolato moltiplicando 3 fattori pari a 10 che tengono conto:

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

Dall'applicazione dei suddetti fattori di sicurezza si ottiene la TDI per la MC-LR di 0,04 µg/kg pc/giorno (quindi 2,4 µg per un adulto di 60 kg di peso o 0,4 µg per un bambino di circa 10 kg). Questo vuol dire che una assunzione pari alla TDI ogni giorno per l'intero arco della vita non comporta un rischio sanitario apprezzabile.

La possibilità di esposizione cronica per l'uomo a MC è stata considerata anche dall'OMS (WHO, 2004): partendo dalla TDI relativa alla MC-LR di 0,04 µg/kg pc/giorno, è stato derivato, un valore guida (*Guidance Value*, GV) di 1 µg/L per la concentrazione della MC-LR, assumendo che l'assunzione attraverso l'acqua potabile rappresenti l'80% della assunzione totale (*Allocation Factor*, AF) e un consumo di 2 L di acqua/giorno per una persona di 60 kg di peso:

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

Non avendo a disposizione TDI relative agli altri congeneri, è stato proposto di estendere il GV al contenuto di MC totali (Chorus & Bartram, 1999), espresse come MC-LReq. Considerando che relativamente alla tossicità acuta la MC-LR è tra i congeneri più tossici, considerare il livello di cianotossine totali come equivalenti di MC-LR potrebbe rappresentare un approccio conservativo per la protezione della salute, ammettendo che anche per la tossicità ripetuta la MC-LR esprima il potenziale di tossicità più elevato. Purtroppo non sono disponibili dati a supporto di tale assunzione.

L'OMS non ha definito GV per altre cianotossine, ritenendo insufficienti le informazioni disponibili. Tuttavia partendo dai dati tossicologici e utilizzando lo stesso tipo di approccio sopradescritto per la MC-LR è possibile ricavare valori indicativi e del tutto provvisori sia per la anatossina-a (ATX-a) e per la cilindrospermopsina (CYN).

Nel caso della ATX-a, non è stato identificato un NOAEL per la tossicità subcronica, visto che anche le concentrazioni più alte somministrate agli animali (*range* 120-510 µg/kg pc/giorno) non hanno prodotto effetti tossici (Astrachan *et al.*, 1980). È però possibile considerare, molto conservativamente, che il valore più alto sia il NOAEL, per ricavare una TDI provvisoria di 0,51 µg/kg pc/g, e un GV di 12 µg/L (Duy *et al.*, 2000). In alternativa, Fawell *et al.* (1999b) ha proposto un GV=1 µg/L, basato su uno studio a 28 gg, nel quale, pur non avendo avuto sintomi e segni di tossicità negli animali, era stato registrato 1 decesso nei gruppi trattati con le dosi media e alta. Pur non avendo determinato la causa della morte, e quindi non poté essere definita una correlazione con il trattamento, il NOAEL è stato definito dagli autori uguale a 98 µg ATX pura/kg pc al giorno. Il GV è stato derivato ritenendo un fattore 10^3 come margine

di sicurezza adeguato per la protezione della salute di un bambino di 10 kg di peso che beve 1 L di acqua al giorno.

Relativamente alla CYN, dal valore di TDI=0,03 µg/kg pc/giorno, calcolata sulla base del NOAEL subcronico (Humpage & Falconer, 2003), e considerando una percentuale di assunzione attraverso l'acqua da bere del 90% (dovuta essenzialmente alla carenza di informazioni su una possibile esposizione attraverso cibi contaminati o altre fonti) si può ricavare un GV provvisorio= 0,81 µg/L, che può essere arrotondato a GV=1 µg/L (Codd *et al.*, 2005). In questo caso l'incertezza maggiore è legata alla identificazione di effetti genotossici indotti dai metaboliti della CYN, dimostrata in vitro su varie linee cellulari dotate di capacità metabolica. Non è chiaro se la genotossicità sia presente anche in vivo, tale da configurare una attività cancerogena, che al momento non è provata, ma non può essere esclusa.

Se la valutazione del rischio cronico attraverso l'acqua potabile può essere fatta considerando un consumo giornaliero 'standard' di acqua, la valutazione del rischio tossicologico associato al consumo cronico di cibi contaminati presenti nella dieta, i più probabili dei quali sono i prodotti ittici, è necessario disporre di stime rappresentative per il loro consumo, in modo da poter avere una stima attendibile della loro ingestione media. Si possono tuttavia assumere i consumi medi giornalieri utilizzati nelle valutazioni del rischio dalla *Food and Agriculture Organization* o dalla *European Food Safety Authority* (EFSA) per la dieta del nostro Paese e reperibili nei rispettivi siti web (www.fao.org/; www.efsa.europa.eu/it/).

In assenza di informazioni che permettano di stimare il potenziale di accumulo nelle diverse specie di prodotto ittico a partire dalla densità cellulare/concentrazione di tossina in acqua, è necessario quindi definire opportuni piani di monitoraggio, protratti per tempi sufficientemente lunghi. Inoltre, come descritto nel capitolo A3, per una corretta valutazione delle quantità di cianotossine ingerite attraverso il consumo di prodotti ittici e degli effetti relativi, sarebbe essenziale disporre di informazioni al momento non disponibili, relative alla biodiponibilità delle tossine nelle varie forme (libera, coniugata, associata alle proteine). Se, nel caso delle MC, i valori di assunzione non superano o eguagliano la TDI definita dall'OMS (0,04 µg/kg pc/giorno, corrispondenti a 2,4 µg/giorno per una persona adulta di 60 kg di peso corporeo), anche consumi protratti per l'intero arco della vita non comportano un rischio sanitario significativo.

A4.3. Rischio subcronico

Questa situazione nell'ambito della valutazione del rischio, si traduce nella derivazione di valori di riferimento identificati come DNEL (*Derived No Effect Level*) subcronico, USEPA *short term Health Advisory* (HA) per proteggere la salute di popolazioni che siano esposti per un periodo limitato della propria vita o dose acuta di riferimento (*Acute Reference Dose*, ARfD), quest'ultima definita nell'ambito di prodotti fitosanitari allo scopo di proteggere gruppi di popolazione che consumino elevati livelli di una derrata contenente residui di sostanze dotate di una elevata tossicità acuta, soprattutto se si tratti di neurotossicità, come nel caso delle cianotossine.

Tali valori limite sono calcolati sulla base del NOAEL subacuto/subcronico, al quale vengono applicati gli UF. Per la MC-LR un UF=100, che copra le differenze inter- e intra-specifiche è considerato sufficiente; il risultato è valore limite di 0,4 µg/kg al giorno, corrispondente a 24 µg/persona al giorno per un adulto di 60 kg. Anche in questo caso non sono disponibili dati sugli altri congeneri delle MC.

A4.4. Rischio acuto

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

A4.5. Linee guida dell'OMS per le acque di balneazione

L'OMS nel 2003 ha definito linee guida per prevenire il rischio di irritazioni cutanee e effetti sistemici sulla base degli studi tossicologici ed epidemiologici allora disponibili sulle microcistine (WHO, 2003). Gran parte delle conclusioni relativi agli effetti topici sono basate su uno studio prospettico (Pilotto *et al.*, 1997), che è stato successivamente molto criticato per le sue limitazioni (*vedi* capitolo A3.2). E, in effetti, nonostante lo studio riportasse la comparsa di deboli effetti irritativi ad una densità cianobatterica di 5.000 cell/mL, l'OMS ha concluso che visto il numero esigui di casi e la natura degli effetti riportati (deboli e reversibili in tempi molto brevi) non sono necesarie azioni in una tale situazione.

Le linee guida prevedono altresì come primo valore soglia una densità cianobatterica di 20.000 cell/mL, protettiva nei confronti dell'insorgenza di fenomeni di tipo irritativo, e corrispondente ad una probabilità bassa di avere effetti avversi di tipo sistemico.

A tale densità, infatti, se sono dominanti cianobatteri produttori di MC, si può ipotizzare un contenuto di 2-4 µg di MC per litro d'acqua, che potrebbe arrivare fino a 8 µg/L nel caso di presenza di alcuni cianobatteri caratterizzati da un contentuo intracellulare di MC più elevato (*Planktothrix rubescens*:0,4 pg MC/cell). Nel caso del nuoto con immersione del capo, l'OMS usa come riferimento cautelativo la possibilità di ingestione di un volume di 100 mL di acqua per sessione di nuoto e assume che si possano svolgere due attività al giorno, corrispondenti dunque ad un volume totale ingerito di 200 mL. Dunque l'ingestione di un volume di 200 mL di acqua comporterebbe un'assunzione fino ad 1,6 µg MC/giorno, un valore inferiore a tutti i valori di riferimento per i vari scenari di rischio, inclusa la TDI (riferita ad una esposizione cronica e quindi poco plausibile ed estremamente conservativa).

L'OMS ha definito un secondo valore guida ad una densità di 100.000 cell/mL: l'intervallo tra 20.000 e 100.000 cell/mL corrisponde ad una probabilità moderata di effetti avversi irritativi;

al di sopra delle 100.000 cell/mL esiste anche la possibilità di avere effetti sistemici per ingestione. Infatti in presenza di 100.000 cell/mL, quando *Microcystis* spp. sono dominanti (0,2 pg/cell), si possono avere fino a 20 µg di MC in un litro d'acqua e circa il doppio in caso di dominanza di *P. rubescens*. L'ingestione di 200 mL in una giornata di attività balneare corrisponderebbe quindi ad un intake di 4-8 µg/giorno, superiore alla TDI e quindi in grado di rappresentare un rischio cronico. Tuttavia, come discusso in precedenza, le attività balneari sono meglio rappresentate da uno scenario espositivo di tipo subcronico se non acuto e l'assunzione calcolata dall'OMS non comporta una situazione di rischio acuto e nemmeno il superamento dei limiti sopra definiti per esposizioni subcroniche. Infatti, il DNEL subcronico per la MC-LR di 0,4 µg/kg al giorno, corrisponde a 24 µg/persona al giorno per un adulto di 60 kg.

Per un bambino di 10-15 kg di peso (corrispondenti a circa un anno di età), l'assunzione per ingestione di 100 mL di acqua (un volume ritenuto appropriato per l'età) sarebbe di 2-4 µg al giorno, vicino al DNEL subcronico (4-6 µg/bambino al giorno). È necessario quindi che i bambini siano controllati per evitare l'ingestione involontaria di elevati livelli di cianotossine, soprattutto derivanti da ingestione di schiume.

In ogni modo a queste densità di cianobatteri devono essere allestite tutte le attività di sorveglianza e di informazione ai cittadini in modo da prevenire esposizioni inaccettabili.

Bibliografia

Astrachan NB, Archer BG, Hilbelink DR. Evaluation of the sub-acute toxicity and teratogenicity of anatoxin-a. *Toxicon* 1980;18:684-8.

Chorus I, Bartram J (Ed.). *Toxic cyanobacteria in water: a guide to their public health consequences, monitoring and management*. London, New York: E&FN Spon; 1999. (Published on behalf of WHO).

Codd GA, Morrison LF, Metcalf JS. Cyanobacterial toxins: risk management for health protection. *Toxicol Appl Pharmacol* 2005;203:264-72.

Dietrich D, Hoeger S. Guidance values for microcystins in water and cyanobacterial supplement products (blue green algal supplements): a reasonable or misguided approach? *Toxicol Appl Pharmacol* 2005;203:273-89.

Duy TN, Lam PKS, Shaw GR, Connell DW. Toxicology and risk assessment of freshwater cyanobacterial (blue-green algal) toxins in water. *Rev Environ Contam Toxicol* 2000;163:113-86.

Falconer IR. Cyanobacterial toxins present in *Mycrocystis aeruginosa* extracts—More than microcystins! *Toxicon* 2007;50:585-8.

Fawell JK, Mitchell RE, Everett DJ, Hill RE. The toxicity of cyanobacterial toxins in the mouse: I Microcystin-LR. *Human Exp Toxicol* 1999a;18:162-7.

Fawell JK, Mitchell RE, Hill R., Everett DJ. The toxicity of cyanobacterial toxins in the mouse: II Anatoxin-a. *Human Exp Toxicol* 1999b;18:168-73.

Fromme H, Koehler A, Krause R, Fuehrling D. Occurrence of cyanobacterial toxins—microcystins and anatoxin-a—in Berlin water bodies with implications to human health and regulation. *Environ Toxicol* 2000;15:120-30.

Hilborn ED, Roberts VA, Backer L, Deconno E, Egan JS, Hyde JB, Nicholas DC, Wiegert EJ, Billing LM., Diorio M, Mohr MC, Hardy JF, Wade TJ, Yoder JS, Hlavsa MC; Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Algal bloom-associated disease outbreaks among users of freshwater lakes--United States, 2009-2010. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2014;63(1):11-5.

Humpage AR, Falconer IR. Oral toxicity of the cyanobacterial toxin cylindrospermopsin in male Swiss Albino mice: determination of No Observed Adverse Effect level for deriving a Drinking Water Guideline Value. *Environ Toxicol* 2003;18:94-103.

Pilotto LS, Douglas RM, Burch MD, Cameron S, Beers M, Rouch GJ, Robinson P, Kirk M, Cowie CT, Hardiman S, Moore C, Attewell RG. Health effects of exposure to cyanobacteria (blue-gree algae) during recreational water-related activities. *Aust NZ J Public Health* 1997;21:562-6.

WHO. *Guidelines for Drinking-water quality, 3rd Ed., Volume 1, Recommendations*. Geneva: World Health Organization; 2004.

WHO. *Guidelines for safe recreational water environment*. *Volume 1, Coastal and fresh waters*. Geneva: World Health Organization; 2003.

A5. PROFILI DELLE ACQUE DI BALNEAZIONE NELLA GESTIONE DELLE FIORITURE DI CIANOBATTERI

Roberta De Angelis (a)*, Massimo Scopelliti (b)
(a) Dipartimento Tutela delle acque interne e marine, Istituto Superiore per la Protezione e la Ricerca Ambientale, Roma
(b) Direzione Generale per la tutela del territorio e delle risorse idriche - Div. III, Ministero dell'Ambiente e della Tutela del Territorio e del Mare, Roma
** roberta.deangelis@isprambiente.it*

A5.1. Introduzione

Con la direttiva 2006/7/CE (Europa, 2006) è stato introdotto un nuovo sistema di controllo e di gestione della qualità delle acque di balneazione, basato su un'attività di monitoraggio e su una valutazione ambientale volta alla prevenzione del rischio connesso alle pressioni presenti nell'ambiente. A tal fine, viene introdotto un nuovo strumento di valutazione e gestione definito "profilo dell'acqua di balneazione", recepito nell'allegato E del decreto del Ministero della salute 30 marzo 2010 (Ministero della Salute, 2010). Il profilo rappresenta il risultato di un'analisi territoriale, condotta a livello di bacino idrografico, volta ad individuare tutti i possibili fattori di rischio per l'ambiente e conseguentemente per la salute umana con l'obbiettivo di prevenirne o attenuarne gli effetti.

La redazione dei singoli profili prevede un approccio multidisciplinare, in linea con la concezione olistica di protezione dell'intero corpo idrico, introdotta dalla direttiva quadro in materia di acque (Europa, 2000). Tale direttiva, infatti, definisce l'inquinamento come:

> "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 degli ecosistemi terrestri che dipendono direttamente da ecosistemi acquatici, perturbando, deturpando o deteriorando i valori ricreativi o altri usi legittimi dell'ambiente".

Pertanto, l'obiettivo principale a perseguire è il raggiungimento del "buono" stato ambientale al fine di tutelare la salute umana, le risorse idriche, gli ecosistemi naturali e la biodiversità. A tale scopo è necessario procedere all'esame delle caratteristiche del bacino idrografico, con particolare riferimento alle pressioni e agli impatti, anche potenziali, cui esso è esposto e prevedere risposte adeguate quali una riduzione dei carichi inquinanti e l'individuazione e implementazione di soluzioni per risanare l'ambiente acquatico.

In tal senso, la direttiva balneazione richiama tale attività conoscitiva mediante l'utilizzo del profilo. In particolare, delle varie sezioni che lo compongono, la sezione 3 del profilo riveste un ruolo fondamentale, identificando l'"area di influenza" quale unità fondamentale di studio delle caratteristiche ambientali e delle connessioni con le attività antropiche che potrebbero condizionare in maniera diretta o indiretta la qualità di un acqua di balneazione. Lo studio dell'area d'influenza rappresenta, quindi, una sorta di modello concettuale costituito da tutta la rete di complesse relazioni e processi che si svolgono all'interno dell'area stessa con conseguente impatto sull'acqua di balneazione. In Figura A5.1 è riportata una rappresentazione semplificata dei principali fattori ambientali e antropici individuabili in uno studio dell'area d'influenza.

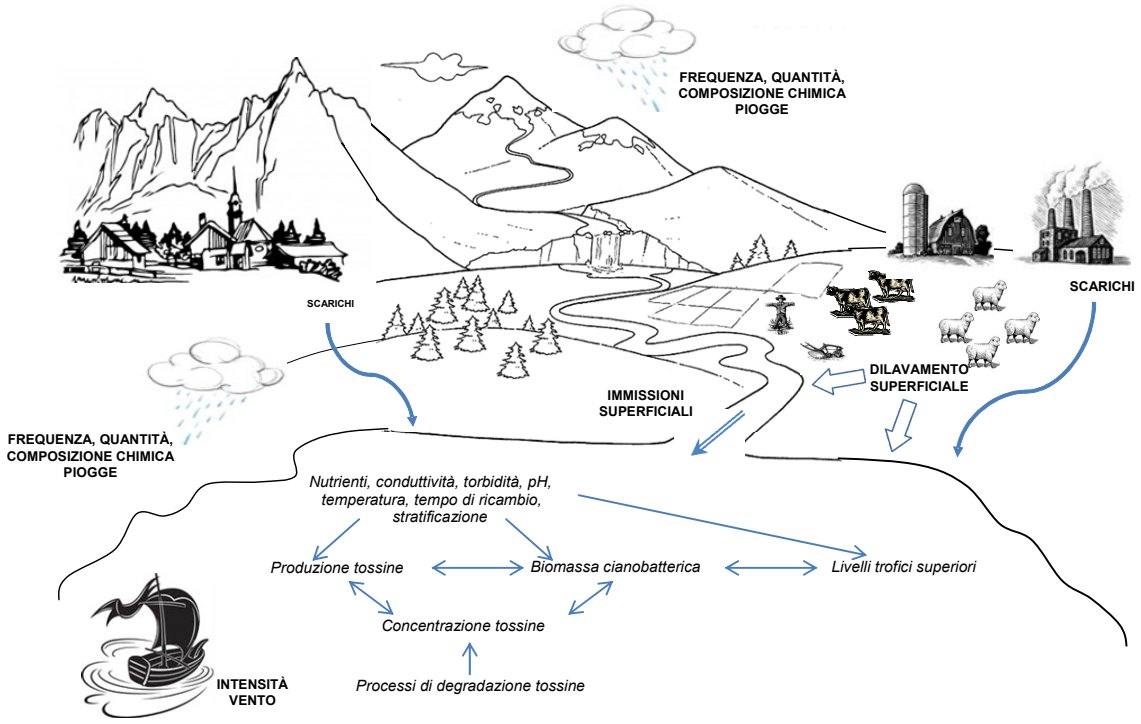


Figura A5.1. Rappresentazione schematica di uno studio dell'area di influenza con i principali fattori ambientali ed antropici che insistono sul bacino di interesse

Questa area, geograficamente, coincide con il bacino drenante, o una sua porzione, connesso con l'acqua di balneazione, in cui la presenza di fonti di inquinamento diffuse o puntuali potrebbero incidere sulla qualità dell'acqua. Sono considerate fonti puntuali i sistemi di trattamento dei reflui, gli scaricatori di emergenza della rete delle acque nere, gli sfioratori di piena delle reti miste, gli scarichi delle reti di acque bianche e gli scarichi diretti da impianti industriali. Queste sono considerate le maggiori fonti di contaminazione microbiologica per le acque di balneazione. Per questo motivo, nel profilo ne deve essere fatta una descrizione, contenente il numero, la localizzazione, la tipologia, le caratteristiche associate e il tipo di scarico predominante.

Le principali fonti diffuse sono correlate ad una serie di attività antropiche connesse principalmente all'uso del suolo. Ne è un esempio la pratica intensiva dell'agricoltura che, in condizioni meteo-climatiche avverse, può incidere negativamente sulla qualità delle acque a causa degli intensi apporti di inquinanti di natura microbiologica e chimica (es. nutrienti) veicolati dal dilavamento del terreno. Infatti, sotto l'azione delle precipitazioni intense i nutrienti vengono mobilizzati dal terreno e riversati in acqua (Paerl *et al.*, 2006; King *et al.*, 2007). Per questo motivo, le informazioni sull'uso del suolo e sull'idrologia del corpo idrico sono parte integrante di questa analisi. Per quel che riguarda le informazioni sull'uso del suolo, risulta molto utile il progetto CORINE (*Coordination of Information on the Environment*) Land Cover (Bossard *et al.*, 2000). Questo progetto è nato a livello europeo specificamente per il rilevamento e il monitoraggio delle caratteristiche di copertura e uso del territorio, con particolare attenzione alle esigenze di tutela ambientale.

Un altro aspetto da non sottovalutare è quello di indicare altri corpi idrici presenti nel bacino che potrebbero essere fonte di contaminazione per l'acqua di balneazione. Perciò è necessario riportare una breve descrizione sul corrente stato ecologico e chimico del corpo idrico, così come determinato ai sensi della direttiva 2000/60/CE (Europa, 2000) e, in caso di status "scarso", è necessario indicare le motivazioni di tale classificazione.

L'insieme di queste informazioni costituisce uno strumento importante per l'individuazione di strategie di gestione e recupero, oltre che per una più corretta valutazione del rischio igienico-sanitario, indipendentemente dalla classificazione. Infatti, in alcuni casi, acque classificate come eccellenti sono risultate essere comunque soggette ad eventi di inquinamento, che durante la stagione balneare hanno richiesto l'applicazione di un divieto di balneazione. In questi casi, oltre che comportare un potenziale danno all'ambiente acquatico e un rischio sanitario per il bagnante, si ha anche una perdita di fruibilità della risorsa con conseguente danno economico.

In termini pratici, per una efficace valutazione ambientale e una corretta informazione dei cittadini è utile riportare tutte le caratteristiche dell'area d'influenza anche su mappa, avendo cura di indicare, in particolare, i limiti della stessa, la localizzazione delle principali fonti d'inquinamento nonché informazioni sugli scarichi delle acque reflue.

A5.2. Individuazione del potenziale di proliferazione cianobatterica nel profilo dell'acqua di balneazione

L'insieme delle informazioni presenti sul profilo, con particolare attenzione a quelle desunte dallo studio dell'area di influenza, deve consentire di individuare i rischi presunti o accertati per la salute umana anche in relazione al rischio di proliferazione cianobatterica.

All'interno della descrizione del profilo, infatti, è presente una sezione (sezione 4; Europa, 2006) in cui riportare informazioni circa le criticità, accertate o potenziali, che potrebbero compromettere la fruibilità di un'acqua di balneazione. Vi è compresa anche una sottosezione specifica (sottosezione 4.4) per la valutazione del potenziale rischio da proliferazione cianobatterica, come previso all'art. 11 (*Rischi da cianobatteri*) del DL.vo 116/2008 (Italia, 2008), recepimento italiano della Direttiva europea 2006/7/CE (Europa, 2006). Sebbene le conoscenze sulle cause che innescano una fioritura o che determinano la prevalenza di specie a potenziale tossico siano in continua evoluzione, ai fini di un inquadramento generale della problematica, rimane fondamentale l'identificazione delle pressioni nell'ambito dello studio dell'area d'influenza. È necessaria poi un'analisi preliminare dei dati storici sulle fioriture pregresse che hanno interessato l'acqua, considerando la specie responsabile, le densità, nonché il numero e la descrizione degli eventi che si sono verificati per ogni stagione balneare.

In seguito, su tale base, è importante eseguire una caratterizzazione dell'evento, descrivendo e sottolineando le relative cause, anche se presunte, e le condizioni al contorno, quali ad esempio apporto di nutrienti, variazioni della temperatura, condizioni meteo-climatiche, informazioni sull'idrologia ecc, che lo hanno caratterizzato. Ci sono, infatti, evidenze scientifiche di come, attraverso un'azione sinergica tra l'aumento dell'apporto di nutrienti, derivanti da attività antropiche perlopiù connesse all'uso del suolo, e la modificazione di alcune variabili climatiche, venga favorita l'espansione di alcune specie di cianobatteri capaci di meglio adattarsi alle mutate condizioni dell'ambiente acquatico (Kosten *et al.*, 2011).

Pur non essendo attualmente possibile identificare un nesso causale definito tra cambiamenti climatici e insorgenza di fioriture, tuttavia ci sono evidenze convergenti delle relazioni intercorrenti tra i due fenomeni. Infatti, le possibili cause dei blooms possono essere di natura biotica e abiotica, a seconda delle diverse specie all'interno della comunità, e sono generalmente

sito specifiche. Quel che appare chiaro, comunque, è che le variazioni, in termini di intensità e frequenza, nelle precipitazioni (lunghi periodi di siccità seguiti da precipitazioni di breve durata ma molto intense), uniti alle caratteristiche idrologiche e all'uso del suolo, determinano dei cambiamenti dei parametri acquatici (temperatura, salinità, nutrienti, intensità luminosa) che a loro volta modificano lo stato trofico del corpo idrico, influendo sullo sviluppo dei cianobatteri (Shaw *et al.*, 2001). In alcuni casi, i processi di eutrofizzazione favoriscono lo sviluppo della biomassa dei cianobatteri rispetto alle altre specie fitoplantoniche a causa della loro maggiore affinità per alcuni nutrienti (Chorus & Bartram, 1999) e per la loro capacità di meglio regolare il livello galleggiamento potendo cosi sfruttare un più ampio range di risorse (luce, carbonio inorganico e nutrienti) (Paerl *et al.*, 2011; Wagner & Adrian, 2009). In Figura 1 si riporta un modello concettuale delle principali vie di deflusso dell'acqua in un lago durante e dopo eventi di pioggia, e dei parametri fisico-chimici e biologici che possono esserene influenzati, con conseguente innesco di blooms e produzione di tossine (Reichwaldt, 2011). Tale modello viene presentato a titolo esemplificativo per riepilogare i fattori e le interazioni di cui tenere conto nella valutazione del potenziale di proliferazione cianobatterica.

Risulta evidente l'importanza delle attività praticate nell'area d'influenza, in quanto determinano la qualità degli imput diretti e indiretti che vanno ad influire, a loro volta, sulla qualità dell'acqua. Inoltre, rivestono un ruolo fondamentale la quantità delle piogge, la durata dei periodi di siccità precedenti le piogge, l'idrologia e le dimensioni del lago e del bacino drenante. Eventi di forte pioggia possono portare a fenomeni di erosione del sedimento con conseguente rilascio di nutrienti. Infine, non appare meno importante il ruolo giocato dalla composizione chimica delle piogge che può essere valutata solo su scala regionale, poichè riflette le emissioni antropogeniche locali, e stagionale (Lara *et al.*, 2010).

Infine, ma non per importanza, l'insieme di tutti i dati raccolti dalla caratterizzazione dell'evento e dallo studio dell'area d'influenza, deve facilitare gli amministratori dell'acqua di balneazione a stimare le probabilità che l'evento possa ripetersi in futuro. Tale considerazione può essere fatta o attraverso un approccio basato su giudizio esperto, riferito principalmente ai dati storici, o mediante l'utilizzo di modelli matematici previsionali. A tal proposito, come riportato nel capitolo A6, sono stati sviluppati una varietà di modelli per affrontare la relazione pressioni/risposte e per valutare l'efficacia delle misure di risanamento o analizzare gli effetti dei cambiamenti climatici nello stato ecologico e nei processi di recupero di un'acqua.

A5.3. Conclusioni

Il profilo, fornendo un quadro ambientale del territorio cui un'acqua di balneazione appartiene, consente agli amministratori di quell'acqua, di individuare tempestivamente un potenziale rischio per la salute umana e mettere in atto le adeguate misure di gestione.

Nella redazione del profilo il passaggio determinante è l'individuazione e lo studio dell'area d'influenza al fine di individuare le pressioni e gli eventuali impatti in relazione al contesto territoriale e meteo-climatico di tutta l'area. Inoltre, lo studio dell'area d'influenza fornisce informazioni importanti per attuare opportune misure di gestione in caso si verifichino delle criticità, che potrebbero compromettere la balneabilità di un'acqua. Inoltre, per la natura preventiva del profilo è possibile in molti casi stimare la probabilità che l'evento possa verificarsi nelle stagioni balneari successive.

Tuttavia, considerato che ad oggi non sono chiare le cause e i fattori responsabili di alcune forme di inquinamento, la stima della probabilità che l'evento possa ripetersi nel tempo può basarsi sui dati degli eventi pregressi, oppure sull'utilizzo di modelli matematici previsionali.

L'utilizzo dei modelli risulta molto utile anche per conoscere l'eventuale estensione e durata dell'inquinamento, informazioni queste molto importanti per i bagnanti. Questi ultimi attraverso il profilo dovrebbero essere tempestivamente informati sui rischi che potrebbero incontrare immergendosi in un'acqua di balneazione in determinate condizioni.

Il profilo delle acque di balneazione, pertanto, rappresenta la congiunzione tra l'individuazione e valutazione tempestiva dei rischi per la salute umana, non solo di natura batteriologica e le determinanti ambientali connesse.

Bibliografia

Bossard M, Feranec J, Otahel J. *CORINE land cover technical guide – Addendum 2000.* Copenhagen; European Environment Agency, 2000. (Technical report No 40).

Chorus I, Bartram J (Ed.). *Toxic cyanobacteria in water: a guide to their public health consequences, monitoring and management*. London, New York: E&FN Spon; 1999. (Published on behalf of WHO).

Europa. Direttiva 2000/60/CE del Parlamento Europeo e del Consiglio del 22 ottbre 2000 che istituisce un quadro per l'azione comunitaria in materia di acque. *Gazzetta Ufficiale delle Comunità europee* n. L 327/1 del 22 dicembre 2000.

Europa. Direttiva 2006/7/CE del Parlamento Europeo e del Consiglio del 15 febbraio 2006 relativa alla gestione della qualità delle acque di balneazione e abrogazione della diretiva 76/160/CEE. *Gazzetta Ufficiale delle Comunità europee* n. L 64/42, del 4 marzo 2006.

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 – Serie Generale* n. 155, del 4 luglio 2008.

King KW, Balogh JC, Harmel RD. Nutrient flux in storm water runoff and baseflow from managed turf. *Environmental Pollution* 2007;150:321-8.

Kosten S, Huszar V, Becares E, Costa L, van Donk E, Hansson LA, Jeppessn E, Kruk C, Lacerot G, Mazzeo N, De Meester L, Moss B, Lurling M, Noges T, Romo S, Scheffer M. Warmer climate boosts cyanobacterial dominance in shallow lakes. *Global Change Biology* 2011;18(1):118-26.

Lara ER, Guardiola RM, Vasquez YG, Renteria IB, Alvarez HB, Echeverria RS, Alvarez PS, Jimenez AA, Torres MC, Kahl J. Chemical composition of rainwater in northeastern Mexico. *Atmosfera* 2010;23(3):213-24.

Magnuson JJ, Webster KE, Assel RA, Bowser CJ, Dillon PJ, Eaton JG, Evans HE, Fee EJ, Hall RI, Mortsch LR, Schindler DW, Quinn FH. Potential effects of climate changes on aquatic systems: laurentian great lakes and precambrian shield region. *Hydrological Processes* 1997;11(8):825-71.

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 - Serie Generale* n. 119, del 24 maggio 2010.

Paerl HW, Hall NS, Calandrino ES. Controlling harmful cyanobacterial blooms in a world experiencing anthropogenic and climatic-induced change. *Science of total Environment* 2011;409(10):1739-45.

Paerl HW, Valdes LM, Joyner AR, Peierls BL, Buzzelli CP, Piehler MF, Riggs SR, Christian RR, Ramus JS, Clesceri EJ, Eby LA, Crode LW, Luettich RA. Ecological response to hurrican events in the Pamlico Sound System, NC and implications for assessment and management in a regime of increate frequency. *Estuaries and Coast* 2006; 29: 1033-45.

Reichwaldt ES, Ghadouani A. Effects of rainfall patterns on toxic cyanobacterial blooms in a changing climate: Between simplicistic scenarios and complex dynamics. *Water research* 2012;46:1372-92.

Reichwaldt ES, Zheng L, Barrington DJ, Ghadouani A. Acute toxicological response of *Dafnia* and *Moina* to hydrogen peroxide. *Journal of Environmental Engineering* 2011;138(5):607-11.

Shaw G, Garnet C, Moore MR, Florian P. The predicted impact of climate change on toxical algal (Cyanobacterial) bloom and toxin production in Qeensland. *Environmental Healt* 2001;1(4).

Wagner C, Adrian R. Cyanobacteria dominance: quantifying the effects of climate change. *Limnology and Oceanography* 2009;54(6/2):2460-8.

A6. MODELLI MATEMATICI PER LA PREVISIONE DELLE FIORITURE DI CIANOBATTERI

Antonello Bruschi*, Maria Luisa Cassese, Francesco Lalli, Valeria Pesarino
Dipartimento Tutela delle Acque Interne e Marine, Istituto Superiore per la Protezione e la Ricerca Ambientale, Roma
**antonello.bruschi@isprambiente.it*

A6.1. Introduzione

Il capitolo fornisce una panoramica sullo stato dell'arte della modellistica matematica relativa alla previsione dell'evoluzione della biomassa di cianobatteri in un corpo idrico. Vengono analizzate nel dettaglio le tre diverse tipologie di modelli più utilizzati per questa tematica in ambito scientifico: modelli di regressione, reti neurali artificiali e modelli numerici. Ogni tipologia viene descritta nelle sue basi teoriche al fine di evidenziarne pregi e limiti in ambiti applicativi.

A6.2. Modelli matematici per la previsione delle fioriture di cianobatteri

La possibilità di prevedere quando e con quale dinamica si verificherà una fioritura di cianobatteri, sapere in anticipo quali possano essere le località più impattate e con quali concentrazioni, permette di ottimizzare le misure di gestione per prevenire o mitigare gli effetti di un bloom. Per dare risposta a tale necessità, sono state eseguite a livello mondiale diverse ricerche basate sull'utilizzo di modelli matematici. Le soluzioni elaborate possono essere divise in tre filoni: i modelli di regressione, l'utilizzo di reti neurali artificiali e la modellistica numerica per la soluzione di equazioni differenziali. La scelta di trattare esplicitamente solo queste tre tipologie di modelli matematici è dovuta alla quantità di informazioni disponibili correlata al numero di citazioni nelle pubblicazioni scientifiche. Vi sono ad esempio anche modelli basati sulla logica fuzzy, ma le informazioni sono ancora troppo limitate per poter produrre una robusta trattazione.

Relativamente all'uso della modellistica nella valutazione dello 'stato' dell'acqua di un corpo idrico è particolarmente rilevante il progetto WISER (*Water bodies in Europe - Integrative Systems to assess Ecological status and Recovery*, www.wiser.eu), finanziato nell'ambito del Settimo Programma Quadro della Commissione Europea. Il Progetto ha come obiettivo principale quello di supportare l'implementazione della Direttiva Quadro sulle Acque (*Water Framework Directive*) tramite lo sviluppo di strumenti per la valutazione integrata dello stato ecologico di fiumi, laghi e acque costiere. Nello specifico il rapporto tecnico "Deliverable D5.2-3: Guidelines on the use of different modelling approaches for designing Program of Measures" (Duel *et al.*, 2012), contiene delle linee guida agli approcci di modellistica matematica e dei diversi prodotti disponibili, con indicazioni sulla loro corretta applicazione utili anche per la tematica affrontata in questo contributo.

A6.2.1. Modelli di regressione

I modelli di regressione sono basati sull'idea che si possa desumere il valore di una data variabile (detta variabile dipendente) in funzione di un'altra o di altre (dette variabili indipendenti), selezionando tra un insieme scelto di relazioni funzionali, quella che meglio approssima la relazione di dipendenza tra le variabili scelte. Si ipotizza, sulla base delle conoscenza pregresse, che sussista un predefinito legame funzionale tra le variabili, lasciando però che tale legame possa dipendere da alcuni parametri numerici interni. Il valore che assumono tali parametri è scelto valutando su un predefinito set di dati che contenga sia il valore della variabile dipendente che i corrispondenti valori delle variabili indipendenti selezionate, quello che rende minimo l'errore tra i valori nel dataset della variabile dipendente e quelli ottenuti stimandola tramite il legame funzionale con le variabili indipendenti facendo variare i parametri numerici.

I modelli di regressione più utilizzati sono quelli che fanno riferimento o prendono spunto dai lavori pubblicati da Vollenweider tra il 1969 e il 1976 (Chorus & Bartram, 1999; WQRA, 2009). In tali articoli vengono esposti e successivamente sviluppati dei metodi per la stima della concentrazione di fosforo totale e di clorofilla-a (Chl a), quantità utilizzate come indicatori di un possibile bloom di cianobatteri, presenti in un lago (Vollenweider, 1976) (Tabella A6.1).

Tabella A6.1. Formule per la valutazione della concentrazione di fosforo totale e di Chl a proposte da Vollenweider

Formula	Definizioni	
$\overline{[P]}_\lambda = \left({L_P}/{q_s}\right) \cdot \left(\dfrac{1}{1+\sqrt{{\bar{z}}/{q_s}}}\right)$	$\overline{[P]}_\lambda$	concentrazione media di fosforo totale lungo la colonna d'acqua nell'ipotesi di mescolamento completo in g/m^3
$\overline{[Chl.a]} = 0.367\left(\dfrac{L_P}{q_s\left(1+\sqrt{{\bar{z}}/{q_s}}\right)}\right)^{0.91}$	$\overline{[Chl.a]}$	concentrazione media di clorofilla-a lungo la colonna d'acqua nell'ipotesi di mescolamento completo in g/m^3
	L_P	carico di fosforo entrante per unità di area (ottenuto dividendo il carico totale di fosforo entrante nel lago per la sua area) in g/m^2 anno
	q_s	carico idraulico annuo, ottenuto dividendo la quantità di acqua entrante nel lago per la sua superifice, in m/anno
	$\bar{z}$	profondità media del lago in metri

Il pregio principale di tali formule (Tabella A6.1) è che sono state volutamente sviluppate prendendo in considerazione delle grandezze che spesso vengono incluse nei programmi di monitoraggio. Le principali criticità sono le seguenti. Per prima cosa sia la concentrazione di fosforo, che quella di Chl a non sono direttamente e univocamente legate alla presenza di un alto numero di cianobatteri. In generale la quantità di fosforo presente è uno dei fattori limitanti (spesso il principale) che influenzano la quantità massima di fitoplancton che può essere presente nel corpo idrico. Ciò non è però direttamente collegato alla presenza di grandi quantità di cianobatteri, ma è un indice di quale potrebbe essere la biomassa massima di cianobatteri, una volta che questi fossero diventati dominanti. Inoltre in tutti i casi in cui non è il fosforo ad essere il fattore limitante, la formula per la stima della Chl a non è più valida. Tra le varie soluzioni per mitigare questo problema, rientra l'inserimento di valori soglia per tenere conto degli effetti

limitanti introdotti dalla quantità di luce disponibile (Reynolds, 1997). Sostanzialmente si confronta la profondità media della colonna d'acqua (Z_m) con la profondità della zona eufotica (Z_{eu}). Se Z_m è maggiore di Z_{eu}, si pone un limite sulla quantità di Chl a, che non può essere oltrepassato a prescindere dalla quantità di fosforo disponibile. Ciò è giustificato dal fatto che le cellule o le colonie trasportate in Z_m a profondità maggiori di Z_{eu} si vengono a trovare in condizioni in cui non sono fotosinteticamente attive. La disponibilità di luce non è il solo fattore limitante, altri studi ad esempio prendono in considerazione anche il rapporto tra TN e TP (Dillon *et al.*, 1988).

In secondo luogo, i dati utilizzati da Vollenweider per mettere a punto le formule appartengono a un gran numero di laghi sparsi nel mondo. Questa caratteristica, sebbene da un lato fornisca generalità alla formula, dall'altro non prende in considerazione le caratteristiche specifiche del singolo lago. Inoltre le formulazioni precedentemente citate vigono nell'ipotesi che le acque del lago siano perfettamente mescolate. È altresì importante sottolineare che gli intervalli di confidenza che fanno rientrare il 95% dei casi campione nell'ambito delle regressioni proposte da Vollenweider, comportano un'oscillazione sulla stima delle quantità previste pari a circa un ordine di grandezza. Tale oscillazione è da ricondurre al fatto che molti fattori che influenzano la quantità di fitoplancton non sono presi in considerazione dalle formule. Tra questi, oltre ai fattori locali, alla quantità di luce disponibile, alle caratteristiche di mescolamento della colonna d'acqua e alla quantità di azoto disponibile, cui si è già accennato, possono essere inclusi altri fattori ambientali come la temperatura e gli effetti di predazione da parte dello zooplancton.

Infine tali formulazioni sono state sviluppate per ambienti lacustri. I cianobatteri sono però presenti a volte anche in ambienti fluviali e marino costieri (Paerl *et al.*, 2008). Questi oltre ad essere caratterizzati da differenti livelli di salinità e dalla presenza di organismi differenti rispetto agli ambienti lacustri, hanno anche un'altra rilevante differenza: raramente possono essere considerati come aree ben definite con dimensioni e volume limitati.

I laghi generalmente sono caratterizzati da moderati gradienti spaziali nelle caratteristiche fisico-chimiche dell'acqua, e sono quindi generalmente classificabili nella loro interezza da caratteristiche fisico-chimiche omogenee, con l'esclusione dei laghi con elevata estensione. Al contrario negli ambienti marino costieri gli effetti legati alle correnti tra il largo e la costa, alla marea, all'*upwelling*, al vento, ecc., determinano caratteristiche fisico-chimiche dell'acqua molto variabili, rendendo quasi impossibile identificare dei parametri univoci con i quali caratterizzarli.

In letteratura sono presenti anche formulazioni alternative (Brett *et al.*, 2008) rispetto a quelle di Vollenweider. Alcune, analogamente a quanto fatto da Vollenweider, forniscono la stima della chl a (Dillon *et al.*, 1974; Jones *et al.*, 1976), altre invece forniscono una stima diretta della massa di cianobatteri (Smith 1985):

$$mc = -0{,}142 + 0{,}596 \log (TP) - 0{,}963 \log (Z)$$

dove: mc = massa di cianobatteri in g/m^3
TP = fosforo totale in mg/m^3
Z = profondità media del lago in m.

Questo tipo di modelli matematici ha come principale pregio quello di poter eseguire rapidamente stime di massima sul rischio di fioriture. Ma, alla luce delle criticità esposte, tale utilizzo non può prescindere da un giudizio esperto per l'interpretazione dei risultati che essi forniscono.

A6.2.2. Reti neurali artificiali[1]

Una Rete Neurale Artificiale (RNA) è un modello matematico che apprende il comportamento di un sistema a partire dai dati, permettendo quindi di svincolarsi da ipotesi semplificative *a priori* circa il tipo di legame funzionale tra le variabili indipendenti e quella dipendente, che caratterizzano i modelli basati su assunzioni di tipo fisico o statistico. Dal punto di vista matematico è possibile dimostrare che ogni funzione continua può essere approssimata da una RNA. Una RNA può quindi essere usata per modellare relazioni tra dati, anche di tipo non lineare, quando il modo in cui le variabili dipendono tra loro non sia noto *a priori*. Nello specifico dei modelli ecologici, in cui in genere non si ha una conoscenza completa di come le componenti fisiche e biologiche possano essere legate tra loro in termini di formulazione matematica, questo è un grande vantaggio. Una RNA è quindi un modello matematico in grado di approssimare una funzione incognita che metta in relazione tra loro un certo numero di variabili. Sostanzialmente si ipotizza che esista un qualche legame funzionale che permetta di derivare una (o più) quantità da altre quantità note. Anche se il legame funzionale tra queste variabili non è noto, una RNA è in grado di approssimarlo. Affinché l'applicazione abbia successo è ovviamente necessario che tale legame funzionale sia ben fondato e che quindi la/e variabili dipendenti (quella/e che si vogliono ricavare a partire dalle altre) siano effettivamente legate con le variabili indipendenti (le variabili che si utilizzano come input). Quindi in questo tipo di approccio è necessario aver verificato che le variabili dipendenti siano legate a quelle indipendenti (generalmente nel senso di avere un'alta cross-correlazione). Lo svantaggio è che per approssimare tale legame funzionale incognito è necessaria una gran quantità di dati. Tali dati sono infatti utilizzati dalla rete neurale per "apprendere" empiricamente il legame sussistente tra le varie quantità. Più è forte il legame tra le grandezze considerate, meglio funzionerà la RNA.

Il nome rete neurale deriva dal fatto che la struttura matematica di questo modello ricorda il sistema nervoso, con neuroni, assoni e sinapsi (Figura A6.1).

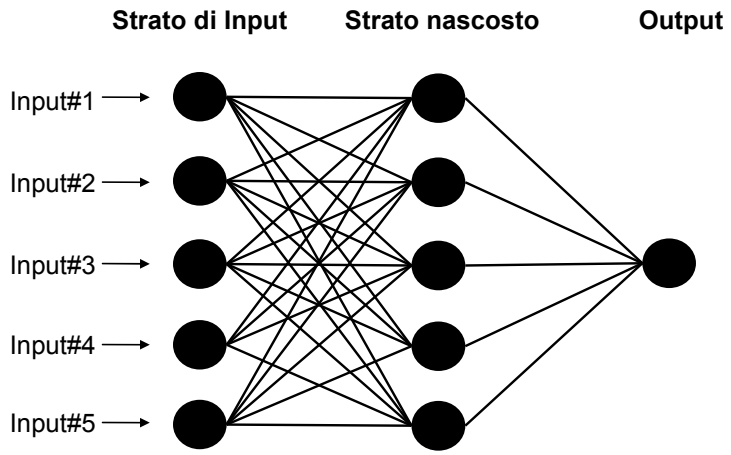


Figura A6.1. Esempio di rete neurale artificiale con strato di input, 1 strato nascosto e 1 neurone di output

[1] Le reti neurali artificiali descritte nel seguito sono di tipo *feed forward* con apprendimento basato sull'algoritmo di back-propagation. Tale scelta deriva dal fatto che quasi tutte le pubblicazioni di riferimento sfruttano questo tipo di reti neurali, quindi si è ritenuto non necessario trattare reti neurali di altra tipologia.

I neuroni o nodi sono raggruppati in strati e ogni strato può essere composto da un numero variabile di neuroni. Gli strati di input (ingresso) e output (uscita) sono presenti in tutte le tipologie di RNA, tra questi possono essere presenti uno o più strati intermedi o nascosti (generalmente uno solo). Gli strati sono ordinati in sequenza a partire da quello di input e finendo con quello di output. I neuroni di uno strato sono collegati con tutti i neuroni dello strato precedente e con tutti quelli dello strato successivo tramite dei collegamenti cui sono associati dei pesi.

Sostanzialmente ogni neurone (tranne quelli dello strato di input) contiene un valore che è dato da una combinazione pesata dei valori contenuti nei neuroni dello strato precedente e contribuisce tramite opportuni pesi alla determinazione di tutti i neuroni dello strato successivo. È operando su questi pesi, tramite una procedura di minimizzazione dell'errore denominata fase di addestramento/apprendimento (o training), che la rete neurale riesce a ricostruire la funzione incognita. I neuroni dello strato di input sono assegnati e contengono i valori delle grandezze con le quali si è deciso di stimare la o le grandezze richieste in output.

Le RNA non hanno una buona capacità di estrapolare situazioni non incluse tra le caratteristiche dell'insieme di dati utilizzato per l'addestramento. Pertanto è necessario che la banca dati per l'addestramento contenga situazioni quanto più vicine e quanto più possibile comprensive di quelle che si vorranno sottoporre alla RNA in fase di utilizzo. Poiché la rete "impara" il legame funzionale a partire dai dati, affinché questa offra buone prestazioni è necessario che la quantità e la qualità dei dati utilizzati per l'addestramento sia la migliore possibile. RNA addestrate utilizzando dati affetti da numerosi errori di misura o con data set troppo esigui non produrranno buoni risultati in fase di esercizio.

Date queste caratteristiche, le reti neurali artificiali sono molto usate come strumento di previsione per i bloom algali, per i quali sono noti molti legami di correlazione tra le grandezze ma non è nota l'esatta relazione funzionale che le lega. Diversamente dai modelli di regressione, le reti neurali sono utilizzate prevalentemente come strumenti specifici per le singole località. Sono pertanto "addestrate" utilizzando dati provenienti tutti dallo stesso corpo idrico.

In letteratura vi sono molte applicazioni di reti neurali per affrontare il problema della previsione dei bloom algali e più specificatamente dei cianobatteri. Alcuni studi sono volti a prevedere il fosforo totale (TP) e/o la chl-a (Barciela *et al.*, 1999; Lee *et al.*, 2003; Hou *et al.*, 2004; Coad *et al.*, 2005; Welk *et al.*, 2005; Millie *et al.*, 2006; Muttil *et al.*, 2006; Melesse *et al.*, 2008; Kang *et al.*, 2011; Malek *et al.*, 2011) e pertanto hanno lo stesso tipo di utilizzo delle formule di regressione esposte precedentemente, sebbene offrano risultati generalmente più precisi e siano specifiche per singoli corpi idrici. Altri, in maniera analoga, stimano la massa di produzione primaria (Scardi, 1996; Belgrano *et al.*, 2001), mentre altri ancora sono più specifici e realizzano RNA per stimare e prevedere direttamente la quantità di cianobatteri (Recknagel *et al.*, 1997; Maier *et al.*, 1998; Olden, 2000; Wei *et al.*, 2001; Wilmotte *et al.*, 2008).

Le RNA permettono anche di eseguire studi di carattere generale sul grado di influenza dei parametri ambientali e biochimici che influenzano sia la quantità di chl-a che più specificatamente quella di cianobatteri. Grazie a tali studi si riesce a capire quali siano le componenti che hanno una maggiore influenza sull'innesco di un bloom (NOAH, 2006). Ciò permette sia di migliorare i modelli di previsione, che di pianificare al meglio le operazioni di monitoraggio, concentrandosi sulle quantità di maggiore interesse e riducendo i costi.

Le Tabelle A6.3 e A6.4 riportano in maniera sintetica le tipologie di input selezionate per le RNA, aventi variabili di output specifiche per i cianobatteri. Gli articoli presenti nella letteratura di riferimento si differenziano tra loro anche per tipologia di aree trattate: laghi e bacini idrici (Recknagel *et al.*, 1997; Olden, 2000; Wei *et al.*, 2001; Hou *et al.*, 2004; Welk *et al.*, 2005; Millie *et al.*, 2006; Wilmotte *et al.*, 2008; Malek *et al.*, 2011); ambienti fluviali (Recknagel *et al.*, 1997; Whitehead, 1997; Maier *et al.*, 1998; NOAH, 2006); e aree marino-costiere (Scardi,

1996; Barciela *et al.*, 1999; Belgrano, 2001; Lee *et al.*, 2003; Coad *et al.*, 2005; Muttil *et al.*, 2006; Melesse *et al.*, 2008; Kang *et al.*, 2011).

Tabella A6.3. Esempi di input utilizzati per le RNA in ambienti fluviali per la previsione della concentrazione di cianobatteri

	Corrente	Temperatura dell'acqua	Colore	Torbidità	pH	Conducibilità	Fosforo	Azoto	Silicio
Maier *et al.* 1998	x	x	x						
Recknagel *et al.* 1997	x	x	x	x	x	x	x	x	x

Tabella A6.4. Esempi di input utilizzati per le RNA in ambienti lacustri per la previsione della concentrazione di cianobatteri

	Temperatura dell'acqua	Irraggiamento	Stratificazione	Torbidità	Profondità	pH	Conducibilità	Vento	Pioggia	Umidità dell'aria	Fosforo	Azoto	Ossigeno	Silicio	Ammonio	POC	Zooplancton	Chl a
Olden, 2000											x	x			x		x	
Recknagel *et al.*,1997	x	x	x	x	x	x	x	x	x		x	x	x	x			x	x
Wei *et al.*, 2001	x			x		x					x	x					x	
Wilmotte *et al.*, 2008	x	x	x	x		x	x	x	x	x	x	x	x	x		x	x	

A6.2.3. Modelli teorico-numerici per idrodinamica, biochimica e processi biotici

Questa tipologia di modelli matematici si basa sulla risoluzione per via numerica (quindi tramite discretizzazione e un uso intensivo della capacità di calcolo dei computer) delle equazioni differenziali che descrivono l'evoluzione nel tempo delle grandezze di interesse. L'idea di base è di descrivere l'evoluzione di un ecosistema tramite equazioni differenziali desunte dalla conoscenza scientifica pregressa, che descrivano come le componenti fisiche e biologiche varino nel tempo e nello spazio in funzione delle grandezze da cui dipendono e di come interagiscano tra loro.

Vi sono due principali problematiche da affrontare nell'utilizzo di questi modelli. La prima è che più il modello è aderente alla realtà, più è complesso e pertanto sarà richiesta una grande quantità di dati come input e sarà necessaria una grande potenza computazionale per risolverlo. Ad esempio, oltre a inserire delle equazioni per la dinamica della popolazione di cianobatteri, è possibile descrivere nel dettaglio anche l'idrodinamica del corpo idrico; ai semplici apporti di nutrienti si possono aggiungere altre caratteristiche come ad esempio l'irraggiamento solare, il

vento, la temperatura dell'acqua e dell'aria, la salinità, la densità del fitoplancton (per gruppi o per specie) e analogamente di zooplancton di batteri e di eventuali altri componenti della catena trofica e altro ancora.

Il secondo problema è che le equazioni che descrivono il ciclo vitale delle componenti biologiche non si basano su leggi universalmente valide, come le leggi della fisica per la parte abiotica dei processi, ma sono formulazioni empiriche derivate dall'analisi dei dati e spesso legate a parametri da calibrare.

Le applicazioni presenti in letteratura si differenziano prevalentemente per il tipo di approccio seguito. Una serie di studi utilizza modelli più generali, anche detti *box model*, basati sul principio di conservazione della massa e dell'energia in un ambiente delimitato (Di Toro *et al.*, 1971; Varis, 1993; Howarth *et al.*, 1999; Howard *et al.*, 2002; Lauzon *et al.*, 2002; Arhonditsis *et al.*, 2005a/b; Mooij *et al.*, 2007). Questi modelli considerano il corpo idrico come una scatola chiusa e tramite equazioni differenziali e parametrizzazioni algebriche studiano il ciclo dei nutrienti e del fitoplancton (o in generale della componente planctonica includendo batteri e zooplancton), prendendo in considerazione le forzanti esterne, quali ad esempio apporti di nutrienti, irraggiamento solare e temperatura, ma escludendo la simulazione dell'idrodinamica interna al corpo idrico. Le caratteristiche idrodinamiche sono tenute in conto o a livello generale nella formulazione concettuale del modello (es. si ipotizza un corpo idrico stratificato) o tramite opportuni parametri posti nelle equazioni per la componente biologica. Questo genere di modelli fornisce risposte in prima approssimazione e sono generalmente usati per avere risposte di massima nell'ambito di studi climatici.

Un differente tipo di approccio consiste nell'accoppiare le equazioni per l'idrodinamica interna al corpo idrico con quelle per il trasporto e la diffusione dei nutrienti e della componente planctonica, includendone il ciclo vitale (fotosintesi, respirazione, riproduzione, mortalità). A seconda della complessità del modello e del tipo di corpo idrico si possono utilizzare modelli monodimensionali 1D lungo la verticale (Patterson *et al.*, 1994; Barciela *et al.*, 1999; Fadel *et al.*, 2011; Silva *et al.*, 2011; Wallace *et al.*, 2000; Hense *et al.*, 2006; Arhemier *et al.*, 2005; Hamilton *et al.*, 1997; Trolle *et al.*, 2011; Reynolds *et al.*, 1997; Reynolds *et al.*, 2001; Scavia, 1980; Elliott *et al.*, 2005; Markensten *et al.*, 2007; Markensten *et al.*, 2010; Elliott *et al.*, 2010; Elliott *et al.*, 2006; Elliott *et al.*, 2008; Janse *et al.*, 1995; Elliott, 2010; Elliott *et al.*, 2004; Bonnet *et al.*, 2004; Lewis *et al.*, 2002; Environmental Laboratory, 1985) o modelli 3D (Robson *et al.*, 2004; Bonnet *et al.*, 2001; DHI, 2012; Deltares, 2013; Neumann *et al.*, 2002).

I modelli 1D risolvono la equazioni solo lungo la direzione verticale, ipotizzando una sostanziale omogeneità lungo l'orizzontale. Ciò può costituire una approssimazione adeguata nei casi di corpi idrici con caratteristiche idrodinamiche omogenee (es. laghi). Sono inoltre considerate le forzanti atmosferiche che hanno influenza sulla dinamica del fitoplancton (es. irraggiamento solare) o delle masse d'acqua (es. vento) e in alcuni casi l'interazione con il sedimento (Scavia, 1980). Questo tipo di approccio è in grado di simulare fenomeni di primaria importanza quali la formazione di stratificazione lungo la colonna d'acqua e la simulazione degli effetti di autoregolazione del galleggiamento da parte dei cianobatteri.

I modelli 3D includono tutte le caratteristiche sopra esposte, ma permettono anche di introdurre una variabilità lungo l'orizzontale, rendendoli idonei per corpi idrici con ampia variabilità spaziale delle condizioni.

Vi è infine un'ulteriore tipologia di approccio (Wynne *et al.*, 2011; Wynne *et al.*, 2013) che si basa sull'individuazione della biomassa fitoplanctonica superficiale tramite immagini da satellite, simulandone poi la diffusione e il trasporto nel corpo idrico a fini previsionali tramite modelli 2D (sul piano orizzontale).

L'utilizzo di modelli numerici è stato applicato agli ambienti fluviali (Di Toro *et al.*, 1971; Lauzon *et al.*, 2002), lacustri (Scavia, 1980; Varis, 1993; Patterson *et al.*, 1994; Janse *et al.*,

1995; Hamilton *et al.*, 1997; Wallace *et al.*, 2000; Bonnet *et al.*, 2001; Reynolds *et al.*, 2001; Howard *et al.*, 2002; Lewis *et al.*, 2002; Bonnet *et al.*, 2004; Elliott *et al.*, 2004; Arhemier *et al.*, 2005; Arhonditsis *et al.*, 2005a/b; Elliott *et al.*, 2005; Elliott *et al.*, 2006; Markensten *et al.*, 2007; Mooij *et al.*, 2007; Elliott *et al.*, 2008; Elliott, 2010; Elliott *et al.*, 2010; Markensten *et al.*, 2010; Fadel *et al.*, 2011; Silva *et al.*, 2011; Trolle *et al.*, 2011; Wynne *et al.*, 2013) e marino costieri (Barciela *et al.*, 1999; Howarth *et al.*, 1999; Neumann *et al.*, 2002; Robson *et al.*, 2004). Gli studi avevano come obiettivo la simulazione della dinamica generale per la componente fitoplanctonica (Di Toro *et al.*, 1971; Barciela *et al.*, 1999; Bonnet *et al.*, 2001; Wynne *et al.*, 2013), lo studio specifico della popolazione di cianobatteri come gruppo (Scavia, 1980; Environmental Laboratory, 1985; Patterson *et al.*, 1994; Janse *et al.*, 1995; Hamilton *et al.*, 1997; Howarth *et al.*, 1999; Neumann *et al.*, 2002; Arhemier *et al.*, 2005; Arhonditsis *et al.*, 2005a/b; Elliott *et al.*, 2005; Hense *et al.*, 2006; Mooij *et al.*, 2007; Trolle *et al.*, 2011) o come singole specie (Varis, 1993; Reynolds *et al.*, 1997; Reynolds *et al.*, 2001; Wallace *et al.*, 2000; Howard *et al.*, 2002; Lauzon *et al.*, 2002; Lewis *et al.*, 2002; Bonnet *et al.*, 2004; Elliott *et al.*, 2004; Robson *et al.*, 2004; Elliott *et al.*, 2006; Markensten *et al.*, 2007; Elliott *et al.*, 2008; Elliott, 2010; Elliott *et al.*, 2010; Markensten *et al.*, 2010; Fadel *et al.*, 2011; Silva *et al.*, 2011). In generale dall'analisi della bibliografia consultata, si evince come sia importante l'inserimento nei modelli di diverse specie o gruppi di fitoplancton per lo studio specifico dei cianobatteri (a livello di gruppo o di singole specie), al fine di riprodurre gli effetti legati alla competizione.

L'applicazione di modelli numerici per la previsione della biomassa di cianobatteri è utilizzata prevalentemente per la simulazione di scenari e per l'analisi degli effetti dei cambiamenti climatici (Guven *et al.*, 2006; Mooij *et al.*, 2010; Elliott, 2012), o per la previsione degli effetti di misure di gestione (Lewis *et al.*, 2002), includendo tra queste l'ottimizzazione del monitoraggio, poiché forniscono risultati utili per la scelta del punto o dei punti di campionamento e dei parametri da misurare (Bonnet *et al.*, 2001).

La Tabella A6.4 elenca, indicandone la tipologia secondo la categorizzazione sopra illustrata, i modelli numerici utilizzati per lo studio specifico dei cianobatteri (come gruppo o singole specie)

Tabella A6.4. Modelli numerici ecologici (ed eventuale modello idrodinamico accoppiato, riportato in corsivo) e loro tipologia

Nome modello	Tipo
DYRESM+DYRESM-WQ	1D
DYRESM+CAEDYM	1D
ELCOM+CAEDYM	3D
PCLake	Box model
Probe+BIOLA	1D
Protech	1D
Protbas	1D
CLAMM	Box model
DyLEM-1D	1D
ELMO	3D
Delft3d-ECO	1D/3D
Ecopath/Ecosim	Box model
Ecospace	3D
Eco-Lab	1D/3D
SHYFEM AQUABC	3D
MOM+ERGOM	3D
CE-QUAL-R1	1D

A6.3. Utilizzo di strumenti di modellistica matematica

In questo paragrafo vengono brevemente riassunte le caratteristiche principali degli strumenti matematici sopra descritti.

In Tabella A6.5 sono elencate le risorse richieste per l'utilizzo dei diversi strumenti matematici.

Tabella A6.5. Risorse richieste per l'utilizzo dei diversi strumenti matematici per la previsione delle fioriture di cianobatteri

Strumento matematico	Dati di input necessari	Lunghezza richiesta per le serie storiche di dati	Risorse di calcolo necessarie
Modelli di regressione	Richiedono pochi dati di input selezionati tra i parametri che più spesso sono inclusi nelle normali campagne di monitoraggio.	Non sono necessari dati storici per l'utilizzo, ma più sono lunghe le serie storiche, più è affidabile la stima sul grado di affidabilità del modello.	Trascurabili (es. calcolatrice o PC).
Reti neurali	La tipologia e la quantità di dati di input richiesti è variabile. In letteratura vi sono sia studi che utilizzano reti con pochi input selezionati tra i parametri generalmente presenti nelle campagne di monitoraggio, sia studi che utilizzano molti parametri in input.	È necessario che le serie storiche dei parametri scelti in input siano sufficientemente lunghe da permettere la fase di addestramento.	Le risorse di calcolo richieste sono modeste durante la fase di sviluppo e trascurabili in fase di esercizio (es. PC o workstation).
Modelli numerici	Sono richiesti molti dati di input di tipo biochimico, idraulico, atmosferico ed eventualmente anche geografico.	Non sono necessari dati storici per l'utilizzo del modello, ma più sono lunghe le serie storiche, più è affidabile la stima sul grado di affidabilità dei risultati del modello.	Le risorse di calcolo richieste sono moderate se si utilizza un modello unidimensionale (es. PC o workstation), notevoli se si utilizza un modello numerico bidimensionale o tridimensionale (a seconda della complessità modello o della catena di modelli numerici si può andare da una workstation per i modelli più semplici al server di calcolo per i modelli a media o alta complessità).

La Tabella A6.6 fornisce una guida per la scelta dello strumento matematico più adeguato per i principali ambiti di utilizzo.

Tabella A6.6. Applicazioni consigliate per i diversi strumenti matematici disponibili

Strumento matematico	Modelli di regressione	Reti Neurali	Modelli numerici
Stima di massima della dimensione delle possibili fioriture di cianobatteri	x		x
Previsione della quantità di cianobatteri in punti rappresentativi (corpi idrici limitati caratterizzati da condizioni omogenee) (es. laghi)		x	x
Previsione della quantità di cianobatteri e della loro dinamica spaziale (corpi idrici molto estesi o caratterizzati da ampia variabilità spaziale) (es. aree costiere, grandi laghi)			x
Simulazione di scenari con condizioni ambientali differenti dalle attuali (es. cambiamenti climatici)			x
Valutazione a priori dell'effetto di misure di gestione.			x
Attività di ricerca per lo studio dei fenomeni di innesco dei *bloom*		x	x

A6.4. Conclusioni

Il crescente numero di pubblicazioni scientifiche relative a modelli matematici applicati alla biologia marina e più nello specifico al problema della proliferazione di cianobatteri, dimostra quanto questa strada inizi ad essere percorsa in maniera sempre più frequente. La corposa bibliografia citata dimostra come a livello internazionale i modelli matematici, sebbene migliorabili, siano considerati pronti per fornire servizi di previsione e studi su scenari anche di lungo periodo.

La comunità scientifica si è occupata da un lato di produrre modelli in grado di fornire rapidamente indicazioni di massima utili alla fase di pianificazione, dall'altra di addentrarsi gradualmente nel problema della dinamica delle popolazioni biologiche per produrre modelli matematici più completi e complessi volti ad affrontare il problema in maniera dettagliata. Trattandosi di un percorso in itinere, gli studi prodotti si occupano sia di verificare la possibilità di applicare e validare lo stato dell'arte della modellistica, che di produrre ricerche per migliorare la modellistica matematica per i processi biologici. Tra queste ultime, di particolare interesse sono gli studi volti ad analizzare l'importanza delle diverse grandezze come forzanti nella formulazione per la previsione della dinamica della popolazione di cianobatteri. Tali risultati forniscono utili indicazioni anche per la pianificazione di monitoraggi e campagne di misura.

Sebbene negli ultimi anni, soprattutto grazie all'assimilazione di dati misurati in situ o da satellite nei modelli, vi sia stato un notevole miglioramento delle prestazioni, è ancora necessario eseguire casi studio utili allo sviluppo di formulazioni che possano permettere di raggiungere lo stesso standard di prestazioni che i modelli offrono per lo stato fisico-chimico dei corpi d'acqua. A tal fine sarebbe utile mettere a sistema i dati prodotti dalle campagne di misura, in un unico database per avere una visione d'insieme dei dati disponibili su cui sviluppare, migliorare o validare i modelli numerici. Inoltre analogamente a quanto fatto anche in Fadel *et al.*, (2011), sarebbe molto importante per lo sviluppo della modellistica creare un caso studio completo di dati fisico-chimici e biologici con un'alta frequenza temporale. La soluzione proposta nell'articolo citato è quella di installare su un corpo idrico una boa come stazione di misura automatica, in grado di monitorare e trasmettere in continuo tutti i parametri

di interesse per una opportuna copertura degli input necessari al modello e una verifica degli output prodotti.

Bibliografia

Arheimer B, Andreasson J, Fogelberg S, Johnsson H, Pers CB, Persson K. Climate change impact on water quality model results from southern Sweden. *Ambio* 2005;34:559-66.

Arhonditsis GB, Brett MT. Eutrophication model for Lake Washington, USA. Part I. Model description and sensitivity analysis. *Ecol Model* 2005(a);187:140-78.

Arhonditsis GB, Brett MT. Eutrophication model for Lake Washington, USA. Part II. Model calibration and system dynamics analysis. *Ecol Model* 2005(b);187:179-200.

Barciela RM, Garcia E, Fernandez E. Modelling primary production in a coastal embayment affected by upwelling using dynamic ecosystem models and artificial neural networks. *Ecol Model* 1999;120:199-211.

Belgrano A, Malmgren B, Lindahl O. Application of artificial neural networks (ANN) to primary production time-series data. *J Plankton Res* 2001;23(6):651-8.

Bonnet MP, Poulin M. DyLEM-1D: a 1D physical and biochemical model for phytoplankton succession, nutrients and dissolved oxygen cycling application to a hyper-eutrophic reservoir. *Ecol Model* 2004;180:317-44.

Bonnet MP, Wessen K. ELMO, a 3D water quality model for nutrients and chlorophyll: first application on a lacustrine ecosystem. *Ecol Model* 2001;141:19-33.

Brett MT, Benjamin MM. A review and reassessment of lake phosphorus retention and the nutrient loading concept, *Freshwater Biol* 2008;53:194-211.

Chorus I, Bartram J (Ed.). *Toxic cyanobacteria in water: a guide to their public health consequences, monitoring and management*. London, New York: E&FN Spon; 1999. (Published on behalf of WHO).

Coad P; Cathers B, Van Senden D. Predicting estuarine algal blooms utilising neural network modelling - A preliminary investigation. In: Zerger A, Argent RM (Ed.). *Proceedings of the International Congress on Modelling and Simulation MODSIM 05, Modelling and Simulation Society of Australia and New Zealand*. Melbourne (Australia), December 12-15, 2005. Melbourne: MODSIM; 2005. p. 2373-2379.

Deltares. *D-Water Quality - Versatile water quality modelling in 1D, 2D or 3D systems including physical, (bio)chemical and biological processes. User Manual*. Delft: Deltares; 2013.

DHI. *ECO LAB - 1D, 2D and 3D Water Quality and Ecological Modelling - User Guid*e. Horsholm: Mike by DHI; 2012.

Di Toro DM, O'Connor DJ, Thomann RV. A dynamic model for the phytoplnkton population in the Sacramento San Joaquin Delta. *Adv Chem Ser* 1971;106:131-80.

Dillon PJ, Nicholls KH, Locke BA, de Grosbois E, Yan ND. Phosphorus - phytoplankton relationship in nutrient-poor soft-water lakes in Canada. *Verh Internat Verein Limnol* 1988;23:258-64.

Dillon PJ, Rigler FH. The phosphorus-chlorophyll relationship in lakes. *Limnol Oceanogr* 1974;19:767-73.

Duel H, Malve O, Huttula T, Harezlak V, Penning E. *WISER - Water bodies in Europe: Integrative Systems to assess Ecological status and Recovery. Deliverable D5.2-3: Guidelines on the use of different modelling approaches for designing Program of Measures. WISER FP7 project* 2012. Disponibile all'indirizzo: http://www.wiser.eu/results/deliverables/; ultima consultazione 11/12/2014.

Elliot JA, Thackeray SJ, Huntingford C, Jones RG. Combining a regional climate model with a phytoplankton community model to predict future changes in phytoplankton in lakes. *Freshwater Biol* 2005;50:1404-11.

Elliott JA, Irish AE, Reynolds CS. Modelling phytoplankton dynamics in fresh waters: affirmation of the PROTECH approach to simulation. *Freshw Rev* 2010;3:75-96.

Elliott JA, Jones ID, Thackeray SJ. Testing the sensitivity of phytoplankton communities to changes in water temperature and nutrient load, in a temperate lake. *Hydrobiologia* 2006;559:401-11.

Elliott JA, May L. The sensitivity of phytoplankton in Loch Leven (UK) to changes in nutrient load and water temperature. *Freshwater Biol* 2008;53:32-41.

Elliott JA. Is the future blue-green? A review of the current model predictions of how climate change could affect pelagic freshwater cyanobacteria. *Wat Res* 2012;46:1364-71.

Elliott JA. The seasonal sensitivity of Cyanobacteria and other phtoplankton to changes in flushing rate and water temperature. *Glob Change Bio* 2010;16:864-76.

Environmental Laboratory. *CE-QUAL-R1: A numerical one-dimensional model of reservoir water quality; User's manual. Instruction Report E-82-1 (Revised Edition).* Vicksburg (USA): U.S. Army Engineer Waterways Experiment Station; 1985.

Fadel A, Lemaire BJ, Vincon-Leite B. A coupled hydrodynamic biological model for cyanobacteria dynamics in reservoirs. In: *Proceedings of the World Wide Workshop for Young Environmental Scientists - Urban Waters: resource or risk?* Arcueil (France), June 5-10, 2011. Paris (France): HAL, 2011.

Guven B, Howard A. A review and classification of the existing models of cyanobacteria. *Prog Phys Geo* 2006;30(1):1-24.

Hamilton DP, Schladow SG. Prediction of water quality in lakes and reservoirs. Part 1: model description. *Ecol Model* 1997;96:91-110.

Hense I, Beckmann A. Towards a model of cyanobacteria like cycle - effects of growing and resting stages on bloom formation of N2-fixing species. *Ecol Model* 2006;195:205-18.

Hou G, Song L, Liu J, Xiao B, Liu Y. Modeling of cyanobacterial blooms in hypereutrophic lake Dianchi, China. *J Freshwater Ecol* 2004;19(4):623-9.

Howard A, Easthope MP. Application of a model to predict cyanobacterial growth patterns in response to climatic change at Farmoor reservoir, Oxfordshire, UK. *Sci Total Environ* 2002;282-283:459-69.

Howarth RW, Chan F, Marino R. Do top-down and bottom-up controls interact to exclude nitrogen-fixing cyanobacteria from the plankton of estuaries: explorations with a simulation model. *Biogeochemistry* 1999;46(1-3):203-31.

Janse JH, Van Liere L. PCLake - a modelling tool for the evaluation of lake restoration scenarios. *Water Sci Technol* 1995;31:371-4.

Jones JR, Bachmann RW. Prediction of phosphorus and chlorophyll levels in lakes. *J Water Pollut Con F* 1976;48:2176-82.

Kang HY, Rule RA, Noble PA. Artificial neural network modeling of phytoplankton blooms and its application to sampling sites within the same estuary. In: Baird D, Mehta A (Ed.). *Estuarine and coastal ecosystem modelling*. Waltham (USA): Academic Press; 2011. p. 161-172.

Lauzon N, Lence BJ, Maier HR. Use of artificial intelligence techiniques for the estimation of cyanobacteria (blue-green algae) concentrations. In: *Proceedings of the Annual Conference of the Canadian Society for Civil Engineering.* Montréal (Canada) June 5-8, 2002. Montreal: Canadian Society for Civil Engineers; 2002. p. 1-10.

Lee J, Huang Y, Dickman M, Jayawardena A. Neural networkmodelling of coastal algal blooms. *Ecol Model* 2003;159:179-201.

Lewis DM, Elliott JA, Lambert MF, Reynolds CS. The simulation of an Australian reservoir using a phytoplankton community model: PROTECH. *Ecol Model* 2002;150:107-16.

Maier HR, Dandy GC, Burch MD. Use of artificial neural networks for modelling cyanobacteria Anabena spp. in the River Murray, South Australia. *Ecol Model* 1998;105:257-72.

Malek S, Ahmad SMS, Singh SKK, Milow P, Salleh A. Assessment of predictive models for chlorophyll-a concentration of a tropical lake. *BMC Bioinformatics* 2011;12(13):S12:1-11.

Markensten H, Moore K, Persson I. Simulated lake phytoplankton composition shifts toward cyanobacteria dominance in a future warmer climate. *Ecol Appl* 2010;20:752-67.

Markensten H, Pierson DC. Weather driven influences on the phytoplankton succession in a shallow lake during contrasting years. Application of PROTBAS. *Ecol Model* 2007;207:128-36.

Melesse AM, Krishnaswamy J, Zhang K. Modeling coastal eutrophication at Florida Bay using neural networks. *J Coastal Res* 2008;24(2B):190-6.

Millie DF, Weckman GR, Pigg RJ, Tester PA, Dyble J, Litaker RW, Carrick HJ, Fahnenstiel GL. Modeling phytoplankton abundance in Saginaw Bay, Lake Huron: using artificial neural networks to discern functional influence of envrionmental variables and relevance to a great lakes observing system. *J Phycol* 2006;42:336-49.

Mooij WM, Janse JH, De Senerpont Domis LN, Hulsmann S, Ibelings BW. Predicting the effect of climate change on temperate shallow lakes with the ecosystem model PCLake. *Hydrobiologia* 2007;584:443-54.

Mooij WM, Trolle D, Jeppensen E, Arhonditsis G, Belolipetsky PV, Chitamwebwa BR, Degermendzhy AG, DeAngelis DL, De Senerpont Domis LN, Downing AS, Elliott JA, Fragoso Jr. CR, Gaedke U, Genova SN, Gulati RD, Hakanson L, Hamilton DP, Hipsey MR, 't Hoen J, Hülsmann S, Los FJ, Makler-Pick V, Petzoldt T, Prokopkin IG, Rinke K, Schep SA, Tominaga K, Van Dam AA, Van Nes EH, Wells SA, Janse JH. Challenges and opportunities for integrating lake ecosystem modelling approaches. *Aquat Ecol* 2010;44(3):633-67.

Muttil N, Chau WW. Neural network and genetic programming for modelling coastal algal blooms. *Int J Environ Pollut* 2006:28(3-4):223-38.

Neumann T, Fennel W, Kremp C. Experimental simulations with an ecosystem model of the Baltic Sea: a nutrient load reduction experiment. *Global Biogeochem Cy* 2002;16(3):7-1/7-19.

NOAH. *Forecasting algal blooms in surface water systems with artificial neural networks.* Lawrenceville (USA): New Jersey Department of Environmental Protection; 2006. Disponibile all'indirizzo: www.dep.state.nj.us/dsr; ultima consultazione 11/12/2014.

Olden JD. An artificial neural network approach for studying phytoplankton succession. *Hydrobiologia* 2000;436:131-43.

Paerl HW, Huisman J. Blooms like it hot. *Science* 2008;320:57-8.

Patterson JC, Hamilton DP, Ferris JM. Modelling of cyanobacterial blooms in the mixed layer of lakes and reservoirs. *Aust J Mar Fresh Res* 1994;45:829-45.

Recknagel F, French M, Harkonen P, Yabunaka KI. Artificial Neural Networks approach for Modeling and Prediction of Algal Blooms. *Ecol Model* 1997;96:11-28.

Reynolds CS, Irish AE, Elliott JA. The ecological basis for simulating phytoplankton responses to environmental change (PROTECH). *Ecol Model* 2001;140:271-291.

Reynolds CS, Irish AE. Modelling phytoplankton dynamics in lakes and reservoirs: the problem of in-situ growth rates. *Hydrobiologia* 1997;349:15-7.

Reynolds CS. *Vegetation processes in the pelagic: a model for ecosystem theory. (Excellence in Ecology)*. Oldendorf-Luhe (Germany): International Ecology Institute, 1997.

Robson BJ, Hamilton DP. Three-dimensional modelling of a Microcystis bloom event in the Swan River estuary, Western Australia. *Ecol Model* 2004;174:203-22.

Scardi M. Artificial neural networks as empirical models for estimating phytoplankton production. *Mar Ecol Prog Ser* 1996;139:289-99.

Scavia D. An Ecological model of Lake Ontario. *Ecol Model* 1980;8:49-78.

Silva T, Vincon-Leite B, Lemaire BJ, Tassin B, Nascimento N. Modelling cyanobacteria dynamics in urban lakes: an integrated approach including watershed hydrologic modelling and high frequency data collection. In: *Proceedings of the World Wide Workshop for Young Environmental Scientists - Urban Waters: resource or risk?*. Arcueil (France), June 5-10, 2011. Paris (France): HAL, 2011.

Smith VH. Predictive models for the biomass of blue-green algae in lakes. *Water Resour Bull* 1985;21(3):433-9.

Trolle D, Hamilton DP, Pilditch CA, Duggan IC, Jeppesen E. Predicting the effects of climate change on trophic status of three morphologically varying lakes: implications for lake restoration and mangement. *Environ Modell Softw* 2011;26:354-70.

Varis O. Cyanobacteria dynamics in a restored Finnish lake: a long term simulation study. *Hydrobiologia* 1993;268:129-45.

Vollenweider RA. Advances in defining critical loading levels for phosphorus in lake eutrophication. *Mem Ist Ital Idrobiol* 1976;33:53-83.

Wallace BB, Hamilton DP. Simulation of water-bloom formation in the cyanobacterium Microcystis aeruginosa. *J Plankton Res* 2000;22:1127-38.

Wei B, Sugiura N, Maekawa T. Use of artificial neural network in the prediction of algal blooms. *Water Res* 2001;35:2022-2028.

Welk A, Recknagel F Burch M. Ordination, clustering and forecasting of phytoplankton dynamics in the Myponga drinking water reservoir by means of supervised and non-supervised artificial neural networks. In: Zerger A, Argent RM (Ed.). *Proceedings of the International Congress on Modelling and Simulation MODSIM 05, Modelling and Simulation Society of Australia and New Zealand*. Melbourne (Australia), December 12-15, 2005. Melbourne: MODSIM; 2005. p. 106-12.

Wilmotte A, Descy JP, Vyverman W. *Scientific Support Plan for a Sustainable Development policy (SPSD II) Part 2: Global change, Ecosystems and Biodiversity. FINAL REPORT Algal blooms: emerging problem for health and sustainable use of surface waters (B-BLOOMS) EV/34*. Brussels (Belgium): Belgian Science Policy; 2008.

Water Quality Research Australia. *International guidance manual for the management of toxic cyanobacteria*. London: Global Water Research Coalition; 2009.

Wynne TT, Stumpf RP, Tomilson MC, Fahnenstiel GL, Dyble J, Schwab DJ, Joshi SJ. Evolution of a cyanobacterial bloom forecast system in western Lake Erie: Development and initial evaluation. *J Great Lakes Res* 2013;39(1):90-9.

Wynne TT, Stumpf RP, Tomlinson MC, Schwab DJ, Watabayashi GY, Christensen JD. Estimating cyanobacterial bloom transport by coupling remotely sensed imagery and a hydrodynamic model. *Ecol Appl* 2011;21(7):2709-21.

A7. SITUAZIONE NAZIONALE: CORPI IDRICI INTERESSATI DA CIANOBATTERI TOSSICI

Maura Manganelli (a)*, Emanuela Viaggiu (b)*, Rossella Barone (c), Fabio Buzzi (d), Francesca Caviglia (e), Roberta Congestri (b), Diego Copetti (f), Roberta De Angelis (g), Feliciana Godeas (b), Licia Guzzella (f), Eleonora Masala (h), Luigi Naselli-Flores (c), Nico Salmaso (i), Simona Scardala (a)

(a) Dipartimento di Ambiente e Connessa Prevenzione Primaria, Istituto Superiore di Sanità, Roma
(b) Dipartimento Biologia, Università degli Studi di Roma 'Tor Vergata', Roma
(c) Dipartimento di Scienze e Tecnologie Biologiche, Chimiche e Farmaceutiche, Università di Palermo, Palermo
(d) Dipartimento di Lecco, Agenzia Regionale per la Protezione Ambientale della Lombardia
(e) Dipartimento Provinciale del Verbano Cusio Ossola, Agenzia Regionale per la Protezione Ambientale del Piemonte, Verbania
(f) Istituto di Ricerca Sulle Acque, Consiglio Nazionale delle Ricerche, Brugherio (MB)
(g) Dipartimento tutela delle acque interne e marine, Istituto Superiore per la Protezione e la Ricerca Ambientale, Roma
(h) Laboratorio di Prevenzione dell'Azienda Sanitaria Locale della provincia di Lecco, Oggiono (LC)
(i) Centro Ricerca ed Innovazione, Fondazione Edmund Mach, San Michele all'Adige (TN)
**maura.manganelli@iss.it; emanuela.viaggiu@uniroma2.it*

Nel primo paragrafo di questo capitolo vengono riportati alcuni dati relativi alle fioriture di cianobatteri nei bacini italiani, utili per avere un quadro aggiornato della situazione nazionale e per evidenziare eventuali criticità e/o attività di studio o gestione da intraprendere. Sono stati utilizzati sia dati relativi al monitoraggio per la balneazione, pubblicati sui siti web delle varie agenzie regionali, o forniti direttamente da alcuni coautori, sia dati pubblicati nella letteratura scientifica, per evidenziare trend temporali e, a titolo meramente esemplificativo, descrivere situazioni molto complesse e dinamiche nel tempo.

Nel secondo paragrafo, per le sole specie responsabili della maggior parte delle fioriture in Italia, sono riportate le informazioni sulle basi genetiche e sui fattori ambientali (ove disponibili) che determinano la produzione di tossine. Tali informazioni dovrebbero essere di supporto per avviare eventuali programmi di monitoraggio specifici.

Nel terzo paragrafo, infine, viene descritta la distribuzione dei cianobatteri tossici negli altri continenti, per individuare eventuali similitudini o differenze fra ciò che è presente nel nostro territorio e il resto del mondo.

A7.1. Distribuzione di cianobatteri nei bacini italiani: frequenza, abbondanza e produzione di tossine

La maggior parte dei bacini italiani è interessata dalla presenza di diverse specie di cianobatteri.

La disponibilità di dati sulla presenza dei cianobatteri in Italia è legata alle attività di monitoraggio svolte dalle Regioni, previste dal DM 30 marzo 2010 (Ministero della Salute, 2010) e dal DL.vo 152/2006 e s.m.i in attuazione della Direttiva 2000/60/CE in materia delle acque (Italia, 2006; Europa, 2000).

A7.1.1. Area settentrionale

La diffusione dei cianobatteri planctonici è favorita da condizioni idrologiche stabili, limitata turbolenza della colonna d'acqua e temperature elevate (eccetto la specie *Planktothrix rubescens* che prolifera anche a temperature basse, fra i 9 e i 14°C). Per questo, nelle zone alpine e subalpine le fioriture di cianobatteri riguardano soprattutto i laghi naturali, e molto meno i bacini idroelettrici artificiali, caratterizzati da temperature minori, maggiore turbolenza ed elevato ricambio idrico (*vedi* capitolo A1).

La specie più diffusa, in termini di numero di bacini interessati e di abbondanza cellulare, è *P. rubescens*. Nei grandi laghi profondi sudalpini oligotrofi od oligo-mesotrofi (es. Lago Maggiore e Garda) questa specie è raramente in grado di dare luogo a fioriture visibili ad occhio nudo. Nel Lago Maggiore addensamenti superficiali furono rilevati attorno agli anni '60 del secolo scorso in coincidenza con il peggioramento delle condizioni trofiche del lago (Ravera & Vollenveider, 1968), ma i successivi interventi di risanamento, iniziati negli anni '80, hanno prodotto importanti risultati positivi. L'assenza di fioriture visibili nei laghi profondi oligotrofici è dovuta sia alle minori densità di popolazione (con picchi stagionali tra 0 e 20 m generalmente inferiori a 10.000 cell/mL), sia alla forte diluizione operata dai processi di mescolamento profondo durante l'inverno (generalmente > 100 m). Alle limitate biomasse di *P. rubescens,* tipiche di questi ambienti, corrispondono anche limitate concentrazioni di microcistine (MC)[*], generalmente presenti, nello strato tra 0 e 20 m, con valori inferiori a 1 µg/L e maggiormente rappresentate dai congeneri demetil-MC-RR seguiti da concentrazioni inferiori di MC-LR, demetil-MC-LR e MC-YR (Cerasino & Salmaso, 2012; Salmaso *et al.*, 2013). Al contrario, intense fioriture sono state rilevate nel corso degli ultimi 15 anni nel Lago d'Iseo e in laghi di medie dimensioni, come Pusiano e Ledro, caratterizzati da condizioni di meso-eutrofia (Garibaldi *et al.*, 2000; Legnani *et al.*, 2005; Mosello *et al.*, 2010; Carraro *et al.*, 2012).

Nel lago di Pusiano (Lecco) che, nonostante i programmi di risanamento avviati a partire da metà degli anni '80 con conseguente riduzione di nutrienti, si colloca ancora in uno stato di eutrofia, *P. rubescens* provoca spesso fioriture nel periodo tardo autunnale-invernale, che persistono per alcune settimane e che interessano una buona porzione della colonna d'acqua. I dati prodotti dall'Agenzia Regionale per la Protezione Ambientale (ARPA) della Lombardia evidenziano che i valori massimi di densità cellulare si sono avuti nel 2005-2006 in coincidenza con una concentrazione di microcistine >1 µg/L (test ELISA, *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*). Più recentemente valori elevati di MC sono stati misurati (HPLC-DAD, *High Performance Liquid Chromatography-Diode array detector*) nell'autunno 2011 dall'IRSA-CNR (Istituto di Ricerca sulle Acque-Consiglio Nazionale delle Ricerche), quando le concentrazioni medie di MC nello strato superficiale (1-5 m) sono risultate prossime a 5 µg/L (Copetti, com. pers.). Nel Lago di Piano (Como), dove è costantemente presente, *P. rubescens* ha prodotto nel 2008 MC anche a densità cellulari contenute (10^5 cell/L); nel campione integrato dei primi 2 metri di colonna d'acqua è stata rilevata una concentrazione totale di 2,5 µg/L di MC-LR (Volante *et al.*, 2008). In questo piccolo lago densità cellulari molto vicine a quelle delle tipiche fioriture si raggiungono nel periodo tardo autunnale e primaverile.

Nel Lago meso-eutrofico d'Idro è stata osservata una fioritura di *P. rubescens* nel 2004, con formazione di striature di colore rossastro su tutta la superficie del corpo idrico nel periodo invernale e in primavera. Le densità rilevate in superficie sono state nell'ordine di 10^7 cell/L. Nel 2009 è stata misurata la concentrazione di MC e circa il 90% di MC tot (0,015 µg/L) era

[*] Questa classe di tossine comprende numerose varianti, caratterizzate dalla presenza di due amminoacidi diversi, indicati da due lettere dopo MC- (MC-LR, MC-RR, ecc.). Per maggiori dettagli sulle caratteristiche chimico-tossicologiche, vedi i capitoli A2 e C3.

rappresentato da demetil-MC-RR (Cerasino & Salmaso, 2012), generalmente associata a *P. rubescens* (Barco *et al.*, 2004; Manganelli *et al.*, 2010).

Se *P. rubescens* è la specie più diffusa, quella che provoca i maggiori inconvenienti per la balneazione e l'uso ricreativo delle acque è *Dolichospermum lemmermannii*. Nei grandi laghi a sud delle Alpi *D. lemmermannii* fu segnalata per la prima volta nell'ottobre 1990 sotto forma di estese fioriture al largo della costa sud-orientale del Lago di Garda (Salmaso *et al.*, 1994). Successivamente, e seguendo un gradiente altitudinale, questa specie ha colonizzato i Laghi d'Iseo (1997), Maggiore (2005), Como (2006) e anche laghi di medie dimensioni, come Pusiano (2006) (Mosello *et al.*, 2010; Salmaso *et al.*, 2012). Attualmente, questa specie rappresenta una delle principali cause di degrado della qualità delle acque superficiali nei laghi profondi sudalpini nei mesi estivi, nel pieno cioè della stagione balneare e turistica.

Nel corso del primo episodio di bloom di *D. lemmermannii* del 2006 nel Lago di Como (o Lario), la parte più meridionale del ramo occidentale è stata esclusa da questo fenomeno ed era dominata da *Microcystis aeruginosa*, negli strati superficiali, e da *P. rubescens* in prossimità del metalimnio. Gli eventi accaduti in questo lago rappresentano un buon esempio di come la comunità fitoplanctonica sia soggetta a cambiamenti significativi durante gli anni. In effetti, all'inizio degli anni 2000 *M. aeruginosa* è stata la responsabile di due estese fioriture (2000 e 2003). Nell'anno 2000 gli aggregati delle colonie erano delle dimensioni di circa 1 cm, le densità cellulari superficiali erano dell'ordine di 10^8 cell/L e il fenomeno è durato circa 15 giorni; i test di tossicità aspecifici effettuati in questo caso con *Daphnia magna*, *Vibrio fischeri* e *Oryza sativa* non avevano dato un esito positivo. Inoltre, contestualmente alla presenza di *M. aeruginosa* in superficie, sono state individuate nella zona metalimnetica densità cellulari di *P. rubescens* di 10^7 cell/L. Nell'anno 2003 la fioritura è stata più estesa ed ha interessato tutti e tre i sottobacini. Le densità anche in questo caso sono state dell'ordine di grandezza di 10^8 cell/L e nella località di Colico Piona è stata rilevata una concentrazione di MC di 1,3 µg/L (test ELISA). A partire dal 2006 sono cominciate le fioriture di *D. lemmermannii*, che hanno interessato tratti molto estesi della costa, con durate medie per ciascun evento di 15 giorni. L'estensione spaziale delle fioriture è stata progressiva: a luglio 2010 la fioritura ha interessato solo alcune zone del ramo lecchese con il punto di maggior accumulo localizzato nel tratto tra Bellano e Abbadia lariana; nel Luglio 2011 la fioritura si è sviluppata sia nel ramo lecchese che in quello comasco, e anche in questo caso il tratto di costa con il maggior accumulo è stato quello compreso tra Bellano e Abbadia. Nel luglio 2012 un altro bloom ha interessato il ramo orientale e il bacino settentrionale del Lario con densità di 10^8 cell/L e la presenza di anatossina-a (ATX-a) intracellulare in concentrazione pari a 3,2 µg/L; infine nel mese di luglio 2013 la fioritura ha interessato tutto il lago con densità cellulari superiori a 10^8 cell/L.

Un altro lago interessato da fioriture di *D. lemmermannii* è il Lago Maggiore, dove, durante una fioritura verificatasi nel 2005, nella parte lombarda del lago, sono state rilevate MC ad una concentrazione >1 µg/L (test ELISA). La situazione di questo lago è comunque in netto miglioramento, almeno per quanto riguarda il lato piemontese. In questa zona, infatti, *D. lemmermannii* è diminuita significativamente dal 2005 (anno in cui la fioritura ha raggiunto densità di ~ 2×10^9 cell/L) al 2009 (~ 6×10^5 cell/L). Dopo un nuovo picco nel 2010 (~ 1×10^8 cell/L) si è attestata nuovamente a densità basse nel biennio 2011-2012 (~ 2-3×10^5cell/L). Altre specie di cianobatteri tossici, *Dolichospermum planctonicum* e *Pseudanabaena* sp., sono state trovate nel mese di agosto 2012 con densità estremamente basse ($5{,}4\times10^4$ e 1×10^4 cell/L, rispettivamente) solo nel comune di Stresa (Lido Carciano) (ARPA Piemonte, 2012).

Altri esempi dei problemi causati da *D. lemmermannii* sono quelli relativi alle fioriture documentate nel luglio-agosto 2006 e nel luglio 2010 nel Lago di Pusiano. L'elevata densità cellulare, nell'ordine di 10^8 cell/L, ha comportato una sensibile alterazione della colorazione

dell'acqua fino ad oltre 10 m dalla riva. La fioritura si è protratta per oltre 3 settimane e sulla costa si sono depositati ampi strati di schiume maleodoranti molto probabilmente a seguito della lisi cellulare e del conseguente rilascio della frazione intracellulare di geosmina. Nelle ore più ventose della giornata l'odore acre, simile a quello di muffa, si è diffuso fino a circa 1 km dalla zona della fioritura.

Altre fioriture di specie tossiche sono state segnalate nel lago di Annone ovest, un piccolo lago eutrofico della Brianza lecchese. Dal 2004 ad oggi si sono verificate fioriture massicce di *Woronichinia naegeliana*, generalmente nel periodo tardo autunnale, anche se la più significativa è quella riscontrata nel mese di agosto 2004 con densità pari a 10^8 cell/L. La ricerca delle tossine, dapprima effettuata con metodo immunoenzimatico e successivamente mediante analisi con HPLC ha dato sempre esito negativo. Nel 2009 si è verificata una fioritura di *Raphidiopsis mediterranea* con valori di densità molto elevati di 5×10^8 cell/L, mentre la densità di *Woronichinia* è rimasta molto bassa, e in un campione concentrato con retino è stata trovata una concentrazione di ATX-a pari a 10 µg/L.

Una situazione interessante, da segnalare, è quella del lago di Annone est, un altro piccolo lago della Brianza che riceve le acque dal lago Annone ovest. Diversamente dal suo affluente, qui sono state segnalate imponenti fioriture di *Aphanizomenon flos-aquae* ad agosto 2004 e 2009. La densità cellulare raggiunta è stata dell'ordine di 10^8 cell/L nei primi 5 metri della colonna d'acqua. Nel campione concentrato mediante retino, raccolto nel 2009 nei primi 2 metri della colonna d'acqua, la densità cellulare era superiore a 10^8 cell/L e la concentrazione di ATX-a era 290 µg/L.

Nel lago di Sartirana, piccolo lago polimittico eutrofico, nel mese di marzo 2007 *Limnothrix redekei* ha raggiunto valori di densità pari a $6{,}5\times10^5$ cell/L. In altri momenti sono state riscontrate densità cellulari elevate di *Cylindrospermopsis raciborskii* e *R. mediterranea*, che date le condizioni di trofia e la tipologia del lago potrebbero dare luogo a delle vere e proprie fioriture, anche se non si hanno informazioni relative alla loro tossicità.

Nel lago di Castellaro, piccolo lago polimittico ipertrofico, *C. raciborskii* ha dato luogo a due fioriture nel mese di settembre degli anni 2010 e 2012 con valori di densità cellulare dell'ordine di 10^8 cell/L, nuovamente senza informazioni sulla tossicità.

Nella stagione 2012, dai dati forniti dalla sezione della Regione Piemonte che svolge i controlli per la balneazione, il lago Viverone è stato interessato a giugno da fioriture fitoplanctoniche di durata molto limitata, con densità fra 75 e 90×10^6 cell/L in cui i generi *Aphanizomenon* e *Anabaena* erano dominanti. A distanza di pochi giorni, la concentrazione cianobatterica era già scesa a 20×10^6 cell/L rendendo non necessaria la valutazione della eventuale presenza di MC. Da quel momento fino alla fine della stagione nel mese di settembre, non si sono più presentati episodi di fioriture significative, anche se i cianobatteri sono sempre stati presenti, in concentrazioni molto basse.

Nel lago di Candia, invece, abbondanze cianobatteriche molto elevate, con picchi di 2×10^7 cell/L a maggio e valori oltre 10^7 cell/L a luglio si sono mantenuti per tutta la stagione balneare. Le fioriture erano sempre sostenute da popolazioni miste di vari generi di cianobatteri, passando da una dominanza di *Microcystis* spp. ad una di *Gomphosphaeria/Snowella* spp. Non sono disponibili dati sulla tossicità di queste fioriture (ARPA Piemonte, 2012).

Durante la stagione balneare 2010, nel piccolo lago di Santa Maria (comuni di Revine Lago e Tarzo, provincia di Treviso) sono stati riscontrati i seguenti due episodi di fioritura algale di cui si riportano le specie dominanti: *Aphanizomenon gracile* (11×10^6 cell/L) e *D. planctonicum* ($5{,}6\times10^6$ cell/L). Durante la stagione balneare 2011, gli episodi di fioritura sono stati tre con *Merismopedia tenuissima* ($51{,}3\times10^6$ cell/L giugno; $18{,}2\times10^6$ cell/L settembre) e *D. planctonicum* ($11{,}1\times10^6$ cell/L luglio) (ARPA Veneto, 2014).

A7.1.2. Area centrale

A7.1.2.1. Laghi vulcanici

I laghi di origine vulcanica sono quasi tutti localizzati nel Lazio (laghi di Bolsena, Vico, Bracciano, Albano, Nemi, Monterosi, Martignano, Mezzano), oltre ai laghi di Monticchio, in Basilicata e al lago di Averno in Campania.

Nel Lazio, il lago di Vico e il lago di Albano sono stati più recentemente interessati da fioriture di cianobatteri; le ultime informazioni sul lago di Nemi risalgono ad uno studio del 2002-2003, che pur rilevando la presenza di diverse specie di cianobatteri, constatava un miglioramento rispetto alla situazione rilevata negli anni '80 (Margaritora *et al.*, 2005). Per gli altri laghi, che pure potrebbero sostenere fioriture (trasparenza <1 m e/o concentrazioni di fosforo totale, *Total Phosphorus*, TP, >20 µg/L) non esistono al momento segnalazioni in tal senso (Regione Lazio, 2014).

Il lago di Vico, un lago meso-eutrofico, con una profondità massima di 50 m, è interessato da fioriture di *P. rubescens*. Nei periodi 2005-2007 e 2009-2010 si è verificato un aumento significativo delle densità cellulari, quando il massimo metalimnetico estivo e quello superficiale invernale hanno raggiunto valori di 10^8 cell/L (Capelli *et al.*, 2007; Funari *et al.*, 2011). Le concentrazioni di MC, in prevalenza (>90%) dementi-MC-RR, rilevate mensilmente nel 2009-2010, hanno superato il limite di 1 µg/L nel 50% dei campioni, oscillando fra 0,8 e 6 µg/L, con concentrazioni intracellulari fra 0,01 e 0,43 pg/cell (Funari *et al.*, 2011). La frazione di cellule con il gene *mcyB* per la produzione di microcistine, rispetto a quelle che ne sono prive, è significativamente diminuita nel 2010, ma non la concentrazione di MC. Inoltre, è da notare che nel periodo di mescolamento totale delle acque (in inverno) la frazione di cellule tossiche tendeva ad essere maggiore in profondità piuttosto che in superficie (Funari *et al.*, 2011).

Nel lago di Albano, eutrofico, con una profondità massima di 170 m, sono state osservate più specie di cianobatteri, dominanti in stagioni e anni diversi. In uno studio condotto fra novembre 2003 e novembre 2007 *C. raciborskii* è stata la specie dominante solo in un mese, luglio 2004, per poi essere sostituita, sempre nei periodi estivi-autunnali, da *Chrysosporum ovalisporum* (ex *Aphanizomenon ovalisporum*), e ricomparire sporadicamente a densità molto inferiori (Messineo *et al.*, 2010). È stata rilevata la presenza di cilindrospermopsina (CYN) in concomitanza di entrambe le specie, con concentrazione intracellulare in *C. raciborskii* di 0,003 pg/cell rispetto ai 0,13 pg/cell in *C. ovalisporum* (Messineo *et al.*, 2010). Anche *P. rubescens* è stata osservata nel lago Albano in modo significativo, dominante in superficie nei mesi invernali e a livello del metalimnio durante i periodi più caldi, in coincidenza della stratificazione termica (Messineo *et al.*, 2006; Ellwood *et al.*, 2009). Fra il 2001 e il 2005 sono sempre state rilevate MC in presenza di *P. rubescens*, con un massimo di 14,2 µg/L a -15 m a luglio 2004 e con concentrazioni intracellulari in schiume superficiali fino a 1,5 pg/cell (Messineo *et al.*, 2006).

Un problema emergente riguarda anche la presenza di specie bentoniche lungo i litorali lacustri e fluviali. Nel perifiton colonizzante le pietre (epiliton) del litorale del lago di Albano sono stati riscontrati cianobatteri appartenti ai generi *Anabaena*, *Aphanothece*, *Calothrix*, *Cylindrospermum*, *Lyngbya*, *Nostoc*, *Microcoleus*, *Phormidium*, *Pseudanabaena* e *Synechocystis* (Godeas, 2012). Le analisi – eseguite mediante spettrometria di massa MALDI-TOF (*Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight*) su campioni di epiliton prelevati in quattro stagioni diverse (da estate 2009 a primavera 2010) – non hanno rilevato la presenza di cianopeptidi, anche se è noto in letteratura che molte di queste specie bentoniche possono produrre cianotossine (CTX) e sostanze di rilevanza sanitaria (Mez *et al.*, 1997; Mez *et al.*, 1998; Baker *et al.*, 2001; Oudra *et al.*, 2002; Quesada *et al.*, 2004; Dasey *et al.*, 2005;

Gugger *et al.*, 2005; Surakka *et al.*, 2005; Lopes *et al.*, 2010; Manganelli *et al.*, 2012; Quiblier *et al.*, 2013).

Il lago di Averno, nel complesso dei Campi Flegrei (Napoli), ha una profondità massima di 35 m. In questo lago si sono verificate fioriture di *P. rubescens* in marzo-giugno 2007 e *Microcystis* spp. in ottobre-novembre 2008 (Ferranti *et al.*, 2008; Gallo *et al.*, 2009). Durante le fioriture di *P. rubescens* (non ci sono dati sulle densità raggiunte) sono state caratterizzate due nuove forme di anabenopeptine (B e F) e una nuova variante di MC-RR (Ferranti *et al.*, 2008; Ferranti *et al.*, 2009), mentre durante le fioriture di *Microcystis* (anche in questo caso non ci sono informazioni sulla densità del bloom) è stata trovata CYN, sia in acqua (0,54 e 1,8 ∝g/L) che negli estratti di cianobatteri (334 ng/g peso fresco) (Gallo *et al.*, 2009). Gli autori suppongono che la CYN sia stata prodotta da *Aphanizomenon*, presente a densità troppo basse rispetto a *Microcystis*, e per questo non osservata nei campioni analizzati.

A7.1.2.2. Laghi artificiali

Nelle Marche ci sono diversi invasi artificiali, il cui utilizzo va da quello irriguo a quello di tipo potabile e ricreativo. Essi sono interessati da fioriture di *P. rubescens*, nonostante siano caratterizzati generalmente da una condizione di oligotrofia. Dati sul lago di Gerosa risalenti al 2006 hanno mostrato una dinamica annuale di *P. rubescens* simile ad altri laghi profondi, con densità cellulari inferiori a quelle riportate per i laghi più eutrofici, con un massimo superficiale invernale di circa 6×10^7 cell/L e una popolazione costante metalimnetica di circa 10^7 cell/L. Durante la fioritura invernale si sono avuti comunque fenomeni di formazione di schiume superficiali. È stato suggerito che le fioriture siano state possibili, nonostante concentrazioni di azoto (N) e fosforo (P) quasi sempre al di sotto del limite di rivelabilità, grazie ad un'intensa attività di riciclo dei batteri (Manganelli *et al.*, 2010). Dal 1998 *P. rubescens* dà origine a fioriture periodiche anche nel Lago Fiastrone e nei bacini ad esso collegati. I dati relativi al 2011 hanno mostrato la presenza di popolazioni durante tutto l'anno, con le stesse dinamiche sopra descritte: elevate densità cellulari in profondità durante il periodo estivo e in superficie durante il periodo invernale. Nel Lago Fiastrone la concentrazione di MC, in superficie, non ha mai superato valori di 0,2 µg/L mentre nel Lago Castreccioni, in due campionamenti di profondità, sono stati raggiunti i 2,5 µg/L. Anche in questi invasi i livelli di fosforo totale e azoto sono tipici di acque oligotrofiche (ARPAM, 2011).

A7.1.2.3. Laghi alluvionali

La specie *C. raciborskii,* di origine tropicale e sub-tropicale, da anni risulta essere il cianobatterio dominante nel Lago Trasimeno durante il periodo estivo, a partire da giugno inoltrato, fino alla fine di settembre. Nella stagione balneare 2012, a fronte di una riduzione delle densità medie massime di *C. raciborskii* (6×10^7 cell/L *vs* 10^8 cell/L nel triennio precedente) la specie *Planktothrix agardhii* ha iniziato a proliferare da fine agosto fino a diventare dominante alla fine di settembre, con valori massimi di densità fino a 6×10^7 cell/L. Nel triennio precedente, 2009-2011, erano già state osservate delle variazioni nella composizione in specie della comunità di cianobatteri tossici, con la comparsa, seppure sporadica, di specie di *Microcystis* (*Microcystis* cf. *ichthyoblabe*, *Microcystis aeruginosa* e *Microcystis* spp.). Inoltre, *P. agardhii* mostrava una lieve e graduale riduzione dal 2009 al 2011, con densità medie intorno ai $5\text{-}8\times10^6$ cell/L (ARPA Umbria, 2012).

CYN sono state rilevate in tracce una sola volta, a settembre 2004 (Manti *et al.*, 2005). Più recentemente, per la prima e unica volta nel mese di settembre 2011, sono state rilevate MC in concentrazioni molto basse (Manganelli, com. pers.). In questo caso la sola specie presente era

P. agardhii. Le MC trovate in una sola occasione fanno pensare a possibili variazioni nel rapporto fra genotipi tossici e non tossici delle popolazioni di *P. agardhii*.

Il lago costiero di acqua dolce di Massaciuccoli (Toscana) è interessato dalla presenza di *M. aeruginosa*. Nel 2003 sono stati registrati livelli di MC fino a 160 µg/L in acqua, mentre valori ben più elevati sono stati riscontrati nell'epatopancreas di esemplari appartenenti alla specie *Mugil cephalus* e nella porzione cefalica del gambero di acqua dolce *Procambrus clarkii* (Simoni *et al.*, 2004).

A7.1.3. Area meridionale e insulare

Proliferazioni metalimnetiche estive di *P. rubescens* nel Lago di Occhito, un invaso artificiale sul confine tra Puglia e Molise, durante la stratificazione termica, sono già state descritte nel capitolo A1. A giugno 2009, densità significative di *P. rubescens* erano rilevate per tutta la lunghezza dell'invaso (circa 13 km) in uno strato fra 7 e 14 m di profondità, al limite della zona eufotica (Copetti *et al.*, 2010). In primavera (aprile 2009), in condizioni di debole stratificazione termica, i dati raccolti sottodiga indicavano valori di densità medi superiori a 80×10^6 cell/L, con un picco di circa 95×10^6 cell/L situato a 5 m di profondità nell'incipiente termoclino e concentrazioni di MC totali pari a 30 µg/L (Copetti *et al.*, 2012; Guzzella *et al.*, 2011). Le densità di *P. rubescens* e i livelli di MC sono diminuiti nel tempo, anche se a tutto il 2011 sono rimasti su valori significativi (densità fra $20\text{-}40\times10^6$ cell/L e MC fra 0,5-1 µg/L, test ELISA) (Bogialli *et al.*, 2013).

Nel 2009, a seguito della fuoriuscita di acqua dal bacino a causa di forti piogge, e al suo arrivo al mare, dove sono presenti numerosi impianti di mitilicultura, è stato avviato un programma di monitoraggio nell'acqua e negli organismi degli impianti, per controllare i livelli eventuali di MC (De Pace *et al.*, 2014). MC sono state rinvenute sia in acqua di mare (fra 0,1 e 0,6 ∝g/L nei periodi maggio-luglio 2009 e gennaio-giugno 2010) che nei mitili degli impianti (fra ~3 e 60 ng/g, nello stesso periodo) (test ELISA).

A7.1.3.1. Isole

Imponenti fioriture superficiali di *P. rubescens* sono state registrate con regolarità nei mesi autunnali e invernali in diversi bacini artificiali siciliani eutrofici a partire dal 2005/2006. In particolare, nel Lago Pozzillo, il maggiore bacino artificiale siciliano, sono stati riscontrati valori di densità superiori a 50×10^9 cell/L (≈ 5600 mm^3/L) alla fine di dicembre 2005 (Naselli-Flores *et al.*, 2007). *P. rubescens* in quel periodo formava una patina galleggiante di colore viola scuro spessa circa 60 cm su gran parte della superficie lacustre. La specie è stata contemporaneamente osservata in altri tre bacini artificiali con dinamiche paragonabili: inizio della crescita al termine della stratificazione estiva, picco tra gennaio e febbraio e termine della fioritura all'inizio del nuovo periodo di stratificazione (fine marzo). Misure effettuate su campioni raccolti al picco della fioritura hanno rivelato la presenza di varianti demetilate di MC-RR (95%), MC-LR (3%) e una variante di MC sconosciuta (2%). La concentrazione totale di MC (calcolata come MC-LR equivalenti, MC-LReq) era di 34 µg/L, corrispondente ad una quota cellulare di MC pari a 6 µg/mm^3. Le ragioni di queste fioriture superficiali di *P. rubescens* sono probabilmente da ricercare anche in un aumento delle precipitazioni autunnali in linea con quanto predetto da una serie di modelli climatici (Tin, 2006). Le elevate precipitazioni autunnali registrate negli ultimi anni in Sicilia hanno marcato l'inizio della circolazione invernale causando una diminuzione della trasparenza dell'acqua. La presenza di un inoculo metalimnetico di *P. rubescens* durante il periodo estivo, l'elevata torbidità della colonna d'acqua, l'ingresso di nutrienti dal bacino imbrifero e l'abbassamento delle temperature dei corpi idrici hanno generato condizioni simili a quelle

presenti nel metalimnio in tutta la colonna d'acqua favorendo lo sviluppo delle fioriture superficiali.

Osservazioni condotte su un bacino artificiale siciliano ipereutrofico nel periodo 1998-2002 hanno evidenziato la presenza, nel periodo compreso tra giugno e ottobre, di gruppi fitoplanctonici costituiti quasi esclusivamente da *Microcystis* spp. (Naselli-Flores & Barone, 2003). Queste fioriture, che formavano aggregati galleggianti spessi diverse decine di centimetri su gran parte della superficie lacustre, hanno fatto registrare picchi di densità cellulare superiori a 10^{10} cell/L e concentrazioni di tossine (misurate MC-LReq) superiori a 2.500 µg/L (Naselli-Flores *et al.*, 2007). Misure gestionali volte ad impedire la rottura estiva del termoclino, adottate dal 2003 in poi dall'ente gestore del corpo idrico, si sono rilevate efficaci nel ridurre drasticamente i valori sopracitati (Naselli-Flores & Barone, 2005; Naselli-Flores, 2014).

Nel Biviere di Gela, uno stagno naturale, *C. ovalisporum* fiorisce irregolarmente in estate quando la temperatura dell'acqua supera i 27°C. La specie ha cominciato a manifestarsi quando la vegetazione acquatica del lago, a causa di una alterazione del bilancio idrico, si è estinta trasformando il lago da un ambiente dominato da piante acquatiche e caratterizzato da elevati valori di trasparenza ad un ambiente torbido dominato dal fitoplancton (Barone *et al.*, 2010). I periodi tardo estivi (fine agosto-settembre) sono generalmente dominati da *C. raciborskii* con valori di biovolume al di sotto di 10 mm^3/L.

Molti bacini artificiali della Sardegna sono stati interessati negli anni da fioriture di cianobatteri, con variazioni annuali nelle specie dominanti. Nel lago Alto Flumendosa, per esempio, le cui acque sono utilizzate oltre che per la produzione di energia elettrica anche per l'allevamento di trote, per l'irrigazione e per uso potabile, fra gli anni 90 e 2010 è sempre stata presente una comunità cianobatterica ricca ed estremamente variabile. Le specie dominanti sono, alternativamente, *P. rubescens*, *W. naegaeliana*, *Microcystis botrys*, *Dolichospermum* spp. Negli anni è stata comunque osservata una tendenza alla diminuzione della densità cellulare (intorno ad un ordine di grandezza) (Begliutti *et al.*, 2007; Meregalli *et al.*, 2002; Lugliè *et al.*, 1997; Scardala *et al.*, 2013). In uno studio condotto fra il 2011 e la primavera del 2013, le specie dominanti in superficie sono state *P. rubescens* nei mesi invernali e *W. naegeliana* nei mesi primaverili-estivi, con presenza costante a densità molto inferiori di *M. botrys* e *Dolichospermum* spp. Un'analisi multidisciplinare, che ha analizzato il profilo delle MC prodotte e la presenza dei geni per la tossicità nelle diverse specie, ha permesso di attribuire la produzione delle poche MC rilevate a *P. rubescens* e *M. botrys* (Scardala *et al.*, 2013).

In una serie di campionamenti effettuati fra la fine degli anni 90 e il 2004 in molti altri laghi della Sardegna, la specie dominante era *M. aeruginosa*, e le varianti di MC più abbondanti erano conseguentemente MC-LR e MC-YR (Messineo *et al.*, 2009).

A7.2. Principali specie di cianobatteri tossici in Italia e indicazioni sulla produzione di tossine

Informazioni sulla produzione di cianotossine da parte delle specie tossiche e sui fattori che più le influenzano possono essere molto utili per prevedere e conoscere l'eventuale tossicità della fioritura, uno dei parametri necessari per prendere le opportune misure di prevenzione e recupero. Nonostante l'enorme quantità di studi svolti negli ultimi anni non sono ancora stati completamente chiariti tutti i meccanismi e i fattori di controllo che regolano la formazione e produzione delle cianotossine. Ma nonostante questa carenza di informazioni e di conoscenze, alcuni aspetti cominciano ad essere riconosciuti.

Nei seguenti paragrafi vengono riportate le informazioni al momento disponibili sulla produzione di tossine delle specie più importanti nel nostro Paese.

A7.2.1. Specie che formano fioriture superficiali durante il periodo di balneazione

A7.2.1.1. *Dolichospermum lemmermannii*

I morfotipi planctonici del genere *Anabaena* sono stati recentemente trasferiti nel genere *Dolichospermum*, per distinguerli dalle specie bentoniche, che hanno mantenuto il vecchio nome (Wacklin *et al.*, 2009).

Nei laghi dell'Italia settentrionale e in parte anche per i laghi delle zone meridionali e insulari, la specie più importante dal punto di vista della balneazione e delle attività ricreative estive dovuto allo sviluppo di fioriture superficiali nei mesi più caldi, è *D. lemmermannii*. Tuttavia, si hanno solo due segnalazioni occasionali sulle tossine presenti durante le sue fioriture, una relativa al lago di Como nel 2012, quando sono state rilevate concentrazioni di 3,2 µg/L di ATX-a, e una relativa al Lago Maggiore nel 2005, quando invece sono state trovate concentrazioni superiori a 1 µg/L di MC. È evidente che vi è una carenza di informazioni sulla produzione quali- e quantitativa delle cianotossine soprattutto in virtù della maggiore diffusione di questi organismi nei vari laghi italiani.

È comunque riportato anche in letteratura che ceppi di questo cianobatterio possono produrre tossine differenti.

In Danimarca, da alcuni ceppi isolati durante una fioritura che ha causato la morte di alcuni uccelli è stata identificata l'anatossina-a(s) (Henriksen *et al.*, 1997; Onodera *et al.*, 1997), che ha caratteristiche neurotossiche e per la quale sono disponibili poche informazioni (*vedi* capitolo A2), né tantomeno sono disponibili informazioni sulla genetica e sul ruolo ambientale di questa tossina. *D. lemmermannii* è stata anche associata alla presenza di saxitossine (STX), sempre in Danimarca, dove sono state trovate concentrazioni fra 5,9 and 224,1 µg/g peso secco di STXequivalenti (Kaas & Henriksen, 2000) e in acque interne finlandesi (Rapala *et al.*, 2005), dove è stata trovata in concentrazioni fra 103 e 930 µg/g peso secco. I laghi nei quali è stata trovata la tossina appartenevano ad un ampio spettro di trofia, da oligotrofici a ipereutrofici, tutti però caratterizzati da un elevato rapporto N:P, dove quindi il fosforo era il nutriente limitante.

In un lago oligotrofico finlandese la produzione di MC è stata associata alla presenza di *D. lemmermannii* (Lindholm *et al.*, 2003); altre osservazioni sulla produzione di MC e ATX-a sono relative solo a ceppi di *Anabaena* spp., isolati da altri laghi finlandesi in diversi anni (Rapala & Sivonen, 1998; Rapala *et al.*, 1997). I ceppi di *Anabaena* produttori di MC hanno mostrato una notevole variabilità per le varianti prodotte e anche una diversa risposta ai fattori chimico-fisici come la temperatura, l'intensità di luce e la concentrazione di nutrienti (Rapala *et al.*, 1997). I due ceppi di *Anabaena* spp. testati rispondevano a concentrazioni crescenti di fosforo sia con un aumento dei tassi di crescita che con un aumento di quota cellulare di MC. In ogni ceppo aumentavano i congeneri dominanti, rispettivamente MC-LR e MC-RR in *Anabaena* sp. 90 e le loro varianti demetilate nel ceppo 202A1. La mancanza di azoto nei terreni di coltura induceva una maggior produzione di tossine in entrambi i ceppi. Le risposte a variazioni di temperatura sono risultate più complesse. Nel ceppo 90 temperature maggiori di quella ottimale di crescita (25°C) riducevano significativamente la produzione sia di MC-LR che di MC-RR, ma temperature più basse riducevano molto di più la MC-RR rispetto alla MC-LR, che diminuiva lievemente. Nell'altro ceppo tutte e due le varianti venivano ridotte a temperature diverse da quella ottimale (Rapala *et al.*, 1997).

A7.2.1.2. *Microcystis* spp.

La tossicità delle fioriture di *Microcystis* può essere molto variabile, in quanto dipende dalla presenza o meno di genotipi tossici, dal tasso di produzione di MC e dal profilo dei congeneri prodotti, che hanno livelli di tossicità molto diversi (*vedi* capitolo A2). La produzione di MC in *Microcystis* è stata correlata positivamente con il tasso di crescita (Orr & Jones, 1998; Oh *et al.*, 2000), indirettamente ai fattori ambientali che limitano il tasso di crescita (Oh *et al.*, 2000) e al numero di individui tossici presenti nella popolazione totale (quelli che possiedono il cluster di geni *mcy*) (Hotto *et al.*, 2008; Okello *et al.*, 2010). La presenza nella popolazione di diversi genotipi è influenzata a sua volta dal tipo e dalla concentrazione di nutrienti. Concentrazioni elevate di N e P inorganici sembrano favorire la crescita di ceppi tossici (Davis *et al.*, 2010). L'elevata densità cellulare sembra promuovere l'espressione del gene *mcyE* e la conseguente produzione di MC, anche nel giro di poche ore. Wood *et al.*, (2011) hanno osservato, infatti, che nell'arco temporale di una giornata, durante la fase di accumulo in superficie delle colonie di *Microcystis*, la quota intracellulare di MC è passata da 0,02 a 0,64 pg/cell in sole 5 ore (Wood *et al.*, 2011). Se la relazione fra densità cellulare e aumento nella produzione di tossine venisse confermata da altri studi, ci si potrebbe aspettare che nelle schiume superficiali la concentrazione di MC sia più alta di quanto si possa prevedere da dati sulla concentrazione media di MC per cellula e questo potrebbe avere implicazioni sull'esposizione ad aerosol.

Le MC sono le tossine più studiate e sono, pertanto, disponibili molte informazioni sia sulla loro genetica che sul loro possibile ruolo ecologico. Alla base della sintesi delle MC c'è la sintesi peptidica non-ribosomale mediata dalla peptide sintetasi non-ribosomale (*Non Ribosomial Peptide Synthetase*, NRPS), codificata da uno dei più grandi cluster genici conosciuti, il cluster genico *mcy*. In *Microcystis* comprende 10 geni trascritti con modalità bidirezionale. Ciascun modulo è responsabile per la attivazione, la solfurazione, la modifica e la condensazione di uno specifico amminoacido alla catena. Ortologhi dei geni *mcy* per la MC-sintetasi sono stati caratterizzati e sequenziati in molti altri cianobatteri tossici inclusi *Planktothrix*, *Nostoc*, *Anabaena* e *Nodularia* e ad oggi sono disponibili informazioni riguardanti anche la sintesi delle altre tossine (Neilan *et al.*, 2013). L'ipotesi di utilizzare metodi molecolari nel monitoraggio delle specie tossiche ha trovato perciò applicazione affiancando alla ricerca di cianotossine l'identificazione degli individui potenzialmente in grado di produrle.

Relativamente al loro ruolo ecologico, sono state formulate diverse ipotesi. Le MC rilasciate da cellule lisate sembrano svolgere un ruolo nella comunicazione intraspecifica in situazioni di stress, in quanto inducono risposte fisiologiche implicate in meccanismi di resistenza nelle cellule adiacenti ancora integre (Schatz *et al.*, 2007). Inoltre, le MC avrebbero anche più di un ruolo intracellulare: conferiscono una maggiore fitness in caso di limitazione da CO_2 (Jahnichen *et al.*, 2007) e in caso di stress ossidativo si legano covalentemente ad una serie di proteine del metabolismo del carbonio e dell'azoto, svolgendo un'azione protettiva (Zilliges *et al.*, 2011). Neilan *et al.* (2013) suggeriscono che, durante una fioritura, le regolazioni fini che avvengono a livello di espressione genica di *M. aeruginosa*, influenzate dall'intensità della luce e dalla disponibilità di ferro, hanno ripercussioni più generali sulla composizione relativa della popolazione in genotipi tossici e non tossici. I due genotipi, tossico e non tossico, coesistono durante le fioriture in quanto ognuno è più idoneo in condizioni diverse. In condizione di elevata densità cellulare, la CO_2 diviene un fattore limitante per la crescita e il genotipo tossico sembra favorito perchè sembra possedere una maggiore affinità per la CO_2 (Jannichen *et al.*, 2007). Un'altra strategia per sopperire alla carenza di CO_2, è di disporsi negli strati più superficiali del bacino (Van de Waal *et al.*, 2011), dove le cellule tossiche hanno la possibilità di proteggersi dall'elevata intensità della luce (Zilliges *et al.*, 2011). D'altra parte, se il genotipo tossico ha una maggiore richiesta di N e P (per la produzione di tossine e pigmenti fotosintetici), può svilupparsi solo in condizioni di concentrazioni elevate di nutrienti, condizioni che si

verificano all'inizio di una fioritura. Verso la fine della fioritura, quando ormai i nutrienti sono largamente consumati, sembra favorito il genotipo non tossico (Davis *et al.* 2010).

Microcystis è uno dei generi più diffusi in Italia (Viaggiu *et al.*, 2011), ma non sembra aver dato luogo a fioriture importanti negli anni più recenti. Soprattutto nelle regioni settentrionali, dove in alcuni casi è stata sostituita da altri generi (es. il Lago di Como), la sua presenza sembra essere significativa solo in alcuni laghi minori (es. il Lago di Montorfano, Como). In alcuni invasi artificiali siciliani, azioni di prevenzione e risanamento intraprese hanno dato risultati positivi, riducendo drasticamente le densità cianobatteriche e conseguentemente le concentrazioni di cianotossine.

A7.2.1.3. *Cylindrospermopsis raciborskii*

C. raciborskii è una specie di origine tropicale, inizialmente trovata in Africa centrale e nei laghi Australiani. A partire da metà degli anni '90, è stata descritta anche in molte aree temperate europee, compresa l'Italia (Borics *et al.*, 2000; Dokulil & Mayer, 1996; Briand *et al.*, 2002; Fastner *et al.*, 2003; Kokocinski *et al.*, 2009; Saker *et al.*, 2003; Manti *et al.*, 2005) e in molti laghi Sud-Americani (Castro *et al.*, 2004). In coltura è stato osservato che i ceppi delle diverse aree geografiche producono tossine diverse: il ceppo australiano produce CYN (Saker & Griffiths, 2000), quello brasiliano produce STX (Lagos *et al.*, 1999) e quello europeo tossine ancora sconosciute (Fastner *et al.*, 2003; Antal *et al.*, 2011; Acs *et al.*, 2013). Recentemente 4 ceppi di *C. raciborskii,* isolati da un lago ungherese, sono stati testati con 4 saggi biologici diversi e aspecifici. La loro tossicità è stata confrontata con quella di un ceppo produttore di ATX (*Oscillatoria* spp. PCC 6506) e un ceppo produttore di CYN (*C. raciborskii* AQS). I livelli di EC_{50} (*Effective Concentration*: concentrazione in grado di ridurre parametri funzionali specifici del 50%)/LC_{50} (*Lethal Concentration*: concentrazione alla quale muore il 50% degli individui testati) misurati sugli estratti dei 4 ceppi, pur non essendo presenti nè ATX nè CYN (analisi eseguite con HPLC-MS/MS *tandem mass*), erano comparabili con i livelli ottenuti con *Oscillatoria* PCC 6506 e superiori di un ordine di grandezza ai livelli di *C. raciborskii* AQS (Acs *et al.*, 2013). Inoltre, uno studio su estratti acquosi di un bloom di *C. raciborskii* in un lago ungherese e su un ceppo isolato da un altro lago, ha confermato un'azione neurotossica, simile a quella delle anatossine (Vehovszky *et al.*, 2013).

Nel caso di *C. raciborskii*, l'analisi molecolare non è sempre utile ad individuare il tipo di tossine prodotte dai vari ceppi. Per esempio, gli studi su due ecotipi di *C. raciborskii* sudamericani hanno evidenziato la produzione di STX invece di CYN. Questi ecotipi possiedono un cluster di geni *cyr* simile al 99% ad un ceppo australiano e uno tedesco di *C. raciborskii* e ad un ceppo di *Aphanizomenon* spp., tutti produttori di CYN (Piccini *et al.*, 2013).

In Italia, nonostante *C. raciborskii* sia da anni la specie dominante nel Lago Trasimeno (PG) con abbondanti fioriture durante il periodo estivo, solo una volta, a settembre 2004, sono state rilevate tracce di CYN (Manti *et al.*, 2005). Nel lago di Albano è stata osservata un'unica fioritura a luglio 2004, di $\sim 5 \cdot 10^6$ cell/L, con una concentrazione di CYN pari a 0,003 pg/cell (Messineo *et al.*, 2010). In alcuni piccoli laghi settentrionali dove si sono registrate sporadiche fioriture di *C. raciborskii,* non si hanno dati sulle tossine. Considerata dunque la scarsa conoscenza sulla produzione di tossine da parte di questo organismo nei bacini italiani, si riportano alcune delle informazioni disponibili sulle interazioni fra diversi fattori ambientali con la produzione di CYN e STX e con la regolazione della trascrizione genica.

Analizzando l'effetto di diversi fattori ambientali sulla produzione di CYN e sul tasso di crescita in *C. raciborskii*, un elemento sembra essere costante: il tasso di crescita risponde generalmente nel modo inverso rispetto alla produzione di tossine. In 6 ceppi australiani di *C. raciborskii* un aumento di temperatura da 25 a 35°C ha stimolato la velocità di crescita ma ha inibito quasi totalmente la produzione di CYN (Saker & Griffiths, 2000). In un altro studio,

colture di *Cylindrospermopsis* cresciute con una fonte di azoto, costituita da ammonio, hanno mostrato valori elevati nel tasso di crescita e una bassa concentrazione di CYN, mentre colture cresciute in assenza di azoto, hanno mostrato un basso tasso di crescita e una alta concentrazione di CYN (Saker & Neilan, 2001). Anche la luce sembra esercitare un effetto opposto sui tassi di crescita e sulla produzione di tossine. In uno studio di Dyble *et al.*, (2006), sono state testate diverse intensità di luce su colture cresciute in assenza di N. Il maggiore tasso di crescita coincideva con l'intensità di luce minore contrariamente alla concentrazione di CYN, che era massima alla massima intensità testata.

Il cluster di geni per la produzione della CYN è stato individuato in molte specie, con una similarità fra il 75 e il 95%, ma con delle differenze nell'organizzazione dei geni (Neilan *et al.*, 2013). La luce e la disponibilità di fosforo inorganico sembrano influenzare la trascrizione in *C. ovalisporum*. Una esposizione, nell'arco di 48 ore, ad una elevata intensità di luce stimola la trascrizione di alcuni geni coinvolti, mentre sembra che questa sia inibita per periodi di esposizione più brevi (8 ore) (Shalev-Malui *et al.*, 2008). La limitazione di P sembra aumentare la trascrizione e la produzione di CYN (Bar-Yosef *et al.*, 2010) ma è stato anche osservato un effetto contrario, con una riduzione nella produzione di CYN (Bacsi *et al.*, 2006). La disponibilità di azoto non sembra variare significativamente la trascrizione di 4 geni del cluster in *C. raciborskii* (Stucken *et al.*, 2010).

Le STX sono prodotte da *C. raciborskii* in Sud America (Carneiro *et al.*, 2009; Castro *et al.*, 2004), da *Aphanizomenon* spp. in Portogallo (Dias *et al.*, 2002) successivamente identificata come *Aphanizomenon issatschenkoi* (Valerio *et al.*, 2009) e *Raphidiopsis brookii* in Brasile (Yunes *et al.*, 2009). I pochi studi disponibili riguardanti i fattori ambientali in grado di influenzare la produzione di STX sono relativi a queste specie di cianobatteri, poco confrontabili, e forniscono dati a volte contraddittori. Per esempio, in *C. raciborskii è stato osservato che* a temperature maggiori di quella ottimale di crescita (25°C) la quota cellulare di STX si riduce (Castro *et al.*, 2004) mentre aumenta in *Aphanizomenon* spp. (Dias *et al.*, 2002). Sempre in *C. raciborskii* anche la salinità e la durezza dell'acqua influenzano in modo variabile la produzione di STX; per esempio, una salinità crescente determina un aumento nella produzione di STX. Questo suggerisce, anche in base al meccanismo di azione della tossina sulla pompa cationica della membrana, un ruolo di queste molecole nel mantenimento dell'equilibrio omeostatico cellulare (Pomati *et al.*, 2004; Carneiro *et al.*, 2013). L'aumento di durezza dell'acqua, per un aumento di $CaCO_3$, inibisce sia la crescita che la produzione di STX, mentre maggiori concentrazioni di $MgCO_3$ aumentano il metabolismo, la crescita e la produzione di tossine (Carneiro *et al.*, 2013). Se la composizione in ioni sembra influenzare in modo simile tassi di crescita e produzione di STX (aumentano o diminuiscono entrambi), l'intensità di luce ha effetti differenti. A 100 e a 150 µmol photons m^{-2} s^{-1} sono stati osservati tassi di crescita simili e la massima e la minima produzione di STX, rispettivamente (Carneiro *et al.*, 2009). Inoltre, all'intensità di luce di controllo (50 µmol photons m^{-2} s^{-1}) corrispondeva un tasso di crescita minore e una produzione elevata di STX (vicina al massimo osservato a 100 µmol photons m^{-2} s^{-1}). Sia a 50 che a 100 µmol photons m^{-2} s^{-1} la produzione di tossine seguiva un marcato ciclo circadiano (diminuzione di produzione al buio e aumento alla luce) (Carneiro *et al.*, 2009). Questi risultati, anche se complessi e a volte contraddittori, forniscono comunque delle indicazioni su alcuni dei fattori ambientali che possono essere importanti nel determinare la tossicità di una fioritura di specie che producono STX.

A7.2.1.4. *Aphanizomenon flos-aquae*, *Chrysosporum ovalisporum*

Alcune informazioni sulle diverse tossine prodotte dal genere *Aphanizomenon*, STX e CYN, sono state descritte nei paragrafi precedenti. Oltre alle tossine già citate, *Aphanizomenon* spp. può produrre MIC e ATX-a.

Anche in Italia, la specie *C. ovalisporum*, responsabile di molte fioriture nel Lago di Albano, è stata associata in questo lago alla produzione di CYN, con una concentrazione intracellulare molto variabile, fra 0,03 e 424,53 µg/g (Messineo *et al.*, 2010). Informazioni relative agli effetti di luce e disponibilità di fosforo sulla produzione di CYN sono state riportate nel paragrafo precedente.

La specie *Aph. flos-aquae* invece, che è stata responsabile di più di una fioritura nel Lago di Annone (Italia settentrionale) sembrerebbe produrre ATX-a. Dati in letteratura sulle specie produttrici di ATX fanno riferimento ad *Aphanizomenon* sp. (Rapala *et al.*, 1993; Rantala-Ylinen *et al.*, 2011) o alla specie *Cuspidothrix issatschenkoi* (Wood *et al.*, 2007; Ballot *et al.*, 2010; Gagnon, 2012; Gagnon & Pick, 2012). I pochi dati disponibili suggeriscono che la produzione di tossina sia indipendente dalla crescita cellulare. La produzione di tossina sembra favorita dalla limitazione da N e inibita da temperature elevate, che non sembrano avere effetti sulla crescita. Elevate intensità di luce inibiscono la produzione di tossina in *Anabaena* ma non in *Aphanizomenon* (Rapala *et al.*, 1993). Il cluster di geni per la produzione di ATX presenta delle similarità nelle sequenze ma una diversa organizzazione dei geni, sia in *Oscillatoria* PCC6506 (Mejean *et al.*, 2009) che in *Anabaena* sp. 37 (Rantala-Ylinen *et al.*, 2011). Per i meccanismi di regolazione non ci sono ancora dati esaustivi in letteratura. I dati disponibili al momento, pertanto, pur non essendo sufficienti a dare indicazioni sui fattori che influenzano la produzione di ATX-a, possono comunque essere utili per il riconoscimento in campioni naturali delle specie produttrici.

In Germania e in Francia *Aph. flos-aquae* produce CYN (Preußel *et al.*, 2006; Brient *et al.*, 2009). Similmente a quanto osservato per la produzione di ATX, aumenti di temperatura da 16 a 25°C corrispondono ad una diminuzione della produzione di CYN, in un range approssimativamente fra 0,1 e 0,3 pg/cell (calcolato assumendo un volume medio per cellula di 200 μm^3, in quanto i dati sono espressi per volume), senza influenzare i tassi di crescita (Preußel *et al.*, 2009).

A7.2.2. Specie che formano fioriture superficiali in momenti diversi dal periodo di balneazione

A7.2.2.1. *Planktothrix rubescens*

Di tutte le specie che non rappresentano un particolare pericolo durante la balneazione, ma che comunque possono rappresentare un problema sanitario in altri momenti dell'anno, anche in relazione all'utilizzo delle acque per scopi potabili, *P. rubescens* è senz'altro la più importante. Nel capitolo A1 si è estesamente parlato della sua ecologia, pertanto qui saranno riportati gli aspetti più importanti legati alla sua tossicità. Essendo principalmente produttrice di MC, alcune delle osservazioni già riportate per *Microcystis* valgono anche per questa specie. Per esempio, la concentrazione di fosforo agisce indirettamente sulla produzione di tossine attraverso l'effetto sui tassi di crescita (Briand *et al.*, 2005). Anche in questo caso, riveste molta importanza il rapporto relativo fra genotipi tossici e non tossici (Briand *et al.*, 2008, Manganelli *et al.*, 2010). Il numero di individui con geni *mcy* non attivi potrebbe spiegare la mancanza di correlazioni fra il numero di individui tossici (possessori del gene) e la concentrazione di MC (Kurmayer *et al.*, 2004). In uno studio annuale sul Lago di Gerosa, un lago oligotrofico, è stata osservata una correlazione positiva fra la concentrazione di fosforo e il numero di individui tossici e un rapporto tossici/non tossici significativamente maggiore nelle stazioni di profondità (Manganelli *et al.*, 2010). Analoga situazione è stata parzialmente verificata anche nel lago meso-eutrofico di Vico (Funari *et al.*, 2011). Se quanto osservato venisse confermato anche in altri studi simili, la distribuzione nella colonna d'acqua delle cellule potrebbe avere una importanza strategica per quel che riguarda le modalità di campionamento. Un altro aspetto specifico di *P. rubescens*,

osservato più volte negli invasi delle nostre regioni, riguarda la produzione relativa delle varianti di MC. Generalmente la maggior parte delle MC prodotte sono: le MC-RR e le sue varianti demetilate e in modo variabile ma meno significativo le MC-LR, dementi-MC-LR e MC-YR (Briand *et al.*, 2005; Ernst *et al.*, 2009; Manganelli *et al.*, 2010). Questi diversi profili sembrano correlati a polimorfismi nel cluster genico della demetilazione (Kurmayer *et al.*, 2005).

Non ci sono dati sull'eventuale regolazione dell'espressione, come è stato invece dimostrato in *Microcystis* (Wood *et al.*, 2011).

A7.2.3. Specie bentoniche presenti in piccoli bacini

Negli ultimi 20 anni, a livello globale è stato documentato un crescente numero di cianobatteri bentonici producenti tossine sia in ambienti lotici che lentici (acque correnti e non). Alcuni avvelenamenti di animali in prossimità di questi ambienti sono stati associati all'ingestione di questi organismi. Specie bentoniche di *Phormidium* sp. e *Oscillatoria* sp. che producevano ATX-a hanno causato la morte di cani che andavano ad abbeverarsi (Edwards *et al.*, 1992; Gugger *et al.*, 2005; James *et al.*, 2005; Puschner *et al.*, 2008). Nelle sorgenti calde, sulle rive del lago alcalino Bogoria, in Kenia, le MC e le ATX prodotte da *Phormidium terebriformis*, *Oscillatoria willei*, *Spirulina subsalsa* e *Synechococcus bigranulatus*, sono state ritenute una possibile causa della morte dei fenicotteri minori (Metcalf *et al.*, 2006).

Le cianotossine più comunemente prodotte dai cianobatteri bentonici sono ATX e MC ma sono stati identificati anche cianobatteri bentonici che producono CYN e STX (Heath *et al.,* 2010).

Patine coerenti di cianobatteri, dette comunemente *mat*, possono formarsi sul sedimento e sulle rocce del fondale di fiumi e laghi. Queste *mat* possono svilupparsi anche in laghi oligotrofici (Mez *et al.,* 1997), le cui acque possono essere sufficientemente trasparenti da permettere la penetrazione della luce. Spesso gli alti tassi di fotosintesi raggiunti da queste *mat* comportano che l'ossigeno prodotto e intrappolato al loro interno li renda sufficientemente leggeri da raggiungere la superficie (Chorus & Bartram, 1999) andando così a rappresentare un rischio per la salute delle persone e degli animali durante l'uso ricreativo delle acque.

I cianobatteri bentonici, come le specie planctoniche, producono tossine diverse in regioni diverse. Per esempio, due popolazioni australiane di *Lyngbya wollei* producevano CYN e deossiCYN a livelli significativi (Seifert *et al.*, 2007), mentre la stessa specie negli Stati Uniti produceva STX (Carmichael *et al.*, 1997). In California, in bacini per acqua potabile, sono stati isolati cianobatteri bentonici filamentosi che producevano elevate quantità di MC-LR per unità di biomassa (1,15 to 4,15 µg/mg di carbonio) (Izaguirre *et al.*, 2007). Numerose specie tossiche che producono MC, *Anabaena subcylindrica*, *Anabaena variabiles*, *Calothrix parietina*, *Nostoc spongiaeforme*, *Plectonema boryanum*, *Phormidium corium* e *Phormidium tenue* sono state isolate da *mat* sviluppatisi nel Nilo e in canali di irrigazione. Dai sedimenti di questi stessi bacini sono stati isolati ceppi tossici di *M. aeruginosa* (Mohamed *et al.*, 2006; Mohamed *et al.*, 2007). Colonie di cellule appartenenti a genotipi tossici di quest'ultima si rinvengono durante il periodo invernale, anche in grande quantità, nei sedimenti di laghi temperati, dove costituiscono l'inoculo per le successive fioriture limnetiche estive (Brunberg *et al.*, 2002; Latour & Giraudet, 2004; Verspagen *et al.*, 2004; Tan, 2012; Torres *et al.*, 2013).

Una nuova specie di un genere ritenuto esclusivamente planctonico come *Planktothrix*, è stata recentemente isolata da un biofilm proveniente da un fiume neozelandese (*Planktothrix* sp. VUW25) (Wood *et al.*,2010). Questo ceppo produce MC e si ritiene sia stato responsabile della morte di alcuni cani che si erano abbeverati al fiume.

Sono state riscontrate cianotossine anche in altri generi bentonici come *Fischerella* e *Aphanothece* (MC) (Heath *et al.*, 2010).

Alla luce di queste evidenze sarebbe quindi opportuno cominciare a considerare le specie bentoniche nei piani di monitoraggio dei cianobatteri tossici delle risorse d'acqua.

A7.3. Differenze e similitudini fra la situazione italiana e altri Paesi

Le fioriture algali tossiche (*Harmful Algal Blooms*, HAB) sono sempre più frequenti nei corpi idrici eutrofici in primavera, in estate e in inverno e sono in aumento in tutto il mondo (Gumbo *et al.*, 2008). I generi maggiormente coinvolti e che producono MC sono: *Microcystis*, *Anabaena*, *Planktothrix* e *Nostoc*.

Come è stato detto nel capitolo A1, l'eutrofizzazione è uno dei fattori che può favorire la proliferazione di cianobatteri. In Europa i rapporti sullo stato delle acque della EEA (*European Environment Agency*) del 2010 e 2012, riportano che, nonostante una tendenza alla diminuzione dell'introduzione di nutrienti nei terreni agricoli o in acque di trattamento, circa il 20-30% dei laghi e fiumi è ancora in condizioni eutrofiche (Collins, 2010; EEA, 2012). Anche negli USA il 20% dei laghi monitorati ha ancora problemi di eutrofizzazione (USEPA, 2009), determinando condizioni favorevoli per lo sviluppo massivo di cianobatteri (Chorus & Bartram, 1999). Oltre ai processi di eutrofizzazione, anche le conseguenze dei cambiamenti climatici globali (temperatura elevata, aumentate concentrazioni atmosferiche di anidride carbonica, elevati flussi UV) sono stati messi in relazione con l'ecologia e la crescita dei cianobatteri (Bláha *et al.*, 2009).

Una prima valutazione sullo sviluppo di cianobatteri tossici e sulla produzione di cianotossine (Chorus, 2005) ha evidenziato come questi organismi siano diffusi nella maggior parte dei corpi idrici europei, con un forte impatto sull'utilizzo di quest'ultimi come risorsa idrica sia finalizzato alla potabilizzazione, all'allevamento e all'acquacoltura, sia all'uso ricreativo-turistico e di conservazione.

A livello europeo, gli sforzi della ricerca di settore hanno aumentato la capacità di gestione del rischio. Resta ancora da migliorare la divulgazione delle informazioni tra gli Stati Membri relativa alla diffusione delle competenze tecniche e la condivisione di procedure di intervento per la gestione del rischio relativo a cianobatteri tossici e cianotossine (Carvalho *et al.*, 2013; WHO, 2003). Per questo è stata avviata CyanoCOST, un'azione a livello europeo (COST *European Cooperation in Science and Technology*) per coordinare e mettere in rete le competenze fra i vari paesi sulla gestione del rischio per esposizione ai cianobatteri e alle cianotossine (www.cyanocost.com).

Oltre che in acque eutrofiche, con concentrazioni non limitanti di fosforo e con un rapporto N/P compreso tra 10 e 15 (Merel *et al.*, 2013), sono noti casi di sviluppo massivo di cianobatteri tossici sia in ambienti oligotrofici (*Oscillatoria* spp. forme bentoniche; Mez *et al.*, 1998) sia in laghi profondi subalpini mesotrofici. In questi laghi, *P. rubescens* è la specie dominante nel lago di Zurigo (Svizzera), nel Mondsee (Austria), Ginevra (Francia e Svizzera), Nantua (Francia), e Bourget (Francia) (Briand *et al.*, 2005).

Il genere *Planktothrix* è cosmopolita e si sviluppa abbondantemente non solo nei laghi subalpini Europei, ma anche in diversi laghi della Germania e dei paesi nordici (Hossain *et al.*, 2012). Il genere comprende nove specie: *P. agardii*, *P. iwanoffiana*, *P. lacustris*, *P. miyadii*, *P. mougeotii*, *P. penornata*, *P. planctonica*, *P. pseudoargadii* e *P. rubescens* (Hossain *et al.*, 2012). Le più diffuse nei laghi temperati dell'emisfero settentrionale, pur possedendo nicchie ecologiche molto diverse, sono *P. rubescens* e *P. aghardii*. La prima si riferisce generalmente ai genotipi rossi ricchi di ficoeritrina, e si trova in laghi profondi, stratificati, oligo-mesotrofici; la

seconda indica generalmente i genotipi verdi ricchi in ficocianina e si trova in ambienti meno profondi, meso-eutrofici (Kurmayer *et al.*, 2005). Negli habitat dell'emisfero settentrionale *P. rubescens* è la specie più importante per la produzione di MC (Fastner *et al.*, 1999). Da uno studio effettuato su alcuni laghi del nord Europa con profondità variabili in cui le cellule di *Planktothrix* spp. sono state identificate morfologicamente in base alla pigmentazione (rossa e verde) e molecolarmente in base alla presenza o meno del gene *mcy*, è risultato che la maggior parte degli ecotipi rossi, provenienti da laghi profondi, erano quasi tutti tossici al 100%, mentre le popolazioni miste (con ecotipi rossi e verdi) provenienti da laghi meno profondi presentavano una elevata variabilità nella percentuale di genotipi tossici (Ostermaier *et al.*, 2012). Nel lago di Zurigo durante il periodo 1990-2008, gli ecotipi rossi erano sempre dominanti e presentavano una frazione di organismi tossici in media 106±8% (Ostermaier *et al.*, 2012). Gli autori suggeriscono che l'ecotipo rosso è dominante nei laghi profondi perché, rispetto all'ecotipo verde, è in grado di produrre vescicole gassose che resistono alla elevata pressione idrostatica. La popolazione con il genotipo tossico sarebbe mantenuta costante anche grazie alla funzione antiossidante delle MC, secondo quanto osservato da Zilliges *et al.* in *Microcystis* (2011). Durante il periodo di rimescolamento della colonna d'acqua, quando i filamenti sarebbero più esposti ad un'elevata intensità luminosa, le MC svolgerebbero una funzione protettiva (Ostermayer *et al.*, 2012). Quest'ipotesi potrebbe contribuire a spiegare perché la percentuale di individui tossici non sempre è correlabile con la concentrazione di MC. Questa mancanza di correlazione è stata osservata anche in due laghi dell'Italia centrale dove, tuttavia, le popolazioni di *P. rubescens*, sempre ecotipi rossi, presentavano un'elevata variabilità in termini di presenza del gene *mcyB*, raramente inferiore al 50% (Manganelli *et al.*, 2010; Funari *et al.*, 2011).

Oltre a cianobatteri filamentosi come quelli appartenenti ai generi *Planktothrix* e *Cylindrospermopsis*, le forme coloniali come *Microcystis* sono quelle che generalmente danno luogo a fioriture nei laghi poco profondi (Paerl *et al.*, 2011). Varie specie di *Microcystis* spp. sono, spesso, responsabili principali delle fioriture nelle acque eutrofiche e molti ceppi sono in grado di produrre MC. Nell'attuale sistema tassonomico Cyanophyta circa 30 specie del genere *Microcystis* sono state descritte da Komárek e Anagnostidis nel 1999 (Xu *et al.*, 2008). Nelle acque giapponesi, sono state osservate sei morfospecie, che secondo l'attuale tassonomia del Codice Botanico (Xu *et al.*, 2008) possono dare origine a fioriture: *M. aeruginosa* (Kuzing) Lemmermann, *Microcystis viridis* (A. Brown) Lemmermann, *Microcystis wesenbergii* (Komárek) Komárek, *Microcystis flos- aquae* (Wittrock) Kirchner, *Microcystis ichthyoblabe* Kutzing e *Microcystis novacekii* (Komárek) Compere, (Xu *et al.*, 2008). Di tutte queste specie, è stato dimostrato che sia le popolazioni naturali, durante le fioriture, sia i ceppi isolati in coltura di *M. aeruginosa* e *M. viridis* sono produttori di MC (Xu *et al.*, 2008).

M. wesenbergii, prima specie ad essere descritta da Komárek nel 1958 basandosi sulla morfologia dei margini della colonia, ha un'ampia distribuzione in tutto il mondo, tra cui l'Asia, l'Europa, l'America e l'Oceania (Xu *et al.*, 2008). Secondo Watanabe del 1996 *M. wesenbergii* non è una specie tossica (Xu *et al.*, 2008). Campioni di *M. wesenbergii* provenienti da alcuni laghi della Repubblica Ceca contenevano poche o in alcuni casi nessuna MC (Xu *et al.*, 2008). D'altra parte, però in alcuni laghi danesi fioriture epatotossiche di *Microcystis* sono state caratterizzate dalla presenza dominante di *M. wesenbergii* (Xu *et al.*, 2008). A differenza di ciò che accade nei laghi europei, dove *M. wesenbergii* è la specie meno frequente, nei laghi cinesi *M. wesenbergii* è la specie principale durante le fioriture (Xu *et al.*, 2008).

Nel genere *Microcystis* ci sono specie in cui la proporzione di cellule potenzialmente produttrici di MC può differire notevolmente da un lago all'altro. Per esempio, nel Lago di Wannsee (Germania) questa percentuale era tra lo 0 e il 40 %, come per il Lago Oneida (Stati Uniti), e il Lago di Mikata (Giappone). Al contrario, grandi variazioni nel tempo (6-93%) di

cellule in grado di produrre MC sono state trovate nel bacino Grangent (Francia). Tuttavia il cambiamento nei rapporti fra cellule producenti e non producenti MC potrebbe spiegare solo il 54 % della variabilità osservata nelle concentrazioni di MC, suggerendo che parte di questa sia dovuta alla variabilità di MC intracellulare. Questi risultati sono coerenti con quanto già affermato precedentemente, che i livelli di rischio legati alla presenza di peptidi tossici durante proliferazioni dei cianobatteri dipendono sia dalla proporzione di cellule producenti MC e non producenti, sia dalla quantità di MC prodotte da parte delle cellule tossiche (Sabart *et al.*, 2010).

Alcune specie dei generi *Aphanizomenon*, *Nodularia* e *Anabaena*, sono responsabili di estese fioriture nel Mar Baltico, che è uno dei bacini salmastri più grandi al mondo e dove lo sviluppo massivo di diverse popolazioni di cianobatteri è andato aumentando dalla fine degli anni '70 del secolo scorso (Sukenik *et al.*, 2007). La sua salinità è molto inferiore a quella delle acque marine a causa del forte apporto fluviale circostante e del limitato scambio con le acque marine del Mare del Nord. Le fioriture avvengono sul finire dell'estate, anche se *Anabaena* spp. è presente, generalmente, per poco meno del 10% del totale della comunità (Halinen *et al.*, 2007). In questo bacino l'insieme delle fioriture di *Aph. flos-aquae* e *Nodularia spumigena* può coprire una superficie maggiore di 100.000 km^2 (Halinen *et al.*, 2007). Diverse specie di *Anabaena* spp. sono presenti nelle acque costiere del Mar Baltico, nella sua parte più centrale e nel Golfo di Finlandia dove è stata riscontrata la loro presenza nei soli mesi estivi (Halinen *et al.*, 2007). All'ingresso del Golfo di Finlandia è stata rilevata la presenza di MC-LR in basse concentrazioni e non è stato possibile identificare con certezza la specie produttrice, anche se tale produzione è stata attribuita probabilmente ad *Anabaena* spp. (Halinen *et al.*, 2007). Esperimenti condotti in laboratorio su ceppi di *Anabaena* spp. isolati dal mar Baltico hanno dimostrato che molti degli isolati producevano MC (Halinen *et al.*, 2007; Engström-Öst *et al.*, 2011). Inoltre, ceppi di *Anabaena* produttori di MC sono stati identificati anche in Canada, Danimarca, Egitto, Finlandia, Francia e Norvegia (Sivonen & Jones 1999). Attualmente si ritiene che la presenza di tossine nel Mar Baltico sia dovuta soprattutto a *Nodularia spumigena*, che produce nodularina (Sivonen *et al.*, 1989), considerata la bassa densità di *Anabaena*, e considerato che *Aph. flos-aquae* in quell'area non produce tossine (Halinen *et al.*, 2007; Sivonen *et al.*, 1989).

Nell'ambito dei generi *Cylindrospermopsis* e tra i già citati *Aphanizomenon* e *Anabaena* sono stati identificati ceppi in grado di produrre CYN (Campo *et al.*, 2013). È stato osservato che i ceppi appartenenti al genere *Cylindrospermopsis* formano, all'interno della famiglia dei cianobatteri eterocistici Nostocales, un gruppo di origine monofiletica, mentre i ceppi appartenenti ai generi *Aphanizomenon* e *Anabaena* mostrano un'origine polifiletica. I ceppi di *Cylindrospermopsis* raggruppano in *cluster* in linea con le loro origini geografiche. La produzione di CYN sembra essere ristretta ai ceppi asiatici e australiani.

Chrysosporum (ex *Aphanizomenon*) *ovalisporum* (Forti), isolata per la prima volta da un lago vicino Istanbul, è considerata una specie tropicale invasiva di alcune regioni europee. Viene generalmente trovata in acque termicamente stratificate, i cui i valori di temperatura oscillano tra i 26°C e 30°C, risultando ottimali per la sua crescita. Popolazioni di questa specie sono state ritrovate in diverse regioni dell'area Mediterranea, del Nord America e dell'Australia. *C. ovalisporum*, generalmente, si distribuisce nelle zone eufotiche grazie alla presenza di vescicole gassose. Quando le condizioni ambientali diventano sfavorevoli per la crescita e per il mantenimento delle popolazioni, differenzia gli acineti che garantiscono la sopravvivenza della popolazione. Poiché sono sempre più frequenti lavori che riportano la produzione di CYN da parte di *C. ovalisporum*, si ritiene fondamentale, oltre ad utilizzare gli strumenti analitici attualmente disponibili per la determinazione di questa tossina, sviluppare metodiche veloci e sensibili per il monitoraggio della presenza e della proliferazione di *C. ovalisporum* nei vari corpi idrici.

Attualmente è molto difficile distinguere morfologicamente le varie specie appartenenti a questo genere. Ci sono specie, poi, che mostrano caratteristiche fenotipiche intermedie tra i due generi *Aphanizomenon/Chrysosporum* e *Anabaena*. Per esempio *Anabaena bergii*, non tossica, è morfologicamente molto simile a *C. ovalisporum* ma, nonostante le strette relazioni filogenetiche, i due taxa sono da considerarsi ben distinti sia per la morfologia che per la genetica e per la produzione di tossine (Stuken *et al.*, 2009). In studi recenti, nel Lago Kinneret (Israele), le strategie di sorveglianza e di gestione del rischio associato alla presenza di CYN prodotte da *C. ovalisporum* sono state complicate dalla difficoltà a distinguere ceppi tossici da quelli non tossici (Campo *et al.*, 2013). Attualmente *C. ovalisporum*, oltre ad essere rilevata in Israele, viene riportata anche in Australia, Spagna e Italia mentre *A. bergii* è stata osservata in Australia (Kokocinski *et al.*, 2013).

In Europa, sono state trovate, tra le specie che producono CYN, *Aph. flos-aquae* in Germania e *Anabaena lapponica* in Finlandia. Inoltre recenti studi hanno indicato *Aphanizomenon gracile* come potenziale produttore di questa tossina nelle acque tedesche. A parte la Germania, la Spagna, la Finlandia e l'Italia, la CYN è stata rilevata anche in altre località europee, tra cui il Portogallo, la Francia, e la Repubblica Ceca, dove *Anabaena planctonica* e *Aph. flos-aquae* var. *klebahnii* sono stati segnalati come potenziali produttori di CYN (Kokocinski *et al.*, 2013). Pertanto è probabile che la CYN sia ampiamente distribuita nelle acque europee, anche se l'elenco dei potenziali produttori di questa tossina rimane incompleto. Inoltre, ceppi di *C. raciborskii* produttori di CYN non sono stati ancora isolati sebbene venga comunemente rilevata in diverse regioni europee (Kokocinski *et al.*, 2013). In Polonia, CYN è stata ritrovata nel 2006 in due Laghi eutrofici poco profondi (Kokocinski *et al.*, 2009), e l'analisi molecolare, se pur preliminare, delle popolazioni presenti nei due laghi ha dimostrato che *Aphanizomenon* spp. era il principale responsabile della produzione di CYN nei laghi polacchi (Mankiewicz - Boczek *et al.*, 2012). Kokociński & Soininen (2012) in un recente studio hanno osservato che *C. raciborskii* e *Aphanizomenon* spp. erano comunemente presenti nei laghi eutrofici della Polonia occidentale.

Le fioriture di *C. raciborskii* sono sempre più frequenti nelle regioni tropicali, subtropicali e nei laghi delle regioni temperate proprio a causa di un'invadente diffusione di questa specie (Bonilla *et al.*, 2012). Ad oggi non sono chiari i meccanismi con cui si sono verificate diffusioni di *C. raciborskii* nelle regioni temperate (Bonilla *et al.*, 2012). A tal proposito sono state proposte diverse cause tra le quali; l'aumento della temperatura nei corpi idrici causato dai cambiamenti climatici, una particolare resistenza nella sopravvivenza di questa specie durante eventi di trasporto, le caratteristiche ecofisiologiche della specie, l'esistenza di ecotipi in grado di adattarsi a diverse condizioni ambientali (Bonilla *et al.*, 2012; Piccini *et al.*, 2013).

A7.4. Conclusioni

La descrizione della situazione italiana rispetto a quella mondiale e di alcuni dei meccanismi di produzione e regolazione delle cianotossine, evidenzia un quadro molto complesso e in continua evoluzione. Se da un lato sono poche le situazioni critiche nel nostro contesto nazionale, non si può escludere che la densità di ceppi più tossici o che producono tossine diverse sia al momento tenuta sotto controllo da ceppi meno pericolosi, che risultano più idoneii nelle circostanze attuali. Nel caso di cambiamenti significativi dell'habitat i ceppi meno abbondanti potrebbero prendere il sopravvento e dar luogo a nuovi casi critici.

Un altro aspetto da tener presente è che il numero di tossine attualmente conosciuto è probabilmente destinato ad aumentare, per i progressi che si continuano a fare nel campo tecnologico. In tale contesto, è fondamentale pianificare dei programmi di monitoraggio di volta

in volta modellati sia sulle caratteristiche delle specie presenti, in termini di tossicità e dinamica delle popolazioni, che sulle caratteristiche dell'area interessata, in termini di uso delle acque e vie di esposizione.

Bibliografia

Ács A, Kovács AW, Csepregi JZ, Törő N, Kiss G, Győri J, Vehovszky Á, Kováts N, Farkas A. The ecotoxicological evaluation of *Cylindrospermopsis raciborskii* from Lake Balaton (Hungary) employing a battery of bioassays and chemical screening. *Toxicon* 2013;70(0):98-106.

Antal O, Karisztl-Gácsi M, Farkas A, Kovács A, Ács A, Törő N, *et al.* Screening the toxic potential of *Cylindrospermopsis raciborskii* strains isolated from Lake Balaton, Hungary. *Toxicon* 2011;57(6):831-40.

ARPA Piemonte. *Qualità delle acque di balneazione dei Laghi Piemontesi – Stagione balneare anno 2012.* Torni: Agenzia Protezione Ambiente Regione Piemonte; 2012. Disponibile all'indirizzo: www.arpa.piemonte.it/approfondimenti/temi-ambientali/acqua/acque-di-balneazione/qualita-delle-acque-di-balneazione-dei-laghi-piemontesi.-stagione-balneare-2012; ultima consultazione 17/12/2014.

ARPA Umbria. *Qualità delle acque di balneazione dei laghi umbri. Stagione balneare 2012*. Perugia: Agenzia Regionale per la Protezione Ambientale Umbria; 2012.

ARPA Veneto. *Scheda informativa punto di campionamento n. 577*. Aggiornata al 29 maggio 2014. Venezia: Direzione Tecnica – Servizio Osservatorio Acque Marine e Lagunari. Agenzia Regionale per la Prevenzione e la Protezione Ambientale del Veneto; 2014. Disponibile all'indirizzo: http://www.arpa.veneto.it/acqua/docs/balneazione_schede_punti/revine_lago_tarzo/577.pdf; ultima consultazione 25/06/2014.

ARPAM. *Programma di Sorveglianza algale Laghi: Fiastrone, Borgiano e Castreccioni. 2011*. Ancona: Agenzia Regionale per la Protezione Ambientale delle Marche, Servizio Acque, Dipartimento di Macerata; 2011.

Bácsi I, Vasas G, Surányi G, M-Hamvas M, Máthé C, Tóth E, *et al.* Alteration of cylindrospermopsin production in sulfate- or phosphate-starved cyanobacterium *Aphanizomenon ovalisporum*. *FEMS microbiol lett* 2006;259(2):303-10.

Baker PD, Steffensen DA, Humpage AR, Nicholson BC, Falconer IR, Lanthois B, Fergusson KM, Saint CP Preliminary evidence of toxicity associated with benthic cyanobacterium *Phormidium* in south Australia. *Environ Toxicol* 2001;16:506-11.

Ballot A, Fastner J, Wiedner C. Paralytic shellfish poisoning toxin-producing cyanobacterium *Aphanizomenon gracile* in Northeast Germany. *Appl Environ Microbiol* 2010;76(4):1173-80.

Barco M, Flores C, Rivera J, Caixach J. Determination of microcystin variants and related peptides present in a waterbloom of *Planktothrix* (*Oscillatoria*) *rubescens* in a Spanish drinking reservoir by LC/ESI-MS. *Toxicon* 2004;44:881-6.

Barone R, Castelli G, Naselli-Flores L. Red sky at night cyanobacteria delight: the role of climate in structuring phytoplankton assemblage in a shallow, Mediterranean lake (Biviere di Gela, southeastern Sicily). *Hydrobiologia* 2010;639:43-53.

Bar-Yosef Y, Sukenik A, Hadas O, Viner-Mozzini Y, Kaplan A. Enslavement in the Water Body by Toxic *Aphanizomenon ovalisporum*, Inducing Alkaline Phosphatase in Phytoplanktons. *Curr Biol* 2010;20(17):1557-61.

Begliutti B, Buscarinu P, Marras G, Sechi GM, Sulis A. Reservoirs water-quality characterization for optimization Modelling under drought conditions Part I – reservoirs trophic state characterization. In: Rossi G, Vega T, Bonaccorso B (Ed.). *Methods and tools for drought analysis and management*. Dordrecht: Springer; 2007. p. 239-61.

Bogialli S, Nigro di Gregorio F, Lucentini L, Ferretti E, Ottaviani M, Ungaro N, Abis PP, Cannarozzi de Grazia M. Management of a Toxic Cyanobacterium Bloom (*Planktothrix rubescens*) Affecting an Italian Drinking Water Basin: A Case Study. *Environ Sci Technol* 2013;47:574-83.

Bonilla S, Aubriot L, Soares M C S, González-Piana M, Fabre A. What drives the distribution of the bloom-forming cyanobacteria *Planktothrix agardhii* and *Cylindrospermopsis raciborskii*? *FEMS Microbiol Ecol* 2012;79:594-607.

Borics G, Grigorszky I, Szabó S, Padisák J. Phytoplankton associations in a small hypertrophic fishpond in East Hungary during a change from bottom-up to top-down control. *Hydrobiologia* 2000;424(1):79-90.

Briand E, Yepremian C, Humbert JF, Quiblier C. Competition between microcystin- and non-microcystin-producing *Planktothrix agardhii* (cyanobacteria) strains under different environmental conditions. *Environ Microbiol* 2008;10(12):3337-48.

Briand JF, Jacquet S, Flinois C, Avois-Jacquet C, Maisonnette C, Leberre B, *et al.* Variations in the microcystin production of *Planktothrix rubescens* (cyanobacteria) assessed from a four-year survey of Lac du Bourget (France) and from laboratory experiments. *Microb Ecol* 2005;50(3):418-28.

Briand JF, Robillot C, Quiblier-Llobéras C, Humbert JF, Couté A, Bernard C. Environmental context of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanobacteria) blooms in a shallow pond in France. *Wat Res* 2002;36(13):3183-92.

Brient L, Lengronne M, Bormans M, Fastner J. First occurrence of cylindrospermopsin in freshwater in France. *Environ Toxicol* 2009;24(4):415-20.

Brunberg AC, Blomqvist P. Benthic overwintering of *Microcystis* colonies under different environmental conditions. *J Plank Res* 2002;24(11):1247-52.

Campo E, Lezcano MA, Agha R, Cires S, Quesada A, El-Shehawy R. First TaqMan assay to identify and quantify the cylindrospermopsin-producing cyanobacterium *Aphanizomenon ovalisporum* in water. *Adv Microbiol* 2013;3:430-7.

Capelli G, Mazza R, Di Corcia A. *Studio di caratterizzazione e relativo monitoraggio delle acque dei corpi idrici superficiali e delle falde soggiacenti le aree di ricarico del bacino lacustre di Vico. Relazione finale*. Roma: Università Roma Tre, Università La Sapienza, Regione Lazio; 2007.

Carmichael WW, Evans WR, Yin QQ, Bell P, Moczydlowski E. Evidence for paralytic shellfish poisons in the freshwater cyanobacterium *Lyngbya wollei* (Farlow ex Gomont) comb. nov. *Appl Environ Microbiol* 1997;63:3104-10.

Carneiro RL, dos Santos MEV, Pacheco ABF, Azevedo SMFdOe. Effects of light intensity and light quality on growth and circadian rhythm of saxitoxins production in *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanobacteria). *J Plank Res* 2009;31(5):481-8.

Carneiro RL, Pacheco AB, de Oliveira e Azevedo SM. Growth and saxitoxin production by *Cylindrospermopsis raciborskii* (cyanobacteria) correlate with water hardness. *Mar Drugs* 2013;11(8):2949-63.

Carraro E, Guyennon N, Hamilton D, Valsecchi L, Manfredi EC, Viviano G, Salerno F, Tartari G, Copetti D. Coupling high-resolution measurements to a three dimensional lake model to assess the spatial and temporal dynamics of the cyanobacterium *Planktothrix rubescens* in a medium-sized lake. *Hydrobiologia* 2012;698:77-95.

Carvalho L, McDonald C, de Hoyos C, Mischke U, Phillips G, Borics G, Poikane S., Skjelbred B, Lyche Solheim A, Van Wichelen J, Cardoso AC. Sustaining recreational quality of European lakes: minimising the health risks from algal blooms through phosphorus control. *J Appl Ecol* 2013;50:315-23.

Castro D, Vera D, Lagos N, García C, Vásquez M. The effect of temperature on growth and production of paralytic shellfish poisoning toxins by the cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* C10. *Toxicon* 2004;44(5):483-9.

Cerasino L, Salmaso N. Diversity and distribution of cyanobacterial toxins in the Italian subalpine lacustrine district. *Oceanol Hydrobiol Studies* 2012;41:54-63.

Chorus I (Ed.). *Current approaches to cyanotoxin risk assessment, risk management and regulations in different countries*. Dessau: Federal Environmental Agency; 2005.

Chorus I, Bartram J (Ed.). *Toxic cyanobacteria in water: a guide to their public health consequences, monitoring and management*. London, New York: E&FN Spon; 1999. (Published on behalf of WHO)

Collins R (Ed). *The European environment — state and outlook 2010. Freshwater quality (SOER 2010)*. Copenhagen: European Environmental Agency; 2010.

Copetti D, Guzzella L, Mingazzini M, Vignati D, Mastroianni D, Tartari G, Palumbo MT, Valsecchi L, Guyennon N, Ghislanzoni L, Legnani D, Pozzoni F. *Studio limnologico e valutazione della produzione di microcistine associate a una intensa fioritura di P. rubescens nel Lago Occhito*. *Rapporto Finale.* Roma: IRSA-CNR; 2010.

Copetti D, Valsecchi L, Ghislanzoni L, Pozzoni F, Carraro E, Guyennon N, Tartari G, Guzzella L. Intense *Planktothrix rubescens* blooms in a South Italy multiple-uses reservoir and their impact on the agricultural irrigation network. In: *Program and book of abstracts of the 16 the Workshop of the International Association of Phytoplankton Taxonomy and Ecology (IAP).* San Michele all'Adige (Trento). 21-28 August, 2012, 27.

Dasey M, Ryan N, Wilson J, McGregor G, Fabbro L, Neilan BA, Burns BP, Kankaanpaa H, Morrison LF, Codd GA, Rissik D, Bowling L. Investigations into the taxonomy, toxicity and ecology of benthic cyanobacterial accumulations in Myall Lake, Australia. *Mar Freshwater Res* 2005;56:45-55.

Davis TW, Harke MJ, Marcoval MA, Goleski J, Orano-Dawson C, Berry DL, *et al.* Effects of nitrogenous compounds and phosphorus on the growth of toxic and non-toxic strains of *Microcystis* during cyanobacterial blooms. *Aquat Microb Ecol* 2010;61(2):149-62.

De Pace R, Vita V, Bucci MS, Gallo P, Bruno M. Microcystin contamination in sea mussel farms from the Italian Southern Adriatic coast following cyanobacterial blooms in an artificial reservoir. *J Ecosyst* 2014; Article ID 374027. Disponibile all'indirizzo: http://dx.doi.org/10.1155/2014/374027, ultima consultazione 17/12/2014.

Dias E, Pereira P, Franca S. Production of paralytic shellfish toxins by *Aphanizomenon* sp. LMECYA 31 (cyanobacteria). *J Phycol* 2002;38(4):705-12.

Dokulil M, Mayer J. Population dynamics and photosynthetic rates of a *Cylindrospermopsis-Limnothrix* association in a highly eutrophic urban lake, Alte Donau, Vienna, Austria. *Algol Stud* 1996;83:179-95.

Dyble J, Tester PA, Litaker RW. Effects of light intensity on cylindrospermopsin production in the cyanobacterial HAB species *Cylindrospermopsis raciborskii*. *African J Mar Sci* 2006;28(2):309-12.

Edwards C, Beattie KA, Scrimgeour CM, Codd GA. Identification of anatoxin-A in benthic cyanobacteria (blue-green algae) and in associated dog poisonings at Loch Insh, Scotland. *Toxicon* 1992;30(10):1165-75.

EEA. *European waters - assessment of status and pressures.* Copenhagen: European Environmental Agency; 2012. (EEA Report n. 8/2012).

Ellwood NTW, Albertano P, Galvez R, Funiciello R, Mosello R. Water chemistry and trophic evaluation of Lake Albano (Central Italy): a four year water monitoring study. *J. Limnol* 2009;68(2):288-303.

Engström-Öst J, Repka S, Mikkonen M. Interactions between plankton and cyanobacterium *Anabaena* with focus on salinity, growth and toxin production. *Harmful Algae* 2011;10:530-5.

Ernst B, Hoeger SJ, O'Brien E, Dietrich DR. Abundance and toxicity of *Planktothrix rubescens* in the pre-alpine Lake Ammersee, Germany. *Harmful Algae* 2009;8(2):329-42.

Europa. Direttiva 2000/60/CE del Parlamento Europeo e del Consiglio del 22 ottbre 2000 che istituisce un quadro per l'azione comunitaria in materia di acque. *Gazzetta Ufficiale delle Comunità europee* n. L 327/1 del 22 dicembre 2000.

Fastner J, Heinze R, Humpage AR, Mischke U, Eaglesham GK, Chorus I. Cylindrospermopsin occurrence in two German lakes and preliminary assessment of toxicity and toxin production of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanobacteria) isolates. *Toxicon* 2003;42(3):313-21.

Fastner J, Neumann U, Wirsing B, Weackesser J. Microcystins (hepatotoxic heptapeptides) in German freshwater bodies. *Environ Toxicol* 1999;14:13-22.

Ferranti P, Fabbrocino S, Cerulo MG, Bruno M, Serpe L, Gallo P. Characterisation of biotoxins produced by a cyanobacteria bloom in Lake Averno using two LC–MS-based techniques. *Food Additives and Contaminants*, 2008;25(12):1530-7.

Ferranti P, Fabbrocino S, Nasi A, Caira S, Bruno M, Serpe L, Gallo P. Liquid chromatography coupled to quadruple time-offlight tandem mass spectrometry for microcystin analysis in freshwaters: method performances and characterisation of a novel variant of microcystin-RR. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2009;23:1328-36.

Funari E, Manganelli M, Scardala S, Stefanelli M, Palazzo F, Testai E, Gemma S, Vichi S. *Indagine per approfondire gli aspetti sanitari associati alle fioriture di Planktothrix rubescens nel Lago di Vico. Relazione finale*. Roma: Istituto Superiore di Sanità, Provinca di Viterbo; 2011.

Gagnon A, Pick F. Effect of nitrogen on cellular production and release of the neurotoxin anatoxin-a in a nitrogen-fixing cyanobacterium. *Frontiers in Microbiol* 2012;3:Article 211.

Gagnon A. *The cyanotoxin anatoxin-a: factors leading to its production and fate in freshwaters*. [Ph.D. Thesis]. Ottawa: Carleton Institute of Biology; 2012.

Gallo P, Fabbrocino S, Cerulo MG, Ferranti P, Bruno M, Serpe L. Determination of cylindrospermopsin in freshwaters and fish tissue by liquid chromatography coupled to electrospray ion trap mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2009;23:3279-84.

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.* Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2000. (Rapporti ISTISAN 00/30). p. 117-35.

Godeas F. *Littoral epilithon of volcanic Lake Albano: seasonal variation of phototrophic biomass in relation to environmental variables*. PhD Thesis, Rome University of Rome Tor Vergata, 2012.

Gugger M, Lenoir S, Berger C, Ledreux A, Druart J, Humbert J, *et al.* First report in a river in France of the benthic cyanobacterium Phormidium favosum producing anatoxin-a associated with dog neurotoxicosis. *Toxicon* 2005;45:919-28.

Gumbo RJ, Ross G, Cloete ET. Biological control of Microcystis dominated harmful algal blooms. *Afr J Biotechnol* 2008;7(25):4765-73.

Guzzella L, Ghislanzoni L, Pozzoni F, Valsecchi L, Copetti D. Cianobatteri e tossine algali nel lago di Occhito. *Acqua & Aria* 2011;4:6-21.

Halinen K, Jokela J, Fewer DP, Wahlsten M, Sivonen K. Direct evidence for production of microcystins by *Anabaena* strains from the Baltic Sea. *App Environ Microbiol* 2007;73(20):6543-50.

Heath MW, Wood SA, Ryan KG. Polyphasic assessment of fresh-water benthic mat-forming cyanobacteria isolated from New Zealand. *FEMS Microbiol Ecol* 2010;73(1):95-109.

Henriksen P, Carmichael W, An J, Moestrup O. Detection of an anatoxin-a(s) like anticholinesterase in natural blooms and cultures of cyanobacteria blue-green algae from Danish Lakes and in the stomach contents of poisoned birds. *Toxicon* 1997;35(6):901-13.

Hossaine Y, Jewel AS, Fulunda B, Ahamed F, Rahman S, Jasmine S, Ohtomi J. Dynamics of Cyanobacteria Planktothrix species (Oscillatoriales: Phormidiaceae) in Earthen fish ponds, Northwestern Bangladesh. *Sains Malaysiana* 2012;41(3):277-84.

Hotto AM, Satchwell MF, Berry DL, Gobler CJ, Boyer GL. Spatial and temporal diversity of microcystins and microcystin-producing genotypes in Oneida Lake, NY. *Harm Algae* 2008;7(5):671-81.

Italia. Decreto legislativo 3 aprile 2006, n. 152. Norme in materia ambientale. *Gazzetta Ufficiale* n. 88, del 14 aprile 2006.

Izaguirre G, Jungblut A-D, Neilan BA. Benthic cyanobacteria (Oscillatoriaceae) that produce microcystin-LR, isolated from four reservoirs in southern California. *Wat Res* 2007;41(2):492-8.

Jahnichen S, Ihle T, Petzoldt T, Benndorf J. Impact of inorganic carbon availability on microcystin production by *Microcystis aeruginosa* PCC 7806. *Appl Environ Microbiol* 2007;73(21):6994-7002.

James K, Crowley J, Hamilton B, Lehane M, Skulberg O, Furey A. Anatoxins and degradation products, determined using hybrid quadruple time-of-flight and quadruple ion-trap mass spectrometry: forensic investigations of cyanobacterial neurotoxin poisoning. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2005;19:1167-75.

Kaas H, Henriksen P. Saxitoxins (PSP toxins) in Danish lakes. *Wat Res* 2000;34(7):2089-97.

Kahru M. Using satellites to monitor large-scale environmental change in the Baltic Sea. In: Kahru M, Brown CW (Ed.). *Monitoring algal blooms: new techniques for detecting large-scale environmental change*. Berlin: Springer-Verlag; 1997. p. 43-61

Karlsson KM, Kankaanpää H, Huttunen M, Meriluoto J. First observation of microcystin-LR in pelagic cyanobacterial blooms in the northern Baltic Sea. *Harmful Algae* 2005;4:163-6.

Kokociński M, Dziga D, Spoof L, Stefaniak K, Jurczak T, Mankiewicz-Boczek J, Meriluoto J. First report of the cyanobacterial toxin cylindrospermopsin in the shallow, eutrophic lakes of western Poland. *Chemosphere* 2009;74(5):669-675.

Kokociński M, Mankiewicz-Boczek J, Jurczak T, Spoof L, Meriluoto J, Rejmonczyk E, Hautala H, Vehniäinen M, Pawełczyk J, Soininen J. Aphanizomenon gracile (Nostocales), a cylindrospermopsin producing cyanobacterium in Polish lakes. *Environ Sci Pollut Res* 2013;20:5243-64.

Kokociński M, Soininen J. Environmental factors related to the occurrence of Cylindrospermopsis raciborskii (Nostocales, Cyanophyta) at the north-eastern limit of its geographical range. *Eur J Phycol* 2012;47:12-21.

Kurmayer R, Christiansen G, Fastner J, Borner T. Abundance of active and inactive microcystin genotypes in populations of the toxic cyanobacterium *Planktothrix* spp. *Environ Microbiol* 2004;6(8):831-41.

Kurmayer R, Christiansen G, Gumpenberger M, Fastner J. Genetic identification of microcystin ecotypes in toxic cyanobacteria of the genus *Planktothrix*. *Microbiology*. 2005;151(Pt 5):1525-33.

Laamanen M, Kuosa H. Annual variability of biomass and heterocysts of the N2-fixing cyanobacterium *Aphanizomenon flos-aquae* in the Baltic Sea with reference to *Anabaena* spp. and *Nodularia spumigena*. *Boreal Env Res* 2005;10:19-30.

Lagos N, Onodera H, Zagatto P, Andrinolo D, Azevedo S, Oshima Y. The first evidence of paralytic shellfish toxins in the freshwater cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii*, isolated from Brazil. *Toxicon* 1999;37:1359-73.

Latour D, Giraudet H. Factors influencing the spatio-temporal distribution of benthic *Microcystis aeruginosa* colonies (Cyanobacteria) in the hypertrophic Grangent Reservoir (Loire, France). *C R Biol* 2004;327(8):753-61.

Legnani E, Copetti D, Oggioni A, Tartari G, Palumbo MT, Morabito G. *Planktothrix rubescens*' seasonal and spatial distribution in Lake Pusiano (North Italy). *J Limnol* 2005;64:61-73.

Lindholm T, Vesterkvist P, Spoof L, Lundberg-Niinistö C, Meriluoto J. Microcystin occurrence in lakes in Åland, SW Finland. *Hydrobiologia* 2003;505:129-38.

Lopes VR, Fernandez N, Martins RF, Vasconcelos V Primary screening of the bioactivity of brakishwater cyanobacteria: toxicity of crude extract to *Artemia salina* larvae and *Paracentrotus lividus* embryos. *Mar drugs* 2010;8:471-82.

Lugliè A, Manca B, Sechi N. Studi limnologici sul Lago Alto Flumendosa (Sardegna centrale): stato trofico e fitoplancton. *Bollettino della Società sarda di scienze naturali*, 1997;31:83-100.

Manganelli M, Scardala S, Stefanelli M, Palazzo F, Funari E, Vichi S, BurattiFM, Testai E. Emerging health issues of cyanobacterial blooms. *Ann Ist Super Sanità* 2012;48(4):415-28.

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. *Wat Res* 2010;44(5):1297-1306.

Mankiewicz-Boczek J, Kokociński M, Gągała I, Pawełczyk J, Jurczak T, Dziadek J. Preliminary molecular identification of cylindrospermopsin-producing Cyanobacteria in two Polish lakes (Central Europe). *FEMS Microbiol Lett* 2012;326:173-9.

Manti G, Mattei D, Messineo V, Melchiorre S, Bogialli S, N. Sechi, Casiddu P, Luglié A, Di Brizio M, Bruno, M. First report of *Cylindrospermopsis raciborskii* in Italy. *Harmful Algae News*, 2005;28:8-9.

Margaritora FG, Fumanti B, Alfinito S, Tartari G, Vagaggini D, Seminara M, Cavacini P, Vuillermoz E, Rosati M. Trophic condition of the volcanic Lake Nemi (Central Italy): environmental factors and planktonic communities in a changing environment. *J Limnol,* 2005;64(2):119-128.

Mazur H, Pliński M, *Nodularia spumigena* blooms and the occurrence of hepatotoxin in the Gulf of Gdańsk. *Oceanologia* 2003;45:305-16.

Mejean 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. *J Am Chem Soc* 2009;131(22):7512-3.

Meregalli M, Trebini F, Manca B, Luglié A. Stato trofico e fitoplancton nel Lago Alto Flumendosa. *Atti della Associazione italiana Oceanologia Limnologia,* 2002;15:87-96.

Merel S, Walker D, Chicana R, Snyder S, Baurès E, Thomas O. State of knowledge and concerns on cyanobacterial blooms and cyanotoxins. *Environ Int* 2013;59:303-27

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;39:95-106.

Messineo V, Mattei D, Melchiorre S, Salvatore G, Bogialli S, Salzano R, Mazza R, Capelli G, Bruno M. Microcystin diversity in a *Planktothrix rubescens* population from Lake Albano (Central Italy). *Toxicon*, 2006;48:160–174.

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. *Environ Toxicol*, 2010;25(1):18-27.

Metcalf JS, Morrison LF, Krienitz L, Ballot A, Krause E, Kotut K, *et al.* Analysis of the cyanotoxins anatoxin-a and microcystins in Lesser Flamingo feathers. *Toxicol Environ Chem* 2006;88(1):159-67.

Mez K, Beattie K, Codd G, Hanselmann K, Hauser B, Naegeli H, *et al.* Identification of microcystin in benthic cyanobacteria linked to cattle deaths on alpine pastures in Switzerland. *Europ J Phycol* 1997;32(2):111-7.

Mez K, Hanselmann K, Preisig HR Environmental conditions in high mountain lakes containing toxic benthic cyanobacteria. *Hydrobiologia* 1998;368:1-15.

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 - Serie Generale* n. 119, del 24 maggio 2010.

Mohamed ZA, El-Sharouny HM, Ali WSM. Microcystin concentrations in the Nile River sediments and removal of microcystin-LR by sediments during batch experiments. *Arch Environ Contam Toxicol* 2007;52:489-95.

Mohamed ZA, El-Sharouny HM, Ali WSM. Microcystin production in benthic mats of cyanobacteria in the Nile River and irrigation canals, Egypt. *Toxicon* 2006;47(5):584-90.

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;24:167-77.

Naselli-Flores L, Barone R, Chorus I, Kurmayer R. Toxic cyanobacterial blooms in reservoirs under a semiarid mediterranean climate: the magnification of a problem. *Environ Toxicol* 2007;22:399-404.

Naselli-Flores L, Barone R. Pluriannual morphological variability of phytoplankton in a highly productive Mediterranean reservoir (Lake Arancio, Southwestern Sicily). *Hydrobiologia* 2007;578:87-95.

Naselli-Flores L, Barone R. Steady-state assemblages in a Mediterranean hypertrophic reservoir. The role of *Microcystis* ecomorphological variability in maintaining an apparent equilibrium. *Hydrobiologia* 2003;502:133-43.

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.

Naselli-Flores L. Morphological analysis of phytoplankton as a tool to assess the ecological state of aquatic ecosystems. the case of Lake Arancio, Sicily, Italy. *Inland Waters* 2014;4(1):15-26.

Neilan BA, Pearson LA, Muenchhoff J, Moffitt MC, Dittmann E. Environmental conditions that influence toxin biosynthesis in cyanobacteria. *Environ Microbiol* 2013;15(5):1239-53.

Oh H-M, Lee SJ, Jang M-H, Yoon B-D. Microcystin Production by *Microcystis aeruginosa* in a Phosphorus-Limited Chemostat. *Appl Environ Microbiol* 2000;66(1):176-9.

Okello W, Portmann C, Erhard M, Gademann K, Kurmayer R. Occurrence of microcystin-producing cyanobacteria in Ugandan freshwater habitats. *Environ Toxicol* 2010;25(4):367-80.

Onodera H, Oshima Y, Henriksen P, Yasumoto T. Confirmation of anatoxin-a(s), in the cyanobacterium *Anabaena lemmermannii*, as the cause of bird kills in Danish lakes. *Toxicon* 1997;35:1645-8.

Orr PT, Jones GJ. Relationship between microcystin production and cell division rates in nitrogen-limited *Microcystis aeruginosa* cultures. *Limnol Oceanogr* 1998;43(7):1604-14.

Ostermaier V, Schanz F, Köster O, Kurmayer R. Stability of toxin gene proportion in red-pigmented populations of the cyanobacterium Planktothrix during 29 years of re-oligotrophication of Lake Zürich. *BMC Biology* 2012;10:100-16.

Oudra B, Loudiki M, Vasconcelos V, Sabour B, Sbiyyaa B, Oufdou K, Mezrioul N. Detection and quantification of microcystins from cyanobacteria strains isolated from reservoirs and ponds in Morocco. *Environ Toxicol* 2002;17:32-9.

Paerl H W, Hall N S, Calandrino E S. Controlling harmful cyanobacterial blooms in a world experiencing anthropogenic and climatic-induced change. *Sci Tot Environ* 2011;409:1739-45.

Piccini C, Aubriot L, D'Alessandro B, Martigani F, Bonilla S. Revealing toxin signatures in cyanobacteria: report of genes involved in cylindrospermopsin synthesis from saxitoxin-producing *Cylindrospermopsis raciborskii. Advanc Microbiol* 2013;3:289-96.

Pomati F, Rossetti C, Manarolla G, Burns BP, Neilan BA. Interactions between intracellular Na+ levels and saxitoxin production in *Cylindrospermopsis raciborskii* T3. *Microbiology* 2004;150(2):455-61.

Preußel K, Stüken A, Wiedner C, Chorus I, Fastner J. First report on cylindrospermopsin producing *Aphanizomenon flos-aquae* (Cyanobacteria) isolated from two German lakes. *Toxicon* 2006;47(2):156-62.

Preußel K, Wessel G, Fastner J, Chorus I. Response of cylindrospermopsin production and release in *Aphanizomenon flos-aquae* (Cyanobacteria) to varying light and temperature conditions. *Harmful Algae* 2009;8(5):645-50.

Puschner B, Hoff B, Tor ER. Diagnosis of anatoxin-a poisoning in dogs from North America. *J Vet Diagn Invest* 2008;20(1):89-92.

Quesada A, Sanchis D, Carrasco D. Cyanobacteria in Spanish reservoirs. How frequently are they toxic? *Limnetica* 2004;23(1-2):109-18.

Quiblier C, Wood S, Echenique-Subiabre I, Heath M, Villeneuve A, Humbert JF. A review of current knowledge on toxic benthic freshwater cyanobacteria- Ecology, toxin production and risk management. *Wat Res* 2013;47:5464-79.

Rantala-Ylinen A, Känä S, Wang H, Rouhiainen L, Wahlsten M, Rizzi E, Berg K, Gugger M, Sivonen K. Anatoxin-a Synthetase gene cluster of the cyanobacterium *Anabaena* sp. strain 37 and molecular methods to detect potential producers. *Appl Environ Microbiol* 2011;77(29):7271-8.

Rapala J, Robertson A, Negri A, Berg K, Tuomi P, Lyra C, *et al.* First report of saxitoxin in Finnish lakes and possible associated effects on human health. *Environ Toxicol* 2005;20:331-40.

Rapala J, Sivonen K, Luukkainen R, Niemelä SI. Anatoxin-a concentration in *Anabaena* and *Aphanizomenon* under different environmental conditions and comparison of growth by toxic and non-toxic *Anabaena* strains — a laboratory study. *J Appl Phycol* 1993;5(6):581-91.

Rapala J, Sivonen K, Lyra C, Niemela S. Variation of microcystins, cyanobacterial hepatotoxins, in *Anabaena* spp. as a function of growth stimuli. *Appl Environ Microbiol* 1997;63(6):2206-12.

Rapala J, Sivonen K. Assessment of environmental conditions that favour hepatotoxic and neurotoxic *Anabaena* spp strains cultured under light limitation at different temperatures. *Microb Ecol* 1998;36:181-92.

Ravera O, Vollenweider RA. *Oscillatoria rubescens* D.C. as an indicator of Lago Maggiore eutrophication. *Schweiz Zeit Hydrol* 1968;30:374-80.

Regione Lazio. Decreto Presidente Regione Lazio 24 aprile 2014, n. T00122. Individuazione e classificazione delle acque destinate alla balneazione e dei punti di monitoraggio, ai sensi del D.Lgs 116/08 e del Decreto attuativo 30.03.2010. Stagione balneare 2014. *Bollettino Ufficiale Regione Lazio* n. 36, 6 maggio 2014. p. 8.

Sabart M, Pobel D, Briand E, Combourieu B, Salenc M J¸ Humbert J F, Latour D. Spatiotemporal variations in microcystin concentrations and in the proportions of microcystin-producing cells in several Microcystis aeruginosa populations. *Appl Environ Microbiol* 2010;76(14):4750-9.

Saker ML, Griffiths DJ. The effect of temperature on growth and cylindrospermopsin content of seven isolates of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Nostocales, Cyanophyceae) from water bodies in northern Australia. *Phycologia* 2000;39(4):349-54.

Saker ML, Neilan BA. Varied diazotrophies, morphologies, and toxicities of genetically similar isolates of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Nostocales, Cyanophyceae) from Northern Australia. *Appl Environ Microbiol* 2001;67(4):1839-45.

Saker ML, Nogueira IC, Vasconcelos VM, Neilan BA, Eaglesham GK, Pereira P. First report and toxicological assessment of the cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* from Portuguese freshwaters. *Ecotoxicol Environ Safe* 2003;55(2):243-50.

Salmaso N, Boscaini A, Shams S, Cerasino L. Strict coupling between the development of *Planktothrix rubescens* and microcystin quota in two nearby lakes south of the Alps (lakes Garda and Ledro). *Ann Limnol - Int J Limnol* 2013;49(4):309-18.

Salmaso N, Buzzi F, Garibaldi L, Morabito G, Simona M. Effects of nutrient availability and temperature on phytoplankton development: A case study from large lakes south of the Alps. *Aquatic Sciences* 2012;74:555-70.

Salmaso N, Cavolo F, Cordella P. Fioriture di *Anabaena* e *Microcystis* nel Lago di Garda. Eventi rilevati e caratterizzazione dei periodi di sviluppo. *Acqua & Aria* 1994;1:17-28.

Scardala S, Stefanelli M, Palazzo F, Orrù A, Cabras P, Vichi S, Testai E, Funari E, Manganelli M. Microcystin congeners profiles in Alto Flumendosa Lake (Sardinia, Italy): their importance in monitoring programs. In: *Abstract book of the 9th International Conference on Toxic Cyanobacteria*, Pilanesberg, South Africa, 11-16 August 2013. Port Elizabeth, South Africa: Nelson Mandela Metropolitan University; 2013. p. 103.

Schatz D, Keren Y, Vardi A, Sukenik A, Carmeli S, Borner T, *et al.* Towards clarification of the biological role of microcystins, a family of cyanobacterial toxins. *Environ Microbiol* 2007;9(4):965-70.

Seifert M, McGregor G, Eaglesham G, Wickramasinghe W, Shaw G. First evidence for the production of cylindrospermopsin and deoxy-cylindrospermopsin by the freshwater benthic cyanobacterium, *Lyngbya wollei* (Farlow ex Gomont) Speziale and Dyck. *Harmful Algae* 2007;6(1):73-80.

Shalev-Malul G, Lieman-Hurwitz J, Viner-Mozzini Y, Sukenik A, Gaathon A, Lebendiker M, *et al.* An AbrB-like protein might be involved in the regulation of cylindrospermopsin production by Aphanizomenon ovalisporum. *Environ Microbiol* 2008;10(4):988-99.

Simoni F, di Paolo C, Mancino A, Simoni F, Falaschi A. Microcystin concentrations in water and ichthyofauna of Massaciuccoli Wetlands (Tuscany). *Harmful Algae News* 2004;25:4-6.

Sivonen K, 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, New York: E&FN Spon; 1999. (Published on behalf of WHO). p. 41-111.

Sivonen K, Kononen K, Carmichael WW, Dahlem AM, Rinehart KL, Kiviranta J, Niemela SI. Occurrence of the hepatotoxic cyanobacterium *Nodularia spumigena* in the Baltic Sea and structure of the toxin. *Appl Environ Microbiol* 1989;55:1990-5.

Stal LJ, Albertano P, Bergman B, von Bröckel K, Gallon JR, Hayes PK, Sivonen K, Walsby AE. BASIC: Baltic Sea cyanobacteria. An investigation of the structure and dynamics of water blooms of cyanobacteria in the Baltic Sea—responses to a changing environment. *Continental Shelf Res* 2003;23:1695-714.

Stucken K, John U, Cembella A, Murillo AA, Soto-Liebe K, Fuentes-Valdés JJ, *et al.* The smallest known genomes of multicellular and toxic cyanobacteria: comparison, minimal gene sets for linked traits and the evolutionary implications. *PLoS ONE* 2010;5(2):e9235.

Stüken A, Campbell RJ, Quesada A, Sukenik A, Dadheech PK, Wiedner C. Genetic and morphologic characterization of four putative cylindrospermopsin producing species of the cyanobacterial genera *Anabaena* and *Aphanizomenon*. *J Plank Res* 2009;31(5): 465-480.

Surakka A, Sihvonen LM, Lehtimaki JM, Vuorela P, Sivonen K. Benthic cyanobacteria from the Baltic Sea contain cytotoxic *Anabaena*, *Nodularia*, and *Nostoc* strains and an apoptosis-inducing *Phormidium* strain. *Environ Toxicol* 2005;20:285-92.

Tan X. Comparison of benthic recruitment with pelagic growth of bloom-forming cyanobacteria. *African J Microbiol Res* 2012;6(14):3425-30.

Tin T. Mediterranean and climate change. In: *Proceedings of the Workshop Mediterranean: Water and Drought*, Zaragoza (Spain), February 23-24, 2006. Sevilla: CENTA; 2006.

Torres GS, Adamek Z. Factors promoting the recruitment of benthic cyanobacteria resting stages: a review. *Croatian J Fischeries* 2013;71:182-6.

USEPA. *National Lakes Assessment: A Collaborative Survey of the Nation's Lakes.* U.S. Environmental Protection Agency, Office of Water and Office of Research and Development, Washington, D.C. 2009.

Valerio E, Chambel L, Paulino S, Faria N, Pereira P, Tenreiro R. Molecular identification, typing and traceability of cyanobacteria from freshwater reservoirs. *Microbiol* 2009;155(2):642-56.

Van de Waal DB, Verspagen JMH, Finke JF, Vournazou V, Immers AK, Kardinaal WEA, *et al.* Reversal in competitive dominance of a toxic versus non-toxic cyanobacterium in response to rising CO2. *ISME J* 2011;5:1438-50.

Vehovszky Á, Kovács AW, Farkas A, Győri J, Szabó H, Vasas G. Pharmacological studies confirm neurotoxic metabolite(s) produced by the bloom-forming *Cylindrospermopsis raciborskii* in Hungary. *Environ Toxicol* 2013:n/a-n/a.

Verspagen JMH, Snelder EOFM, Visser PM, Huisman J, Mur LR, Ibelings BW. Recruitment of benthic microcystis (cyanophyceae) to the water column: internal buoyancy changes or resuspension? *J Phycol* 2004;40:260-70.

Viaggiu E, Morabito G, Della Libera S. Specie tossiche. In: Lucentini L, Ottaviani M (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). p. 11-25.

Volante M, Fumagalli R, Girola A, Rotasperti A, Giovenzana S, Cuda S, Mirrione M, Lotta MD, Lombardini M, Farsaci C. Monitoraggio di tossine algali nei laghi mediante tecnica HPLC con estrazione SPE "on-line". 2012 *Bollettino degli Esperti Ambientali* Anno 63 2012/2.

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.

WHO. *Guidelines for safe recreational water environment. Volume 1, Coastal and fresh waters*. Geneva: World Health Organization; 2003.

Wood SA, Heath MW, Holland PT, Munday R, McGregor G, Ryan KG. Identification of a benthic microcystin producing filamentous cyanobacterium (Oscillatoriales) associated with a dog poisoning in New Zealand. *Toxicon* 2010;55:897-903.

Wood SA, Rasmussen JP, Holland PT, Campbell R, Crowe ALM. First report of the cyanotoxin anatoxin-a from *Aphanizomenon issatschenkoi* (cyanobacteria). *J Phycol* 2007;43(2):356-65.

Wood SA, Rueckert A, Hamilton DP, Cary SC, Dietrich DR. Switching toxin production on and off: intermittent microcystin synthesis in a *Microcystis* bloom. *Environ Microbiol Rep* 2011;3(1):118-24.

Xu Y, Wu Z, Yu B, Peng X, Yu G, Wei Z, Wang G, Li R. Non-microcystin producing Microcystis wesenbergii (Komárek) Komárek (Cyanobacteria) representing a main waterbloom-forming species in Chinese waters. *Environ Pollut* 2008;156:162-7.

Yunes JS, De La Rocha S, Giroldo D, Silveira SBd, Comin R, Bicho MdS, *et al.* Release of carbohydrates and proteins by a subtropical strain of *Raphidiopsis brookii* (Cyanobacteria) able to produce saxitoxin at three nitrate concentrations. *J Phycol* 2009;45(3):585-91.

Zilliges Y, Kehr J-C, Meissner S, Ishida K, Mikkat S, Hagemann M, *et al.* The cyanobacterial hepatotoxin microcystin binds to proteins and increases the fitness of *Microcystis* under oxidative stress conditions. *PLoS ONE* 2011;6(3):e17615.

A8. CARENZE CONOSCITIVE IN AMBITO SANITARIO, SPUNTI PER LA RICERCA, PRIORITÀ

Enzo Funari, Maura Manganelli, Emanuela Testai
Dipartimento di Ambiente e Connessa Prevenzione Primaria, Istituto Superiore di Sanità, Roma

Come illustrato nei precedenti capitoli, in questi ultimi anni le conoscenze su distribuzione, ecologia e genetica di diversi cianobatteri, come pure sui livelli di produzione e profilo tossicologico delle tossine prodotte, si sono ampliate. Tuttavia molti aspetti restano ancora da chiarire per poter prevedere e gestire adeguatamente il fenomeno delle fioriture, mitigandone i possibili effetti sulla salute umana, sugli ecosistemi e non ultimo sulle attività economiche.

Ad esempio, al momento disponiamo di una mappa incompleta della distribuzione dei cianobatteri nei vari laghi e corpi idrici italiani: in alcuni casi disponiamo di informazioni abbastanza dettagliate, mentre in altri le informazioni sono assenti o al più sporadiche. Le informazioni relative ai fattori ambientali che favoriscono le fioriture e che modulano la produzione di tossine e il rapporto tra contenuto intracellulare e tossina disciolta non sono state ancora pienamente chiarite e soprattutto l'impatto delle fioriture sulla salute umana è solo parzialmente conosciuto.

Relativamente alla salute umana, anche se è stata recentemente dimostrata la presenza di microcistine nell'aerosol, non si conoscono ancora i fattori che ne influenzano la composizione e la dinamica, né è chiaro se le tossine presenti nell'aerosol siano effettivamente biodisponibili per l'organismo. La maggior parte delle informazioni tossicologiche sono disponibili per la microcistina-LR (MC-LR), che è solo uno dei circa 100 congeneri, alcuni dei quali sono caratterizzati da diverse caratteristiche chimico-fisiche e per questo, secondo alcuni dati recenti, potrebbero avere profili tossicologici diversi. Ancora meno si sa sulle altre cianotossine, nonostante alcune abbiano potenziale di indurre effetti a lungo termine (es. cilindrospermopsina) o neurotossicità (es. anatossine).

I dati epidemiologici disponibili sono ancora molto scarsi, per lo più aneddotici e solo molto recentemente sono stati riportati dati raccolti sistematicamente durante la stagione balneare negli USA, ancora però insufficienti per permettere una definizione di 'caso' e stabilire più chiaramente soglie per la comparsa dei diversi sintomi, per meglio tutelare la sicurezza dei fruitori delle acque di balneazione.

Anche se sembra molto plausibile attribuire il rischio sanitario dovuto ad effetti locali al sito di contatto alle endotossine lipopolisaccaridiche (LPS), una associazione causa effetto non è mai stata chiaramente identificata e il possibile contributo di altri agenti etiologici, sia chimici (aldeidi, chetoni e terpenoidi) che biologici (batteri presenti durante le fioriture) non è ancora chiaro. Relativamente agli effetti sistemici non è nota la percentuale di tossine assorbite a livello cutaneo in seguito ad attività di balneazione o ricreativa in genere, né quello successivo ad inalazione nell'epitelio polmonare: in realtà le informazioni di tipo tossicocinetico (assorbimento, biodisponibilità, distribuzione, biotrasformazione ed eliminazione) sono pressoché assenti per le varie cianotossine. Escludendo la MC-LR mancano informazioni sulla tossicità ripetuta che permettano di stabilire una chiara relazione dose effetto. Considerando la possibile contaminazione di derrate alimentari, non è noto quale sia il profilo cinetico di accumulo nei prodotti ittici o in altri cibi e quindi quale sia la fase in cui la raccolta o l'attività di pesca possano porre i rischi maggiori. Infine, anche se finora la nostra attenzione si è focalizzata

sulle cianotossine finora conosciute, viene sempre più frequentemente segnalata la produzione di altri prodotti bioattivi, sulla cui funzione e tossicità ancora non si hanno informazioni solide.

Queste carenze conoscitive impediscono la definizione completa dei possibili scenari di esposizione e conseguentemente dei gruppi di popolazione più esposti, limitando la possibilità di condurre un'adeguata valutazione del rischio dei disturbi riscontrati in bagnanti e frequentatori di spiagge. Inoltre per una più efficiente azione preventiva e per indirizzare al meglio i piani di monitoraggio sarebbe opportuno disporre di modelli matematici adeguati per poter prevedere sulla base dei dati ambientali le possibilità di proliferazione cianobatterica.

L'acquisizione di nuovi dati dovrebbe prevedere un piano nazionale di ricerche multidisciplinari che permettano la raccolta di dati sul campo utili anche alla valutazione e gestione degli aspetti sanitari correlati alle fioriture di cianobatteri. I principali aspetti su cui è prioritario acquisire nuove conoscenze sono riassunti schematicamente di seguito:

- creazione di un database nazionale dei dati di monitoraggio (come indicato nella reportistica illustrata nel capitolo B3 di questo rapporto), utile anche per lo sviluppo di modellistica specifica;
- creazione di un database nazionale dei dati di sorveglianza sanitaria da incrociare con i dati di monitoraggio sulle fioriture;
- caratterizzazione del profilo tossicologico delle tossine prodotte nei corpi idrici italiani attraverso le vie di esposizione principali (orale, inalatoria e cutanea) non limitandosi alla tossicità acuta, ma considerando effetti dovuti ad esposizione a dosi ripetute per brevi periodi (tossicità sub-acuta/subcronica), per simulare le reali condizioni di esposizione umana, con definizione di valori limite nelle varie matrici e per i diversi scenari di esposizione;
- caratterizzazione della tossicocinetica delle tossine, specialmente in riferimento alla specie umana.
- messa a punto di metodi per il monitoraggio rapido delle tossine in siti considerati *hot spot* per le fioriture;
- caratterizzazione della presenza di cianobatteri/ciano tossine nelle acque di transizione e del bioaccumulo delle tossine in organismi acquatici eduli che in tali aree vivono o sono allevati;
- caratterizzazione dell'accumulo in altre derrate (es. a seguito di uso irriguo di acqua contaminata o di consumo di acqua contaminata per abbeveraggio di animali da allevamento);
- caratterizzazione del meccanismo di azione delle tossine e delle possibili interazioni tossicologiche con altre tossine e/o contaminanti;
- caratterizzazione della tossicità di specie di cianobatteri meno conosciute ma frequentemente segnalate nei corpi idrici italiani;
- caratterizzazione della distribuzione e della tossicità di cianobatteri bentonici in Italia;
- individuazione di fattori ecofisiologici che regolano la crescita dei cianobatteri e l'espressione dei geni coinvolti nella produzione di tossine, incluso il ruolo di altri organismi co-presenti (es. batteri o virus) nell'influenzare le diverse fasi della fioritura, regolare la produzione e il rilascio di tossine nell'ambiente o crescere essi stessi a spese della fioritura, aumentando la possibilità di trasmissione di patologie correlate.

PARTE B
Linee guida

B1. RAZIONALE PER LA DEFINIZIONE DELLE LINEE GUIDA E CONTESTO INTERNAZIONALE

Enzo Funari, Maura Manganelli, Emanuela Testai
Dipartimento di Ambiente e Connessa Prevenzione Primaria, Istituto Superiore di Sanità, Roma

B1.1. Aspetti sanitari

Relativamente alla balneazione e alle attività ricreative in genere, il periodo dell'esposizione è limitato alla stagione balneare, che alle nostre latitudini ha un'estensione massima di 4-5 mesi. Non si tratta dunque di un'esposizione cronica, ma di un'esposizione sub-cronica. Effetti sulla salute umana a seguito di attività ricreative correlabili alla presenza di cianobatteri sono stati osservati in seguito ad esposizione per ingestione, contatto e inalazione. Le tre vie di esposizione saranno analizzate separatamente, anche se è ovviamente possibile che uno stesso individuo possa essere contemporaneamente esposto attraverso tutte e tre le vie durante l'attività di balneazione (es. nuotando).

B1.1.1. Esposizione per ingestione

Sulla base di quanto esposto nel capitolo A4, una persona adulta di 60 kg di peso non si trova in una situazione di rischio inaccettabile cronico, sub cronico e acuto se assume rispettivamente dosi fino a 2,4-24-150 µg MC-LR (microcistina-LR)/giorno. Per un bambino di 10-15 kg di peso le corrispondenti dosi sono di 0,4-0,6; 4-6 e 25-37,5 µg MC-LR/giorno. Non essendo presenti dati relativi agli altri congeneri, assumendo che la MC-LR rappresenti il caso peggiore dal punto di vista tossicologico, nel valutare il rischio l'OMS (Organizzazione Mondiale della Sanità) si riferisce alla somma dei congeneri di MC come se fossero MC-LRequivalenti (MC-LReq), che di seguito saranno indicati semplicemente come MC.

Per la protezione della salute dei bagnanti l'OMS prevede un primo livello ad una densità di cianobatteri di 20.000 cell/mL, al di sotto del quale si stima una probabilità bassa di avere effetti avversi (WHO, 2003). Questo livello è definito sulla base degli studi epidemiologici disponibili e sul contenuto intracellulare di tossine. Considerando, infatti, un contenuto di 0,2 pg MC/cell (ad eccezione di situazioni nelle quali sono dominanti cianobatteri produttori di MC come *Planktothrix* spp. per i quali si stima un contenuto doppio) l'ingestione di un volume di 200 mL di acqua comporterebbe per un adulto di 60 kg di peso un'assunzione fino a 0,8 µg MC/giorno, 1,6 µg considerando *Planktothrix* spp. Si tratta in ogni caso di valori inferiori anche al solo rischio cronico. Per un bambino di 10-15 kg di peso, (corrispondenti a circa un anno di età), un'ingestione fino a 100 mL di acqua (un volume ritenuto appropriato per l'età) comporterebbe un'assunzione rispettivamente di 0,4-0,8 µg MC/giorno. Sarebbe superata la soglia di protezione dal rischio cronico, nel solo caso di dominanza di *Planktothrix* spp., ma non quella del rischio sub cronico.

È anche opportuno rilevare che le fioriture di *Planktothrix rubescens* nel nostro Paese interessano la parte superficiale del bacino, dove si svolgono le attività di balneazione e ricreative, solo nel periodo invernale.

L'OMS ha definito un secondo valore guida ad una densità di 100.000 cell/mL: l'intervallo tra 20.000 e 100.000 cell/mL corrisponde ad una probabilità moderata di effetti avversi irritativi.

Alla densità di 100.000 cell/mL possono essere presenti 20 µg MC/L (40 µg MC/L in caso di *Planktothrix* spp.). Un adulto potrebbe dunque assumere 4-8 µg MC/giorno che comportano il superamento della soglia di protezione dal rischio cronico ma non da quello sub-cronico. Tuttavia per un bambino di 10-15 kg di peso, l'ingestione di 100 mL di acqua corrisponderebbe ad una dose di 2-4 µg al giorno, vicina al DNEL (*Derived No Effect Level*)$_{subcronico}$.

In conclusione, si ritiene valido il valore di 20 µg MC/L come linea guida perché sufficientemente protettivo della salute di tutti i bagnanti.

In relazione invece alle densità dei cianobatteri, i nuovi dati che si sono resi disponibili dall'anno della pubblicazione delle linee guida dell'OMS (WHO, 2003) indicano contenuti anche più alti che è opportuno prendere in debita considerazione (*vedi* capitolo A7).

Considerando come caso peggiore un contenuto intracellulare di tossina di 0,7 pg/cell (trascurando la frazione disciolta in acqua e non considerando le schiume, che per se stesse richiedono misure di prevenzione) i 20 µg/L di MC, utilizzati dell'OMS per proteggere dagli effetti sistemici, sarebbero infatti raggiunti con una densità cellulare di circa 30.000 cell/mL. Fare riferimento al limite di 100.000 cell/mL senza misurare le tossine non è dunque sufficientemente cautelativo per la protezione della salute dei bagnanti.

Ovviamente la presenza di schiume superficiali rappresenta una situazione di elevato rischio, sia per la maggior densità cellulare e sia per il fatto che la concentrazione intracellulare di MC potrebbe essere superiore a quella delle cellule in colonna d'acqua (in uno studio è stato riportato un valore di 1,5 pg MC/cell in schiume superficiali di *P. rubescens*) e attraverso l'ingestione accidentale di acqua si potrebbe ingerire una dose di MC superiore a quella acuta.

L'ingestione accidentale di acqua interessata da elevate densità di cianobatteri può comportare anche la comparsa di effetti irritativi/infiammatori alla mucosa del tratto gastro-intestinale (come sito di contatto) che verranno descritti nel paragrafo successivo.

Per le altre cianotossine, come descritto nel capitolo A4, l'OMS non ha definito linee guida per le acque potabili e per quelle di balneazione, perché ha ritenuto la base di dati tossicologici insufficiente per derivare una TDI (*Tolerable Daily Intake*).

Tuttavia, come mostrato nel capitolo A7, alcuni invasi italiani sono interessati da fioriture di cianobatteri produttori di altre cianotossine, in particolare di anatossina-a (ATX-a) e cilindrospermopsina (CYN).

Alcuni Paesi hanno adottato valori di riferimento per queste cianotossine nell'acqua potabile. Ad esempio, Australia e Nuova Zelanda indicano un valore di riferimento di 1 µg/L di CYN; il Brasile indica invece un valore di 15 µg/L. Per l'ATX-a, la Nuova Zelanda propone un valore di 6 µg/L e il Canada di 3,7 µg/L.

Su questa base e soprattutto in considerazione di quanto riportato nel capitolo A4, si può ritenere provvisoriamente accettabile un valore di 1 µg/L sia per l'ATX-a che per la CYN per l'acqua potabile. Questo valore coincide con quello delle MC, pertanto per le acque di balneazione si può ritenere accettabile un valore di 20 µg/L.

In riferimento ai contenuti cellulari in invasi italiani è stato riportato un valore massimo per la CYN di 0,13 pg/cell in *Aphanizomenon ovalisporum* (Lago di Albano) (che rientra in un ampio range di valori osservato per *Aphanizomenon flos-aquae* in prove di laboratorio). Per l'ATX-a sono stati riportati soprattutto valori riferiti a peso secco, con una grande variabilità e che comunque non possono essere utilizzati per derivare i contenuti intracellulari. È disponibile un unico valore di 0,03 pg/cell misurato nel Lago di Como in *Dolichospermum lemmermannii*.

B1.1.2. Esposizione per contatto diretto con l'acqua (cutanea, orale e inalatoria)

L'esposizione da contatto può dar luogo ad effetti topici di tipo irritativo (occhi e pelle) e si stima che contribuisca in modo non significativo all'insorgenza di effetti sistemici, in ragione della difficoltà di assorbimento per via cutanea di molti congeneri delle MC, caratterizzati da elevata idrofilicità. Oltre agli effetti cutanei, sono stati descritti anche fenomeni irritativi e/o infiammatori delle mucose al sito di contatto sia nel tratto gastrointestinale che alle vie respiratorie.

I casi in cui sono stati finora osservati e descritti effetti topici al sito di contatto (cute e o mucose) non sembrano associati alla presenza di cianotossine, che come tali sperimentalmente non hanno mostrato né potenziale irritante né sensibilizzante. L'ipotesi più plausibile, anche se finora mai dimostrata, sembra che gli effetti locali possano essere attribuiti piuttosto alla presenza di altre tossine come le endotossine LPS (lipopolisaccaridiche) sulla membrana cellulare dei cianobatteri: questo spiegherebbe anche gli effetti irritativi e le reazioni allergiche indotte da estratti di cianobatteri. Non va trascurata tuttavia la possibilità che possano giocare un ruolo anche altri agenti eziologici sia chimici (sostanze come aldeidi, chetoni e terpeni, che si formano durante le fioriture) che biologici (comunità batteriche come *Aeromonas*, spesso concomitanti).

Pertanto per proteggere dagli effetti di tipo irritativo non è corretto stabilire delle soglie di concentrazione di MC (o di altre tossine), ma è più appropriato considerare il numero di cellule (in alternativa la superficie o la biomassa).

I dati epidemiologici disponibili hanno spesso quantificazioni dell'esposizione insufficienti alla identificazione di valori di riferimento, e generalmente utilizzano come categorie espositive quelle definite nelle linee guida dell'OMS: i) <20.000 cell/mL; ii) tra 20.000 e 100.000 cell/mL; iii) >100.000 cell/mL (WHO, 2003). Non è quindi possibile individuare corrispondenze fra soglie intermedie (fra 20.000 cell/mL e 100.000 cell/mL) e sintomatologie riscontrate. I dati nel loro insieme sembrano confermare che fino a 100.000 cell/mL gli effetti eventualmente prodotti nei casi segnalati (pochi rispetto al totale dei bagnanti) sono reversibili in tempi brevi e di lieve entità, dovuti ad effetti locali (pelle, occhi e mucosa gastrointestinale e delle vie aeree superiori) tali da non richiedere il ricorso a cure mediche. Sembra quindi di poter concludere che l'incidenza sia ragionevolmente bassa, anche considerando la possibile sottostima, derivante dal fatto che molti casi lievi potrebbero non essere stati segnalati, perché risolti con interventi di auto-medicazione. Sembra quindi confermato che fino a 20.000 cell/mL la probabilità di avere effetti sia ragionevolmente bassa e che invece tale probabilità sia moderata nella fascia intermedia.

Oltre 20.000 cell/mL è opportuno, pertanto, avvisare la popolazione della possibile insorgenza di sintomatologie irritative in seguito a contatto con cianobatteri e dal momento che dai dati disponibili emerge che il gruppo maggiormente a rischio è costituito da bambini e adolescenti (età inferiore ai 19 anni), è necessaria un'attenzione specifica per queste fasce di età.

B1.1.3. Esposizione per inalazione

Relativamente alla via inalatoria, molti dei sintomi descritti possono essere attribuiti ad un effetto locale sulla mucosa delle vie aeree superiori, che non sembrano riconducibili alla presenza di cianotossine, quanto piuttosto al contatto diretto con le cellule e alla presenza di tossine LPS. Non ci sono dati disponibili sulle densità cellulari associate a sintomi riconducibili all'inalazione di acque contaminate, anche per la difficoltà a separare le vie di esposizione durante gli studi (spesso concomitanti, o comunque in situazioni di bloom molto intensi). Al momento non si conosce la dinamica di formazione dell'aerosol (es. condizioni ambientali e

climatiche o attività da svolgere in acqua necessarie perché si abbia formazione significativa di aerosol), anche se può essere ipotizzato che vento forte e elevato idrodinamismo, sia dovuto alle condizioni climatiche che alla presenza di navigazione di imbarcazioni a motore e ad attività sportive come sci d'acqua e canoa, che comportano un notevole spostamento di masse d'acqua, possano essere condizioni in grado di favorire formazione di aerosol.

Relativamente a disturbi sistemici, è stato dimostrato che le MC sono presenti nell'aerosol e in tamponi nasali di soggetti esposti, ma non è nota la biodisponibilità delle tossine dopo inalazione per valutare la possibilità di indurre effetti sistemici. Partendo dalla TDI di 0,04 µg/kg di peso corporeo, ammettendo una biodisponibilità simile a quella i.p. per essere altamente conservativi e considerando il volume d'aria respirato durante una attività sostenuta da un uomo adulto di 60 kg, è stato proposto un possibile valore limite per la concentrazione di MC nell'aerosol di 4,58 ng MC/m^3: i livelli di MC e NOD (Nodularine) fin qui misurati sperimentalmente nell'aerosol sono di due o 3 ordini di grandezza inferiori, anche in presenza di elevate concentrazioni di MC nell'acqua e quindi non sembrano rappresentare un rischio. Tuttavia non è mai stata misurata la densità cellulare corrispondente, per poter stabilire una correlazione, né è stata controllata la presenza di frammenti cellulari nell'aerosol, che potrebbero rappresentare un importante fattore confondente, essendo una causa concomitante di irritazione meccanica.

In definitiva, i limiti che proteggono dai rischi di ingestione e da contatto, sembrano sufficienti a proteggere anche da questa via di esposizione.

B1.2. Indirizzi internazionali: sorveglianza e informazione al pubblico

L'opuscolo "Current approaches to cyanotoxin risk assessment, risk management and regulations in different countries", a cura di Ingrid Chorus (Chorus, 2012), è una sintesi delle procedure adottate da diversi Paesi per la valutazione e la gestione del rischio associato alle fioriture di cianobatteri nelle acque potabili e di balneazione. Questo documento riporta alcuni utili esempi di informazione al pubblico, che nella direttiva europea sulle acque di balneazione è tra le principali attività di salvaguardia della salute, oltre a rispondere al diritto dei cittadini di ricevere un'informazione adeguata, tempestiva e trasparente. Nel settore delle acque di balneazione, l'informazione al pubblico deve avvenire in modo da proteggerne la salute pur tenendo in considerazione la promozione delle attività ricreative. Il divieto di balneazione comporta, infatti, danni all'economia locale e al guadagno di salute associato a queste attività.

Di seguito sono riportati schematicamente gli approcci adottati da alcuni Paesi.

B1.2.1. Australia

In Australia i corpi idrici vengono valutati ogni anno in relazione alla loro suscettibilità alla proliferazione dei cianobatteri, sulla base dei dati storici e delle caratteristiche fisico-chimiche. Su questa base vengono quindi classificati nelle categorie: molto scarso, scarso, insufficiente, sufficiente, buono e molto buono. Per le categorie fino allo stato di qualità buono, vengono definiti i seguenti tre livelli di allerta:

- *Green level*, corrispondente ad uno stato di sorveglianza o routine;
- *Amber level*, corrispondente ad uno stato di allerta;
- *Red level*, corrispondente ad uno stato di emergenza o azione.

All'interno dello stato di azione vengono indicati due livelli di soglia:

- Livello 1: ≥ 10 µg MC/L o ≥ 50.000 cellule/mL di *Microcystis aeruginosa* o biovolume equivalente ≥ 4 mm^3/L per la somma di tutti i cianobatteri, quando un produttore di tossina noto è dominante nel biovolume totale. Questa linea guida è basata sulla probabilità di effetti negativi sulla salute associati ad ingestione di tossine note (utilizzando come parametri la conta di *M. aeruginosa*, del biovolume o della concentrazione di microcistine).
- Livello 2: ≥ 10 mm^3/L per biovolume totale di tutti i cianobatteri o di schiume nelle quali non sono presenti tossine note.

B1.2.2. Danimarca

In Danimarca i comuni sono responsabili del monitoraggio della qualità delle acque di balneazione. Non sono disponibili linee guida ufficiali per lo svolgimento di tali attività, ma se si sospetta che una fioritura algale sia tossica, le autorità locali posizionano sul litorale una segnaletica per avvertire il pubblico di rimanere fuori dall'acqua. Gli avvisi vengono anche riportati dai giornali e sulle pagine web locali. L'Agenzia danese della Natura ha creato un sito web che informa il pubblico delle condizioni generali delle acque di balneazione (http://www.naturstyrelsen.dk/Vandet/Badevand/). Nel sito è indicata una regola pratica per fare il bagno in acque dove possono verificarsi fioriture di alghe tossiche: 1) posizionarsi in acqua fino a quando il livello raggiunge l'altezza del ginocchio; 2) se non è possibile vedere i piedi, non si dovrebbe fare il bagno. Il sito avverte il pubblico di fare in modo che bambini e animali domestici non entrino in contatto con schiume sulle superfici d'acqua, poiché potrebbero contenere livelli molto elevati di tossine algali.

B1.2.3. Finlandia

In Finlandia il monitoraggio si basa in gran parte sul controllo visivo, di conseguenza il costo di questa attività è relativamente basso. Nel monitoraggio delle acque di balneazione infatti l'obiettivo principale dovrebbe essere quello di fornire un allarme immediato agli utenti dell'acqua circa il rischio associato alla presenza di fioriture di cianobatteri. Questo obiettivo può essere raggiunto solo con mezzi rapidi e quindi relativamente semplici. Un allarme immediato si ottiene con l'obbligo per le autorità sanitarie comunali di mettere i segnali di pericolo sulle spiagge pubbliche, quando l'ispezione visiva mostra che i cianobatteri sono presenti in numero elevato o molto elevato nelle acque di balneazione. Questo obbligo è previsto nella legislazione nazionale. Vengono utilizzati i simboli della Commissione europea per l'informazione al pubblico in materia di classificazione delle acque di balneazione e l'eventuale divieto di balneazione o avviso che sconsiglia la balneazione (Europa, 2011), integrati con informazioni sugli effetti nocivi per la salute dovuti alle cianotossine. Il razionale di questo approccio si basa sul fatto che secondo i dati disponibili, più della metà dei cianobatteri sono tossici. Quindi, la sola presenza di fioriture di cianobatteri è un forte segnale di potenziale pericolo per la salute dei bagnanti. L'analisi di tossine specifiche da campioni di acque di balneazione richiede troppo tempo e non permette di raggiungere la necessaria rapidità di valutazione e di azione. Inoltre, potrebbero essere presenti cianotossine pericolose di cui non è stata condotta l'analisi. Pertanto, in Finlandia le analisi di cianotossine specifiche non sono raccomandate se non in situazioni particolari.

B1.2.4. Francia

La Francia ha stabilito i seguenti tre livelli:

- Livello 1. Il numero delle cellule di cianobatteri è tra 20.000 e 100.000 cellule/mL ± 20%: le attività ricreative sono ancora autorizzate e il pubblico viene informato con un'adeguata segnaletica. I controlli visivi vengono effettuati su base giornaliera. Il campionamento per la conta e l'identificazione delle specie viene eseguito almeno su base quindicinale.
- Livello 2. Se il numero di celllule è >100.000 cellule/mL ± 10%, vengono analizzate le microcistine. Se la concentrazione espressa in LR-equivalenti è <25 µg/L, la balneazione viene limitata; viene vietata se la concentrazione è >25 µg/L. In entrambi i casi, il pubblico viene informato.
- Livello 3. Sono presenti in zone di balneazione schiume da cianobatteri: tutte le attività in acqua vengono vietate. Le restrizioni non si applicano necessariamente a tutto il sito ricreativo. Altre aree senza schiuma possono essere ancora aperte.

L'Agenzia francese ANSES (*Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail*) sottolinea anche il problema delle acque di balneazione artificiali aperte al pubblico il cui uso in Francia è molto aumentato negli ultimi 10 anni. Si tratta di stagni artificiali o naturali e piscine pubbliche non soggette a trattamenti e a disinfezione, quindi un ibrido tra un sito di balneazione in un lago naturale o fiume e una piscina all'aperto. Non sono coperti da norme per tutelare la salute dei bagnanti e non sono quindi soggetti ad alcun obbligo di monitoraggio delle acque. Queste acque possono essere soggette, tra l'altro, a proliferazioni di cianobatteri.

Considerazioni e raccomandazioni dell'ANSES per la valutazione del rischio:

- Sono carenti i dati sulle distribuzioni spaziali e temporali delle fioriture potenzialmente tossiche e sulla produzione di microcistine.
- I dati sulla presenza di cianobatteri sono carenti nelle acque salmastre e marine.
- I dati sono insufficienti per valutare l'esposizione della popolazione francese alle microcistine attraverso le acque di balneazione.
- Viene raccomandata una nuova soglia di 13 µg/L ± 5% MCeq per il divieto di balneazione e di altre attività ricreative, per proteggere la popolazione più sensibile (i bambini tra i 2 e 7 anni).

Tuttavia questa ultima raccomandazione non ha una base scientifica e appare una misura molto empirica.

B1.2.5. Paesi Bassi

Nei Paesi Bassi, un Protocollo del 2011 fornisce le linee guida per le acque di balneazione per le quali il profilo indica che la proliferazione di cianobatteri è prevedibile sulla base dei dati storici o delle condizioni del corpo idrico. Il protocollo lascia una relativa flessibilità per l'ispezione in loco e la valutazione dell'esperto e distingue tra due livelli di allerta. La distinzione tra i livelli 1 e 2 è effettuata sulla base della concentrazione della biomassa di cianobatteri nella colonna d'acqua, e la presenza / assenza e intensità di schiume superficiali:

- Livello di allerta 1: la biomassa dei cianobatteri è nel range 2,5-15 mm^3/L di biovolume di cianobatteri, o di 12,5-75 mg/L di clorofilla-a. Non è richiesta alcuna azione. A questo livello il rischio di effetti negativi per la salute si presume sia modesto o il problema ristretto ad una piccola area delle acque di balneazione. Pertanto si informa il pubblico

che sono state osservate fioriture di cianobatteri che possono causare irritazioni cutanee o disturbi intestinali. In caso di schiume locali, si emette rapidamente un avviso solo per l'area interessata, che può essere ritirato a breve termine. La frequenza del monitoraggio aumenta da due volte al mese a settimanale. Quindi i dati sono ottenuti attraverso un programma con frequenza da ogni due settimane a settimanale con visite in loco e campionamenti. Sono disponibili linee guida per il campionamento dei cianobatteri (van der Oost, 2009). I campioni devono essere prelevati in più posizioni, a seconda se sono presenti schiume superficiali, e se queste si trovano in o al di fuori della zona di balneazione. I campioni prelevati all'esterno delle schiume devono sempre essere inclusi nelle attività di campionamento.

- Livello di allerta 2: la biomassa supera 15 mm^3/L di biovolume o 75 mg/L clorofilla-a. Se la comunità dei cianobatteri è dominata da generi che producono microcistine (>80%), può essere eseguita una determinazione opzionale di queste cianotossine e se i livelli sono inferiori a 20 µg/L l'allerta può essere abbassata al livello 1. Tuttavia, si deve tenere conto anche della possibilità che siano presenti generi che producono cianotossine diverse dalle microcistine.

Una particolare attenzione viene dedicata alle schiume che possono contenere livelli molto elevati di cianotossine. Nei Paesi Bassi vengono riportate regolarmente concentrazioni di microcistine ben oltre 10 mg/L. Le schiume vengono distinte in 3 categorie.

- categoria I: le cellule di cianobatteri galleggiano sulla superficie;
- categoria II: le cellule formano strati di schiuma, ma occupano una superficie limitata.
- categoria III: lo strato di schiuma si estende su una superficie maggiore, e sono presenti schiume persistenti, occasionalmente sono visibili pigmenti blu rilasciati dalle cellule lisate.

Sono disponibili istruzioni specifiche, comprese le immagini per valutare l'intensità delle schiume. La formazione e la composizione delle schiume superficiali di cianobatteri è altamente dinamica e varia all'interno di un arco temporale di ore: il monitoraggio di queste dinamiche con mezzi di routine è quindi impossibile. Ibelings *et al.* (2003) hanno pubblicato un modello che prevede la formazione di schiume, in termini di tempi e posizione, sulla base delle previsioni del tempo locale/regionale. Questo modello si sta trasformando in uno strumento operativo però è ancora difficile trovare il giusto equilibrio tra falsi negativi e falsi positivi.

In Olanda, il pubblico viene informato circa i rischi per la salute associati ad esempio al nuoto, al windsurf, allo sci nautico e alle immersioni nei laghi. Sono disponibili linee telefoniche speciali nelle quali possono essere ottenute le informazioni relative alla qualità delle acque di corpi idrici specifici e siti dedicati (es. http://www.waterland.net/zwemwater) con mappe che mostrano dove queste attività non sono sicure. La maggior parte degli avvisi e quasi tutte le chiusure di laghi sono dovuti a fioriture di cianobatteri tossici.

La sorveglianza delle fioriture di cianobatteri dovrebbe in conclusione essere il risultato di una serie di considerazioni in equilibrio tra loro:

- *Rischi per la salute*. L'attuale valutazione del rischio per le attività ricreative nei laghi si basa principalmente sulla conoscenza delle microcistine. È limitata la conoscenza sulla presenza e sui rischi potenziali associati ad altre cianotossine. Ulteriori complicazioni sono dovute alle elevate dinamiche nella formazione di schiume e alla variabilità delle concentrazioni delle cianotossine.
- *Promozione di attività ricreative*. Il divieto di balneazione comporta danni all'economia locale e al guadagno di salute associato a queste attività.
- *Incertezze nel monitoraggio.* La conta delle cellule e del biovolume sono ancora pratiche comuni, anche se la loro riproducibilità e rappresentatività possono essere piuttosto

scarse, i costi sono elevati e la procedura richiede tempi lunghi. Nuove tecniche come le sonde fluorescenti e di caratterizzazione del DNA sono promettenti, ma mostrano ancora limiti. Possono essere utilizzate come *early warnings* ma dovrebbero essere supportate da un'adeguata valutazione del rischio sulla base della determinazione reale di cianotossine (e non solo microcistine).

- *Fattibilità, complessità e costi*. Una corretta valutazione e gestione dei rischi posti dalle fioriture dei cianobatteri non è un compito semplice. Per esempio, un controllo giornaliero sulle schiume non è ovunque possibile.
- *Comunicazione*. Un corretto protocollo e le misure risultanti dovrebbero essere presentati al bagnante medio per sostenerne la credibilità.

In conclusione la problematica delle fioriture di cianobatteri nelle acque di balneazione richiede un approccio equilibrato. L'opinione generale tra le autorità e le parti interessate sembra essere che il protocollo esistente non è abbastanza buono, ma è difficile da migliorare con le conoscenze e i mezzi a disposizione. Questo spiega anche perché il protocollo consente un certo grado di libertà nelle attività di monitoraggio e di gestione. Il protocollo sarà aggiornato annualmente sulla base dei progressi nelle conoscenze scientifiche e nelle tecniche di monitoraggio.

B1.2.6. Nuova Zelanda

La Nuova Zelanda ha definito linee guida per la gestione delle fioriture di cianobatteri plantonici e bentonici. Le linee guida includono anche un elenco dei laboratori in grado di identificare i cianobatteri e analizzare le cianotossine, forniscono esempi di comunicati stampa e di segnaletica.

Per i cianobatteri plantonici sono indicati tre livelli: sorveglianza, allarme e azione. A seguito dell'aumento delle segnalazioni di pico-cianobatteri (<2 µm, ad esempio *Aphanothece* spp. e *Aphanocapsa* spp.), è stato ritenuto più adeguato basare le attività di monitoraggio di questi cianobatteri sul biovolume invece che sulla conta delle cellule.

Le linee guida prevedono le seguenti azioni:

- Situazione 1: ≥12 µg/L microcistine o biovolume equivalente a ≥1,8 mm^3/L di cianobatteri potenzialmente tossici: continuare il monitoraggio come nel caso del livello allarme;
- Situazione 2: ≥10 mm^3/L biovolume totale di materiale formato da cianobatteri; se sono presenti generi potenzialmente tossici, considerare di analizzare le cianotossine;
- Situazione 3: sono presenti in modo consistente schiume dovute ai cianobatteri: informare il pubblico del potenziale rischio per la salute.

Il rischio associato ai cianobatteri bentonici è meno noto di quello riguardante i cianobatteri plantonici. La Nuova Zelanda ha definito linee guida, nonostante la base scientifica non sia abbastanza robusta. In determinate condizioni ambientali, o quando lo strato bentonico (*mats*) di cianobatteri diventa più spesso (con bolle di ossigeno intrappolate all'interno), si staccano parti di questo strato dal substrato che possono accumularsi lungo i bordi del fiume. Durante questi eventi aumenta il rischio per la salute umana e animale. I rischi più elevati sono dovuti all'ingestione di o al contatto con acqua contenente questo materiale. Il rischio ovviamente aumenta con l'aumentare dell'abbondanza di questo materiale e con il numero degli eventi di rilascio. Dunque le linee guida utilizzano l'abbondanza di cianobatteri e la presenza di questo materiale distaccato dal substrato bentonico per definire il livello di allerta. In alcuni fiumi è stata osservata una correlazione tra abbondanza di questi strati, la temperatura dell'acqua e assenza di condizioni di "flussi di lavaggio". In alcuni casi, l'estensione temporale di queste condizioni vengono utilizzate come

preallarme di un possibile elevato rischio di proliferazione di cianobatteri bentonici. Tuttavia la velocità del flusso necessaria per staccare il materiale dal letto di un fiume varia a seconda del tipo e della dimensione del substrato. In conclusione questo rischio viene valutato a livello locale, basandosi sulle esperienze accumulate da parte degli esperti.

B1.2.7. Stati Uniti

Negli Stati Uniti, l'Oklahoma è stato il primo Stato ad approvare una legge per limitare l'esposizione ai cianobatteri. L'attuale normativa richiede che sia gestito un sito web per il pubblico, che all'occorrenza deve essere informato con una specifica segnaletica. Infine, stabilisce che i bagnanti vengano informati quando la conta dei cianobatteri supera 100.000 cell/mL e le concentrazioni di microcistine superano 20 µg/L.

B1.3. Conclusioni

Sulla base di quanto sopra sintetizzato risulta che alcuni Paesi utilizzano la biomassa come parametro di riferimento nelle attività di monitoraggio. Il vantaggio di questo approccio è che comprende tutte le categorie di cianotossine, incluse quelle ancora non identificate o per le quali non sono disponibili valori di riferimento. Il limite di questo approccio è che non distingue tra fioriture tossiche e non tossiche, pertanto possono essere prese misure restrittive non necessarie anche nelle situazioni di scarsa tossicità.

La maggior parte dei Paesi basa i propri valori guida sulla conta delle cellule, tenendo conto delle concentrazioni delle microcistine. Ciò è giustificato dalla frequenza con la quale queste cianotossine vengono ritrovate ad alte concentrazioni (in particolare nelle schiume).

Alcuni Paesi fanno infine riferimento diretto ai livelli di microcistine, con valori compresi tra 12,5 e 25 µg/L.

Le neurotossine hanno una tossicità acuta ancora più elevata delle microcistine, ma non sono disponibili dati tossicologici adeguati per definirne i limiti di sicurezza.

Bibliografia

Chorus I (Ed.). *Current approaches to Cyanotoxin risk assessment, risk management and regulations in different countries*. Dessau-Roßlau, Germany: Federal Environment Agency (Umweltbundesamt); 2012. Disponibile all'indirizzo: http://www.uba.de/uba-info-medien-e/4390.html; ultima consultazione 20/12/14.

Europa. Decisione di esecuzione della Commissione, del 27 maggio 2011, che stabilisce, ai sensi della direttiva 2006/7/CE del Parlamento europeo e del Consiglio, un simbolo volto ad informare il pubblico della classificazione delle acque di balneazione e di ogni eventuale divieto di balneazione o avviso che sconsigli la balneazione. 2011/321/UE. *Gazzetta ufficiale dell'Unione europea* L143/38 del 31 maggio 2011.

Ibelings BW, Vonk M, Los HFJ, van der Molen DT, Mooij WM. Fuzzy modeling of cyanobacterial surface waterblooms: Validation with NOAA-AVHRR satellite images. *Ecol Appl* 2003;13:1456-72.

Oost, van der R. *Protocol voor het nemen van oppervlaktewatermonsters voor onderzoek naar toxines van cyanobacteriën en voor de alyse van de algensamenstelling.* Utrecht: Stowa; 2009. (Rapport n. 2009 21a).

WHO. *Guidelines for safe recreational water environment. Volume 1, Coastal and fresh waters*. Geneva: World Health Organization; 2003.

B2. PIANO DI SORVEGLIANZA

Enzo Funari, Maura Manganelli, Emanuela Testai
Dipartimento di Ambiente e Connessa Prevenzione Primaria, Istituto Superiore di Sanità, Roma

Come illustrato nel paragrafo B.1.2, in generale le attività di controllo sono basate sulle linee guida dell'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) (WHO, 2003). Tuttavia nei vari Paesi sono stati messi a punto approcci diversi che utilizzano varie combinazioni tra l'osservazione visiva, le attività di monitoraggio e l'informazione al pubblico. Questo approccio combinato nel suo insieme garantisce il sistema migliore per la tutela della salute dei bagnanti e permette di superare i limiti di un sistema basato soltanto sul monitoraggio. In effetti, le attività di monitoraggio delle fioriture di cianobatteri tossici sono attualmente caratterizzate da una serie di incertezze. Ad esempio, le linee guida dell'OMS sono state definite per le microcistine e generalmente i dati epidemiologici disponibili si riferiscono soltanto a queste tossine; la conta delle cellule e del biovolume, pur essendo pratiche comuni, presentano scarsa riproducibilità e rappresentatività e richiedono tempi lunghi. Le analisi delle cianotossine sono complesse, costose e richiedono lunghi tempi di esecuzione, se si escludono i kit di determinazione immunoenzimatica. Le attività di monitoraggio e anche la semplice osservazione visiva non possono essere assicurate con continuità: ad esempio, un controllo giornaliero sulle schiume non è ovunque possibile. È dunque evidente che le attività di monitoraggio devono essere affiancate da una adeguata informazione ai cittadini, che è l'unico mezzo con una valenza di continuità, promuovendo eventualmente la loro partecipazione con un rapporto di feedback. Alcuni Paesi, come Danimarca e Finlandia, lo utilizzano come unico strumento di gestione e prevenzione del rischio. Certo è necessario usare una comunicazione corretta ma equilibrata in modo che la priorità di salvaguardare la salute dei bagnanti non penalizzi inutilmente le attività turistiche, gli interessi economici e il benessere psico-fisico degli stessi bagnanti derivante dalla fruizione di queste risorse.

B.2.1. Monitoraggio ambientale di cianobatteri nelle acque di balneazione

Gli effetti avversi sopra riassunti sono dovuti alle diverse modalità di esposizione alle cianotossine; di conseguenza le attività di monitoraggio ambientale dovrebbero essere condotte in modo da valutare direttamente (analisi delle cianotossine) o indirettamente (densità cellulare) queste esposizioni. Il monitoraggio dei cianobatteri nelle acque di balneazione dovrebbe pertanto essere condotto sulla base di due principali finalità. La prima è quella di determinare il potenziale di proliferazione, necessaria per individuare i corpi idrici da monitorare. La seconda finalità è quella di determinare nei corpi idrici selezionati il livello di rischio sanitario associato alla presenza di cianobatteri tossici durante il periodo di balneazione.

B2.1.1. Potenziale di proliferazione dei cianobatteri

Il potenziale di proliferazione di cianobatteri è noto sulla base dei dati storici per gran parte dei bacini italiani. In alternativa può essere stimato da misure dirette (densità dei cianobatteri) o indirette (stato trofico).

Come descritto in maggior dettaglio nei capitoli A1 e A5, lo stato trofico è considerato un fattore chiave dello sviluppo dei cianobatteri, che è anche influenzato dai tempi di ricambio delle acque e dai processi di mescolamento. Studi condotti sin dagli anni '60 del secolo scorso hanno permesso di individuare il fosforo come uno dei principali fattori nel controllo dello sviluppo dei cianobatteri. Sulla base di questi studi è stato possibile proporre soglie di concentrazione predittive del rischio di sviluppo di popolazioni cianobatteriche con biomasse >50% sulla biomassa algale totale. Un deciso aumento della biomassa dei cianobatteri è previsto con concentrazioni di fosforo totale (*Total Phosphurus*, TP) >20 µg/L.

Saranno considerati a rischio di proliferazione, e quindi soggetti ad attività di monitoraggio, i bacini in cui i cianobatteri siano stati presenti a densità $>10^6$ cell/L negli ultimi 5 anni, e in assenza di tali informazioni che abbiano raggiunto una concentrazione di TP superiore a 20 µg/L anche una sola volta nell'ultimo triennio. Su questa base, i bacini con un basso potenziale di proliferazione (TP inferiore a 20 µg/L e assenza di fioriture di cianobatteri) non saranno oggetto di monitoraggio (*vedi* capitolo C1).

Poiché lo sviluppo di fioriture cianobatteriche è un processo dinamico, influenzato da variabili ambientali ancora non completamente conosciute e/o controllabili, è opportuno che le autorità locali preposte al controllo della qualità delle acque di balneazione verifichino annualmente il mantenimento di queste condizioni (cambiamenti del profilo, delle condizioni ambientali, idrologiche, ecc.).

Per i grandi bacini lacustri è possibile una suddivisione in aree con caratteristiche diverse (*vedi* capitolo C1).

B2.1.2. Monitoraggio delle fioriture di cianobatteri

Le attività di monitoraggio dovrebbero indicare le fasi di routine, di allerta e di emergenza:

– *Fase di routine*
  Corrisponde al verificarsi delle seguenti condizioni:
  1) trasparenza ≥1 m;
     fosforo totale <20 µg/L.
     In questo caso viene effettuato un campionamento mensile.
  2) trasparenza ≥1 m;
     fosforo totale >20 µg/L;
     densità di cianobatteri (totali) fino a 2.000 cell/mL.
     In questo caso viene effettuato un campionamento mensile e una ispezione visiva settimanale[2].
  3) trasparenza ≤1 m;
     fosforo totale ≥20 µg/L;
     densità cianobatteri (totali) tra 2.000 e 20.000 (±20%) cell/mL.
     In questo caso viene effettuato un campionamento quindicinale e una ispezione visiva settimanale: fino a queste densità non è necessario procedere alla identificazione delle specie e alla valutazione della loro tossicità. Il rischio sanitario è trascurabile e non è richiesta alcuna azione di gestione.

[2] La densità e la frequenza del campionamento sono state determinate considerando un tasso di duplicazione medio della popolazione pari a circa 1 settimana (da tassi di crescita misurati sul campo), per cui si potrebbe arrivare ad una densità di 20.000 cell/mL in circa 1 mese. La necessità di considerare la totalità dei cianobatteri presenti, indipendentemente dalla specie, è dovuta al fatto che gli effetti locali sono attribuibili alle tossine LPS che sono presenti in tutte le specie.

– *Fase di allerta*
Corrisponde solo a:
- densità cianobatteri >20.000 (±20%) cell/mL e microcistine (MC)-LReq <20 µg/L.
  A densità superiori a 20.000 cell/mL dovrebbero essere individuate le specie di cianobatteri e valutata la tossicità attraverso la quantificazione delle MC eventualmente presenti.

In questa fase dovrebbero essere effettuati un campionamento settimanale e una osservazione visiva ogni due giorni. Si dovrebbe procedere alla valutazione dell'estensione della fioritura e dei tratti di costa interessati. È opportuno verificare la presenza di cianotossine diverse dalle MC eventualmente presenti. Deve infine essere informato il pubblico con apposita segnalazione sui punti di accesso alla spiaggia e con altri eventuali mezzi che fare attività di balneazione e sportive in queste condizioni può causare effetti locali reversibili tra cui sintomi cutaneo-dermatologici, gastrointestinali e respiratori, soprattutto nei casi che favoriscono la formazione di aerosol (vento forte, elevato idrodinamismo e sport acquatici). Si deve infine avvisare la popolazione dei rischi che corrono gli animali domestici che possono bere grandi quantità di acqua contaminata e facendo il bagno essere esposti indirettamente attraverso l'abitudine di leccarsi il pelo (per i cani).
Durante la fase di allerta sarà necessario informare le autorità sanitarie per le opportune misure di gestione. Il Sindaco, in quanto autorità sanitaria locale, a seguito delle informazioni ricevute da ARPA (Agenzie Regionali per la Protezione Ambientale) e ASL (Aziende Sanitarie Locali), dovrebbe comunicare al Ministero della Salute le misure di gestione messe in atto in questa fase per informare il cittadino e prevenire esposizioni pericolose (segnaletica, bollettini, sistemi informativi locali, opuscoli, ordinanze).

– *Fase di emergenza*
Corrisponde a:
1) presenza di schiume in superficie.
2) concentrazioni di MC-LReq >20 µg/L.
3) densità di cianobatteri che producono altre cianotossine (cilindrospermopsina, CYN e anatossina-a ATX-a) >100.000 (±20%) cell/mL o concentrazioni di CYN e ATX-a >20µg/L.

In caso di formazione di schiume, è necessario verificare la presenza di cianobatteri e cianotossine. Poiché la presenza di schiume rappresenta la situazione di massimo rischio, si ritiene necessario sconsigliare o vietare la balneazione fino alla verifica del contenuto. Nel caso di accumulo di schiume sulla battigia, è opportuno procedere alla loro rimozione (e allo smaltimento come rifiuto speciale). La rimozione delle schiume, dove possibile, dovrebbe essere effettuata anche direttamente nel tratto del corpo idrico interessato.
In riferimento alla presenza di altre cianotossine, nel caso in cui non si voglia procedere al divieto di balneazione basato sulla sola densità cellulare di 100.000 cell/mL è necessario quantificare le cianotossine.
In questa fase dovrebbe essere intensificata l'osservazione visiva (*vedi* capitolo C1) e il monitoraggio e l'analisi delle cianotossine dovrebbero essere condotti fino alla senescenza della fioritura (per evitare la presenza di elevati livelli di tossine a fronte di un numero ridotto di cellule).
Le attività di balneazione e di sport acquatici sono fortemente sconsigliate o vietate per la possibile insorgenza di effetti sistemici dovuti all'ingestione accidentale di acqua contaminata e di questo deve essere opportunamente informato il pubblico con apposita evidente segnalazione sui punti di accesso alla spiaggia e con altri eventuali mezzi.

Il Sindaco, in quanto autorità sanitaria locale, a seguito delle informazioni ricevute da ARPA o ASL, dovrebbe comunicare anche al Ministero della Salute le misure di gestione messe in atto in questa fase per informare il cittadino e prevenire esposizioni pericolose, compresi eventuali divieti temporanei di balneazione.
Dovrebbe essere condotta un'attività di controllo dei livelli di cianotossine nei prodotti ittici presenti nell'area interessata dalla fioritura e in caso di riscontro di un rischio significativo (riferimento alla TDI, *Tolerable Daily Intake*, o ArfD, *Acute Reference Dose*) dovrebbe essere fornita adeguata informazione ai pescatori professionali e amatoriali.

Nelle fasi di allerta e di emergenza l'informazione al pubblico dovrebbe essere fornita attraverso i diversi portali istituzionali nazionali e locali (Ministero della Salute, Regioni, ASL, Comuni), i bollettini, oltre alla cartellonistica sulla spiaggia (*vedi* capitolo B4).

Nel capitolo C1 sono riportati i dettagli operativi per la conduzione del monitoraggio nelle diverse fasi.

B2.2. Piano di sorveglianza sanitaria

Sulla base delle informazioni acquisite dai veri studi epidemiologici, solo raramente la presenza di elevate densità di cianobatteri è stata associata ad insorgenza di effetti avversi per la salute umana. Inoltre la sintomatologia riportata è risultata nella maggior parte dei casi reversibile con risoluzione completa in tempi relativamente brevi, con un numero limitato di casi che hanno necessitato di cure mediche e solo in casi isolati di ospedalizzazione. Queste considerazioni dovrebbero dunque condurre alla conclusione che la predisposizione di un sistema di notifica non è sufficientemente motivato.

Le linee guida presentate di seguito hanno lo scopo di fornire i principali elementi per prevenire situazioni in grado di determinare episodi rilevanti per la Sanità pubblica.

In questo paragrafo vengono formulati alcuni suggerimenti, schematizzati nella Figura 1, per predisporre un'attività di sorveglianza sanitaria che potrebbe essere promossa in aree particolarmente interessate da questa problematica.

Come proposto nelle linee guida per la sorveglianza delle fioriture di *Ostreopsis* cf. *ovata* lungo le coste italiane, si potrebbe promuovere un sistema integrato di sorveglianza degli eventi sanitari associati ai cianobatteri, coinvolgendo da un lato gli operatori che, per la loro attività lavorativa, sono a contatto con un grande numero di bagnanti e frequentatori di spiagge e litorali, come i bagnini, i pescatori, le scuole di nuoto e immersione, i farmacisti, il personale addetto ai campionamenti dell'acqua, dall'altro i Dipartimenti di Prevenzione delle ASL, i medici di medicina generale e pediatri di famiglia, i farmacisti sul territorio nonché il personale sanitario dei Pronto soccorsi degli ospedali.

Nelle zone dove si verificano fioriture di cianobatteri gli operatori dei settori sopra elencati dovrebbero essere informati prima della stagione balneare con apposito materiale (es. opuscoli, brochure, siti web) o attraverso incontri. In questo modo potrebbero essere messi nelle condizioni di riconoscere alcuni dei sintomi (irritazioni e rash cutaneo, dermatiti, irritazioni oculari, sintomi gastrointestinali come nausea e vomito, tosse, mal di gola, difficoltà respiratorie) in soggetti che abbiano avuto contatto diretto con l'acqua, o abbiano praticato pesca, vela, kayak/canoa, gite in barca o sostato a lungo nelle immediate vicinanze del bacino idrico interessato dalla fioritura.

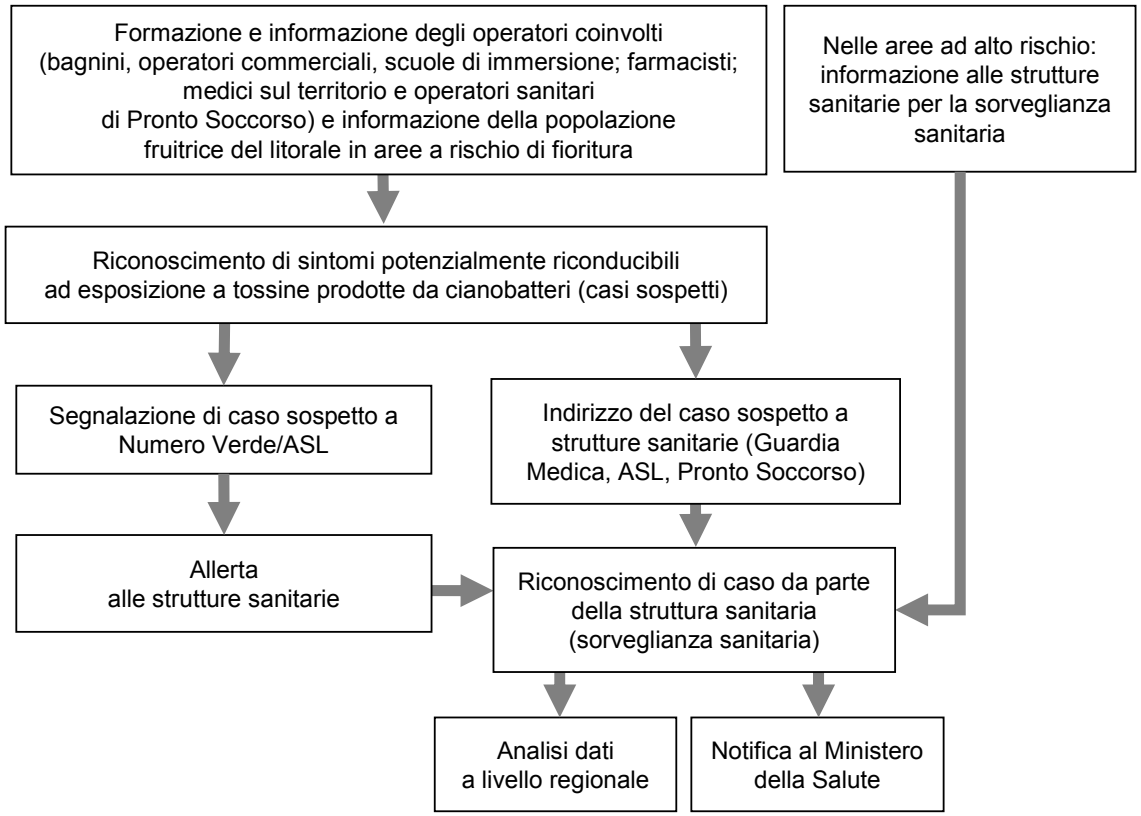


Figura 1. Schema di un possibile flusso di attività per la sorveglianza sanitaria a livello locale

Una volta individuati i possibili casi sospetti gli operatori dovrebbero:

a) segnalarli ad uno specifico numero verde (o qualsiasi altra forma sia considerata adeguata a livello locale) messo a disposizione dalla ASL
b) suggerire eventualmente di ricorrere ad assistenza medica (MMG, PdF, struttura sanitaria più vicina).

Ovviamente l'autorità sanitaria che riceve segnalazioni di casi sospetti dovrà fare le opportune verifiche, confermare i casi e descriverli da un punto di vista clinico-epidemiologico. In caso di conferma dovrebbe richiedere accertamenti rapidi sulla presenza di cianobatteri e tossine nel sito di balneazione interessato o sospetto. L'autorità sanitaria potrà quindi valutare l'opportunità di promuovere azioni di informazione e prevenzione nei confronti del pubblico, e richiedere l'intensificazione delle attività di monitoraggio. L'utilità di queste segnalazioni è indubbia in quanto permetterebbe da un lato di prevenire l'insorgere di episodi epidemici e di esposizioni potenzialmente più pericolose; dall'altro una migliore individuazione dei sintomi per arrivare alla definizione di 'caso' in modo da fornire indicazioni più precise per implementare un sistema di sorveglianza sindromica dedicato e per l'individuazione di aree critiche non ancora segnalate.

È infine opportuno che queste segnalazioni e i casi accertati vengano raccolti ed elaborati a livello regionale e nazionale.

Le strutture sanitarie dovrebbero segnalare gli accessi e i ricoveri corrispondenti alla definizione di caso ad un centro coordinatore su base regionale, responsabile dell'analisi e dell'elaborazione dei dati che notificherà al Ministero della Salute.

Bibliografia

WHO. *Guidelines for safe recreational water environment*. *Volume 1, Coastal and fresh waters*. Geneva: World Health Organization; 2003.

Allegato 1 al capitolo B2

Fasi del piano di sorveglianza e azioni da intraprendere nelle aree ad elevato e medio rischio di fioritura di cianobatteri

Fasi del piano *	Attività previste	Livelli di rischio sanitario	Misure di gestione
FASE DI ROUTINE			
1. trasparenza≥1m TP<20 µg/L	• campionamento mensile	Trascurabile	Nessuna
2. trasparenza≥1m TP>20 µg/L densità CB totali ≤2.000 cell/mL	• campionamento mensile • osservazione visiva settimanale		
3. trasparenza≤1m TP>20µg/L densità CB totali <20.000 (±20%) cell/mL	• campionamento quindicinale • osservazione visiva settimanale		
FASE DI ALLERTA			
1. Densità CB totali >20.000 (±20%) cell/mL MC-LReq <20µg/L	• campionamento settimanale • ispezione visiva ogni 2 gg • valutazione estensione della fioritura e tratti di costa interessata • identificazione delle specie • quantificazione MC e identificazione altre CTX	No effetti sistemici possibili sintomi cutaneo-dermatologici, gastrointestinali e respiratori reversibili	Il Sindaco dovrebbe comunicare al Ministero della Salute le misure di gestione messe in atto per informare il cittadino e prevenire esposizioni pericolose
FASE DI EMERGENZA			
1. presenza di schiume in superficie contenenti CB tossici	• attività svolte in Fase di allerta • sorveglianza sanitaria • quantificazione altre CTX	*Contatto*: possibili sintomi e/o segni locali. *Inalazione e ingestione*: possibili sintomi e/o segni locali, disturbi respiratori, effetti sistemici	Il Sindaco dovrebbe comunicare al Ministero della Salute le misure per informare il cittadino e prevenire esposizioni pericolose, indicando le misure di prevenzione adottate e le eventuali azioni intraprese (cartellonistica, bollettini, segnaletica, pubblicazioni sui portali nazionali e regionali; eventuali ordinanze sindacali di divieto). Se possibile, rimozione delle schiume dall'acqua; in caso di spiaggiamento delle schiume pulizia della battigia.
2. MC-LReq >20µg/L			
3. densità CB produttori di altre CTX >100.000 (±20%) cell/mL o concentrazioni di ATX-a o CYN >20µg/L			

TP=fosforo totale; CB=cianobatteri; MC-LReq=microcistine LR equivalenti; CTX=cianotossine; ATX-a=anatossina-a; CYN=cilindrospermopsina

Allegato 2 al capitolo B2

Scheda di raccolta dati essenziali per la descrizione di casi di possibile intossicazione umana da ciano tossine

Data |__|__||__|__||__|__|
(giorno, mese, anno)

Identificativo del paziente ……/…….
(prime due lettere del nome e cognome)

Data di nascita |__|__||__|__||__|__| Sesso ❑ M ❑ F
(giorno, mese, anno)

Data di comparsa dei sintomi |__|__||__|__||__|__|
(giorno, mese, anno)

1. ESPOSIZIONE

	via orale	via inalatoria	via cutanea	altro
Esposizione				
Luogo	.....	.....	.....	.....
Data	|__|__||__|__||__|__| *(giorno, mese, anno)*	|__|__||__|__||__|__| *(giorno, mese, anno)*	|__|__||__|__||__|__| *(giorno, mese, anno)*	|__|__||__|__||__|__| *(giorno, mese, anno)*
Durata *(in giorni)*	.....	.....	.....	.....
Periodo di latenza *fra esposizione e comparsa dei sintomi*	.....	.....	.....	.....
Attività svolta	.....	.....	.....	.....

2. SEGNI E SINTOMI

Sintomi manifestati

febbre ≥38°C	❑ no	❑ sì	nausea	❑ no	❑ sì
tosse	❑ no	❑ sì	vomito	❑ no	❑ sì
cefalea	❑ no	❑ sì	diarrea	❑ no	❑ sì
dispnea	❑ no	❑ sì	mialgia	❑ no	❑ sì
faringodinia	❑ no	❑ sì	aritmia	❑ no	❑ sì
rinorrea	❑ no	❑ sì	parestesie	❑ no	❑ sì
irritazione oculare/lacrimazione	❑ no	❑ sì	intorpidimento/debolezza degli arti	❑ no	❑ sì
rash	❑ no	❑ sì			

altro *(specificare)* ……..

Patologie e condizioni mediche pre-esistenti

- ❑ malattie cardiovascolari *(specificare)* .....
- ❑ rinite
- ❑ ipercolesterolemia
- ❑ asma e altre patologie respiratorie cronico- ostruttive
- ❑ dermatiti
- ❑ altro *(specificare)* .....

Farmaci utilizzati precedentemente o al momento dell'esposizione:

.....

.....

3. ESAMI DIAGNOSTICI CONSIGLIATI

Tipo	**sì** *(indicare valori e range di laboratorio)*	**no**
.....	❑	❑
.....	❑	❑
.....	❑	❑
.....	❑	❑
.....	❑	❑
.....	❑	❑
.....	❑	❑

4. TERAPIA

.....

.....

.....

5. ACCESSO A STRUTTURA OSPEDALIERA

Accesso al Pronto Soccorso ❑ no ❑ sì

Data di ammissione |__|__||__|__||__|__| *(giorno, mese, anno)* Data di dimissione |__|__||__|__||__|__| *(giorno, mese, anno)*

Ospedalizzazione ❑ no ❑ sì

Data di ammissione |__|__||__|__||__|__| *(giorno, mese, anno)* Data di dimissione |__|__||__|__||__|__| *(giorno, mese, anno)*

Tempo trascorso dall'esposizione (in ore/giorni).....
Prognosi.....

Note .....

6. INFORMAZIONI DA REPERIRE E ASSOCIARE AL CASO SOSPETTO

Analisi di laboratorio per l'identificazione di cianotossine

Materiale per l'analisi

- ❑ prodotti ittici
  specificare specie e/o la parte.....
- ❑ acqua
- ❑ cianobatteri
- ❑ schiume
- ❑ aerosol
- ❑ campioni biologici umani
  specificare .....

Concentrazioni di cianotossine riscontrante dalle analisi effettuate per tipo di prova

	Residui di cibo	**Campioni biologici umani***	**Altro***
Metodo HPLC	.....	.....	.....
Metodo ELISA	.....	.....	.....
LC-MS	.....	.....	.....

Altro .....

** specificare*

B3. CONFERIMENTO DATI E REPORTISTICA

Maura Manganelli (a)*, Enzo Funari (a), Liana Gramaccioni (b)
(a) Dipartimento di Ambiente e Connessa Prevenzione Primaria, Istituto Superiore di Sanità, Roma
(b) Direzione Generale Prevenzione Sanitaria, Ministero della Salute, Roma
**maura.manganelli@iss.it*

Fino a questo momento i dati sui cianobatteri vengono pubblicati periodicamente da alcune Regioni, sotto forma di bollettini e nei siti dell'Agenzia Regionale per la Protezione Ambientale (ARPA) di ogni Regione. Non è disponibile invece un sistema di raccolta su scala nazionale.

B3.1. Flussi informativi

Alla luce delle nuove linee guida i dati dovranno essere conferiti al Ministero della Salute attraverso il Portale Acque, sulla base di quanto previsto dalle norme vigenti, secondo la modulistica allegata al capitolo. I referenti del monitoraggio ambientale delle ARPA e delle Regioni accreditati potranno accedere al Portale Acque del Ministero della Salute (http://www.portaleacque.salute.gov.it/) e trasmettere la scheda debitamente compilata.

Il Portale Acque riceverà inoltre dalle aree che si ritengono a rischio particolamente elevato le schede sanitarie con i casi associabili ad esposizione a cianobatteri secondo la modulistica allegata al capitolo B2.2. Questa scheda dovrà essere trasmessa al Portale acque del Ministero della Salute entro le 24 ore successive l'evento o inviata al seguente indirizzo di posta elettronica dgprev@postacert.sanita.it.

Annualmente verrà elaborato e pubblicato dall'Istituto Superiore di Sanità (ISS) un report nazionale nel quale saranno analizzati i dati con particolare attenzione agli aspetti sanitari.

Un'importante novità riguarda la raccolta dati relativa alla presenza di cianobatteri bentonici, sui quali al momento non è disponibile alcuna informazione dettagliata, ne' sulla abbondanza nei bacini italiani ne', tantomeno, sulla tossicità delle specie presenti. A tale scopo, le segnalazioni raccolte sulla scheda di monitoraggio sono necessarie per fornire una prima base conoscitiva dell'estensione del problema ed eventualmente delle situazioni che necessitano un approfondimento.

B3.2. Raccolta dei dati e reportistica

È stata elaborata una scheda (in allegato al capitolo) per il conferimento dei dati al Portale Acque del Ministero della Salute relativa al monitoraggio delle fioriture di cianobatteri nelle acque di balneazione selezionate sulla base di quanto riportato nel capitolo B2.

Le schede si riferiscono alle singole acque di balneazione definite con codice ID.

La scheda è divisa in due parti, una relativa ai dati da raccogliere durante il campionamento e una con i parametri da analizzare in laboratorio; contiene tutte le informazioni necessarie per la conoscenza del fenomeno e per la gestione dello stesso.

Alcuni parametri possono essere misurati con sonde multiparametriche e sono richiesti solo se l'unità preposta al campionamento ne possiede una.

La determinazione dei nutrienti, da effettuare in laboratorio, è facoltativa, ad esclusione del fosforo totale, che è invece richiesto.

I dati saranno analizzati a più scale spaziali:

- *Sintesi a livello di bacino (lago)*
  I dati recapitati al Portale saranno utilizzati per elaborare la sintesi a livello di bacino in automatico utilizzando un software specifico.
  La sintesi riguarderà i campionamenti effettuati su tutto il bacino nell'arco temporale di un mese (giugno, luglio, ecc.). La sintesi riporta le acque di balneazione del bacino con densità di cianobatteri tossici > 20.000 cell/mL e contiene: specie, densità cellulare, concentrazioni di cianaotossine (CTX).

- *Sintesi a livello regionale o interregionale*
  È una sintesi descrittiva stagionale preparata dalle Regioni, che include: laghi interessati da fioriture di cianobatteri tossici con densità di almeno 20.000 cell/mL, specie, densità, livelli di CTX, andamenti, misure di gestione, informazione al pubblico.

- *Sintesi per il territorio nazionale*
  Viene preparata dall'Istituto Superiore di Sanità. Consiste nell'elaborazione di un quadro d'insieme con l'evidenziazione delle situazioni a maggiore criticità, gli andamenti, le azioni di recupero intraprese e da intraprendere, le raccomandazioni.

Allegato al capitolo B3

Scheda per la raccolta dati sui cianobatteri

(da compilare e trasmettere agli uffici competenti)

Data |__|__||__|__||__|__| ora |__|__||__|__|
(giorno, mese, anno) *(ora, minuti)*

Area di balneazione	ID ..... Coordinate geografiche ..... Regione, provincia, comune .....
Punto di monitoraggio	Coordinate geografiche ..... Profondità ..... Distanza dalla costa ..... Tipo di fondale .....
Condizioni meteo-climatiche	Forza del vento ❑ assente ❑ moderato ❑ forte Direzione del vento ❑ verso terra ❑ verso largo ❑ altro Condizioni metereologiche ❑ pioggia ❑ nuvoloso ❑ soleggiato Note *(morie di organismi acquatici, altre osservazioni)* ....
Schiuma	Presenza di schiume dovute a cianobatteri ❑ no ❑ sì Categoria della schiuma* ❑ tipo I ❑ tipo II ❑ tipo III Colore della schiuma…… Litorale interessato: estensione (in metri) area ❑ di balneazione ❑ non adibita alla balneazione
Fioritura	Densità cianobatterica tale da conferire una colorazione all'acqua ❑ no ❑ sì Litorale interessato: estensione (in metri) area ❑ di balneazione ❑ non adibita alla balneazione
Biofilm bentonico	Presenza di materiale visibile sul fondo ❑ no ❑ sì Litorale interessato: estensione (in metri) area ❑ di balneazione ❑ non adibita alla balneazione
Campionamento	❑ colonna d'acqua ❑ schiuma Temperatura acqua |__|__|,|__|°C trasparenza cm |__|__|__|

Dati facoltativi (se disponibile sonda multiparametrica)	Chl a	|__|__|,|__|	pH	|__|__|,|__|	OD*	|__|__|,|__|	OD%	|__|__|,|__|

* Una classificazione del tipo di schiuma è proposta nel protocollo del 2011 sul controllo della proliferazione di cianobatteri tossici in Paesi Bassi: tipo I) piccoli aggregati di cellule cianobatteriche galleggiano in superficie; tipo II) le cellule formano dei piccoli strati di schiume, senza però coprire in modo continuativo superfici estese per diversi metri quadrati; tipo III) lo strato di schiuma è compatto e copre una superficie più estesa ed è persistente

RISULTATI delle analisi di laboratorio

	ACQUA					SUBSTRATO BENTONICO
	colonna cell/L	**schiume** cell/L *Tipo I*	*Tipo II*	*Tipo III*		**substrato duro** cell/cm^2
Specie* e densità					**Specie** e densità**	
Se fase di ALLERTA o EMERGENZA *determinare:*						
CTX** µg/L					**CTX***** pg/cell	
.....					.....	
.....					.....	
.....					.....	
.....					.....	

ORGANISMI ACQUATICI						
Se fase di ALLERTA o EMERGENZA *determinare:*						
	Organismo***					
CTX** µg/g						
.....						
.....						
.....						
.....						
.....						

* *identificare almeno il genere*
** *determinazione MC e altre CTX totali (in base alle specie presenti). Riportare il metodo utilizzato (ELISA, HPLC MS/MS, altro) e, se HPLC, indicare le varianti*
*** *indicare l'organismo scelto e la parte analizzata*

Concentrazione di nutrienti (µg/L)

PTot	PO_4 *	NTot *	NO_3*	NH_4*

* *facoltativi*

B4. INFORMAZIONE AL PUBBLICO

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

Le acque di balneazione interessate da fioriture di cianobatteri sono soggette ad una forte variabilità temporale e spaziale. Le densità e le zone interessate possono essere poi soggette a cambiamenti anche repentini, difficili da seguire con le attività di monitoraggio (problemi con la frequenza delle osservazioni e dei campionamenti e tempi relativamente lunghi delle diverse analisi).

L'attività di monitoraggio non può seguire in tempo reale questa variabilità e non permette di prendere decisioni giorno per giorno o addirittura per frazioni di tempo inferiori. In conclusione, le attività di monitoraggio da sole non possono essere considerate sufficienti per la gestione di queste problematiche. Ad esempio, per quanto riguarda la qualità microbiologica, le attività di monitoraggio condotte con una frequenza media di un campionamento al mese non sono certo in grado di intercettare eventuali eventi di contaminazione che si possono verificare in condizioni circoscritte (eventi di contaminazione di breve durata).

Quindi la protezione della salute dei bagnanti non è assicurata semplicemente con lo svolgimento delle attività di monitoraggio.

Gli eventi di breve durata vengono previsti e comunicati ai cittadini allo scopo di prevenire esposizioni inaccettabili. La comunicazione ai cittadini è obbligatoria in queste occasioni, secondo la direttiva europea e il decreto nazionale di recepimento.

La comunicazione ai cittadini rappresenta dunque in questo caso il vero strumento di tutela della loro salute.

Un approccio analogo è stato proposto per la gestione delle fioriture di *Osteopsis.* cf. *ovata* e si ritiene altrettanto valido e necessario anche per evitare esposizioni pericolose nel caso delle fioriture di cianobatteri.

L'informazione al pubblico è in molti Paesi uno strumento centrale di gestione e prevenzione del rischio.

In gran parte del nostro Paese l'informazione al cittadino ancora non rappresenta una tradizione consolidata soprattutto per il timore di allarmare e allontanare i frequentatori delle spiagge, con ripercussioni economiche a livello locale. Ma questo ritardo deve essere superato perché la prevenzione da effetti dannosi alla salute dei frequentatori delle spiagge deve ovviamente occupare una posizione di priorità nella gestione di un'area di balneazione. Certo è necessario trovare un equilibrio in modo che il rispetto di questa priorità non penalizzi inutilmente le attività turistiche, gli interessi economici e il benessere psico-fisico derivante dalla fruizione di queste risorse.

Le autorità competenti dovrebbero predisporre un piano di comunicazione del rischio per informare gli stakeholder e la popolazione interessata ancor prima che si presentino situazioni di allerta o emergenza. È auspicabile che venga promosso un sistema di comunicazione ai cittadini che faciliti lo scambio di informazioni, con aspetti di feedback (la comunicazione fra utenti e autorità competente potrebbe avvenire anche tramite uso di social network, come Facebook e Twitter o di specifiche applicazioni), incoraggiando anche la partecipazione nelle attività di sorveglianza (es. segnalazioni di presenza di fioriture, di casi sospetti, di perturbazione ambientale, compresa la formazione di schiume pigmentate e le morie di organismi).

L'informazione al pubblico dovrebbe essere fornita a:

– *Livello centrale*
  Il Portale Acque del Ministero della Salute fornisce le seguenti informazioni:
  - caratteristiche generali sui cianobatteri e sulle diverse modalità di fioritura
  - sintesi della situazione nazionale: dati della sorveglianza sanitaria e del monitoraggio
  - sintesi delle linee guida: organizzazione del monitoraggio e della sorveglianza sanitaria
  - informazioni di carattere sanitario per prevenire esposizioni pericolose
  - link al sito dell'Istituto Superiore di Sanità (ISS) per scaricare il presente rapporto con le linee guida complete
  - link ai siti regionali per scaricare i rapporti annuali sull'andamento nazionale delle fioriture, gli eventuali impatti sull'ambiente acquatico e sugli organismi bentonici.

– *Livello regionale*
  Le informazioni da fornire al pubblico dovrebbero essere rese disponibili attraverso la stampa, i siti web o qualsiasi altro strumento considerato idoneo.
  Oltre alle informazioni fornite dal Portale Acque del Ministero della Salute, dovrebbero comprendere:
  - sintesi della situazione regionale: dati della sorveglianza sanitaria e del monitoraggio
  - organizzazione del monitoraggio e della sorveglianza sanitaria nella Regione;
  - strutture territoriali preposte alla sorveglianza e contatti per informazioni e segnalazioni (numeri telefonici e indirizzi web)

– *Livello locale*
  La comunicazione al cittadino, in particolare ai bagnanti, dovrebbe prevedere le seguenti azioni:
  a) realizzazione di un depliant sulla caratterizzazione del pericolo e riferimenti telefonici che il cittadino/turista può utilizzare all'occorrenza (facilmente accessibile al pubblico);
  b) facilitazione dell'accesso a siti web dove sono raccolti i dati di monitoraggio del periodo balneare e le azioni svolte dalle Autorità competenti in tempo reale;
  c) istituzione di un numero verde per rispondere a quesiti posti dai cittadini/turisti. Questo numero potrebbe essere attivo durante il periodo estivo e fare capo ad uno o più esperti del settore.

  Dovrebbe essere predisposta una cartellonistica visibile per le spiagge interessate dalle fioriture di cianobatteri con una sintesi della problematica, i siti web da consultare per approfondimenti e segnalazioni e le informazioni previste nelle fasi di allerta e di emergenza.

Di seguito viene riportato un esempio di informazione al pubblico tramite cartellonistica che potrebbe essere arricchito di immagini esplicative ed eventualmente tradotto in altre lingue, sulla base delle frequentazioni.

Esempio di informazione al pubblico

I cianobatteri sono un gruppo di batteri fotosintetici di vari colori distribuiti in tutti gli ambienti acquatici. Possono crescere molto velocemente e dar luogo a colorazioni dell'acqua (dal verde al rosso) e a schiume superficiali.

Spesso le fioriture (crescita molto elevata di cellule, visibili in superficie) di cianobatteri sono legate all'eutrofizzazione dei corpi idrici (immissione di quantità eccessive di nutrienti, attraverso scarichi civili, industriali, allevamenti e agricoltura).

Perché sono interessanti dal punto di vista sanitario?

Molte specie di cianobatteri producono tossine che, se ingerite in gran quantità o per tempi prolungati, possono avere un'azione su diversi organi (fegato, sistema nervoso, sistema gastrointestinale, ecc.). Oltre una certa densità, per esempio quando riescono a formare schiume, anche il contatto con i cianobatteri può dar luogo ad effetti locali reversibili con sintomi cutaneo-dermatologici, gastrointestinali e respiratori, soprattutto nei casi che favoriscono la formazione di aerosol (vento forte, elevato idrodinamismo e sport acquatici). Anche gli animali domestici possono essere esposti alle cianotossine, perchè bevono grandi quantità di acqua contaminata e si leccano il pelo dopo il bagno, ingerendo così anche le cellule che sono rimaste attaccate al pelo.

Questo problema è seguito con attenzione da enti e organi istituzionali preposti, attraverso specifici piani di monitoraggio e sorveglianza sanitaria.

Poiché il monitoraggio non può essere quotidiano, è importante la collaborazione dei cittadini nel comunicare alle stesse istituzioni possibili situazioni di rischio, come ad esempio la presenza di schiume superficiali o la presenza di colorazioni insolite dell'acqua.

In casi come quelli riportati nelle foto*, **è sconsigliato bagnarsi ed è opportuno evitare che i bambini e gli animali entrino in contatto con l'acqua e soprattutto con le schiume**.

Per ulteriori informazioni rivolgersi a .....
negli orari …. e consultare anche le pagine……

Poiché la collaborazione di tutti è preziosa per il più completo e tempestivo intervento, si chiede a chi, frequentando aree di balneazione, manifesti i sintomi sopra descritti di segnalarli al ……. Tel. (o SMS) n. …….. email ……..

Il Sindaco

……

* inserire nel cartellone foto con esempi di colorazioni intense delle acque e schiume superficiali

PARTE C
Indicazioni tecniche
per campionamento e metodi di analisi

Norme di sicurezza

Gli operatori tecnici durante tutte le fasi di raccolta e manipolazione del materiale dovrebbero adottare i Dispositivi di Protezione Individuale (DPI) previsti dalle procedure di sicurezza (es. indossare sempre DPI adeguati per proteggersi dal contatto cutaneo, specialmente in presenza di ferite; utilizzare dispositivi a filtro per la protezione da aerosol quando necessario).

C1. Campionamento

Maura Manganelli* (a), Eleonora Masala* (b), Daria Barberis (c), Giuseppina Mattiolo (d), Cristina Mosconi (d), Nico Salmaso (e)
(a) Dipartimento di Ambiente e Connessa Prevenzione Primaria, Istituto Superiore di Sanità, Roma
(b) Laboratorio di Prevenzione dell'Azienda Sanitaria Locale della provincia di Lecco, Oggiono (Lecco)
(c) Dipartimento di Prevenzione Medico, Azienda Sanitaria Locale della provincia di Brescia, Brescia
(d) Dipartimento Regionale Laboratori, Agenzia Regionale per la Protezione Ambientale del Veneto, Verona
(e) Centro Ricerca ed Innovazione, Fondazione Edmund Mach, San Michele all'Adige (TN)
**maura.manganelli@iss.it; eleonora.masala@asl.lecco.it*

La distribuzione spaziale e temporale dei cianobatteri e i livelli di tossicità possono essere soggetti a cambiamenti repentini, dipendendo strettamente dalle caratteristiche delle specie e ceppi, dalle caratteristiche morfometriche e idrologiche dei corpi idrici, e dalle condizioni climatiche (*vedi* capitolo A1). I cianobatteri possono avere una distribuzione omogenea, mentre le specie con vescicole gassose si possono sviluppare in strati localizzati subsuperficiali (es. *Planktothrix rubescens* in estate) o superficiali (*vedi* Figura A1.1). Data l'alta velocità raggiunta (fino a diversi metri al giorno) il posizionamento delle colonie cianobatteriche può cambiare nel giro di brevissimo tempo, da poche ore a giorni, dando luogo a fioriture superficiali. In condizioni di bel tempo, e con vento leggero (<3-5 km/h), le colonie possono essere trasportate in prossimità delle rive, dei porti e delle baie, dando luogo ad accumuli che rendono difficoltoso il monitoraggio e di conseguenza la valutazione del rischio nell'ambito di strategie di controllo fisse e programmate. La gestione dei casi di fioriture repentine ed estemporanee richiede l'adozione di un approccio in grado di fornire un adeguato intervento per la valutazione del rischio. Per questo, come specificato nel capitolo B2, una parte significativa del monitoraggio è rappresentata dall'ispezione visiva, oltre all'aumento della frequenza di campionamento.

C1.1. Scelta dei punti di monitoraggio

Il monitoraggio delle proliferazioni dei cianobatteri nelle acque di balneazione viene svolto normalmente all'interno di un lago naturale o artificiale più o meno ampio ed è affiancato dall'osservazione visiva. È quanto meno opportuno che le attività di monitoraggio siano condotte tenendo conto dello stato di qualità complessivo dell'intero bacino, in riferimento alla presenza di fioriture o schiume.

I punti di campionamento per il monitoraggio di sorveglianza delle proliferazioni cianobatteriche dovrebbero per quanto possibile coincidere con quelli per il controllo microbiologico delle acque di balneazione, salvo eccezioni dettate dalla valutazione dei criteri esposti di seguito.

I punti oggetto di indagine vengono scelti in funzione di:
- fruizione del corpo idrico (balneazione e sport acquatici);
- caratteristiche e omogeneità dei tratti di costa (baie, rive maggiormente esposte al vento);
- dati pregressi che individuano aree potenzialmente interessate da fioriture di cianobatteri;
- livello di antropizzazione delle coste;
- presenza di potenziali fonti di alterazione dell'equilibrio chimico-fisico del corpo idrico.

C1.2. Frequenza di monitoraggio

Il monitoraggio delle acque di balneazione con comprovato rischio di fioriture va effettuato durante la stagione balneare. Tuttavia si suggerisce di estenderlo temporalmente per una migliore caratterizzazione ecologica delle popolazioni cianobatteriche e soprattutto se nel corpo idrico vengono praticate attività sportive anche in altri periodi (ad esempio, surf, ecc.). Le persone che praticano queste attività devono essere informate delle condizioni delle acque in caso di fioriture o di presenza di un rischio significativo ad esse associato (ad esempio, proliferazioni di Planthotrix rubescens nella stagione invernale).

Ai fini del controllo per la balneazione i campionamenti dovrebbero essere avviati con almeno 2 settimane di anticipo rispetto all'apertura della stagione e condotti fino alla sua conclusione. La frequenza di campionamento si può sovrapporre inizialmente alla periodicità prevista per il controllo microbiologico (mensile) ma poi varia come descritto nel paragrafo B2.1 in funzione della fase in cui ci si trova (routine, allerta o emergenza). Nella fase di emergenza la balneazione dovrebbe essere sconsigliata o vietata e il monitoraggio ha il solo scopo di seguire l'evoluzione della fioritura e/o delle schiume fino alla completa regressionee verificare che le cianotossine siano tornate ai livelli pre-emergenza.

C1.3. Ispezione visiva

L'ispezione visiva dovrebbe riguardare i seguenti aspetti:

- presenza in superficie di schiuma, acqua torbida, sospensioni di consistenza gelatinosa, presenza di colorazioni anomale;
- segni di sofferenza di organismi acquatici.

In caso positivo, è opportuno effettuare un campionamento di acqua per procedere alla identificazione ed eventualmente alla conta cianobatterica. È bene tener presente che la proliferazione di alcuni tipi di alghe e di alcune macrofite acquatiche potrebbe essere confusa con proliferazioni di cianobatteri.

Attraverso tale ispezione dovrebbe infine essere segnalata anche la presenza sul fondale di strati di cianobatteri bentonici: in caso di presenza sarebbe opportuno effettuare un campionamento ad hoc per il riconoscimento delle specie presenti e una successiva valutazione caso per caso.

C1.4. Modalità di campionamento dell'acqua

Durante tutte le operazioni di campionamento, i lavoratori dovrebbero indossare gli opportuni dispositivi di protezione individuale: guanti, mascherina per aerosol e stivali in gomma. Se il campionamento è effettuato dalla barca, il personale deve essere adeguatamente preparato sul comportamento da tenere e informato dei possibili rischi.

Si consiglia di effettuare il primo campionamento della stagione balneare utilizzando un retino da plancton con maglia di 20 µm per effettuare un prelievo su tutta la colonna della zona eufotica, per controllare quali specie sono presenti e per verificare le densità relative (considerando che il campionamento con il retino è solo qualitativo).

Nei prelievi successivi si può procedere secondo il seguente protocollo:

- campionare nei primi 5-10 cm di profondità;
- riempire direttamente la bottiglia campionatrice, immergendola ancora chiusa e aprendola alla profondità giusta. Riempirla completamente, chiuderla ancora in immersione e tirarla fuori;
- svuotare la bottiglia del 20% circa, per facilitare l'omogenizzazione del campione una volta in laboratorio, prima della divisione in aliquote;
- chiudere bene la bottiglia e conservare al buio, al fresco, per il trasporto in laboratorio.

Il volume da prelevare dipende dalle analisi che si devono effettuare sul campione. Per i soli riconoscimento e conta di cianobatteri è sufficiente utilizzare bottiglie da 250 mL. In caso di analisi di cianotossine e/o nutrienti, è necessario prelevare un volume maggiore (non meno di 1 L), da dividere in aliquote non appena raccolto il campione. Fissare con soluzione Lugol o formaldeide solo un'aliquota necessaria alla conta.

C1.5. Prelievo di campioni di schiume superficiali

Ai fini di prelevare un campione di schiuma in modo ripetibile si consiglia, prima di effettuare il campionamento, di mescolare leggermente la schiuma con lo strato d'acqua sottostante al fine di disperderla nei primi 10 cm in una superficie adeguata (ad esempio, di circa 0,5 m di diametro).

Prelevare quindi velocemente un campione nei primi 5-10 cm della colonna d'acqua, evitando di rasentare la superficie, con la stessa procedura prevista per il campione d'acqua.

Si consiglia di prelevare il campione nel punto di massimo spessore della schiuma.

Alternativamente, si può utilizzare una bottiglia di campionamento progettata specificamente per raccogliere campioni superficiali minimizzando il movimento dello strato d'acqua durante le operazioni di prelievo (*Surface Bloom Sampler*, SUBS) (Bertoni, 2011).

C1.6. Prelievo di campioni dalla colonna d'acqua

Nel caso in cui si intenda acquisire informazioni sulla dimensione e distribuzione della popolazione di cianobatteri nel corpo idrico, si possono prevedere campionamenti discreti a diverse profondità o campioni integrati sulla colonna d'acqua.

Per campionare a diverse profondità si consigliano bottiglie di tipo Niskin o di tipo Van Dorn.

Il campione integrato risulta dall'insieme di campioni discreti a varie profondità, miscelati in opportuni contenitori, o è prelevato direttamente con un tubo lungo quanto lo spessore della colonna d'acqua che si vuole campionare. Per maggiori dettagli si rimanda al Protocollo per il campionamento di fitoplancton in ambiente lacustre (Buraschi *et al.*, 2007).

C1.7. Campionamento cianobatteri bentonici

Se durante l'osservazione visiva delle aree di balneazione, nei primi metri dalla battigia si osserva la presenza di substrato bentonico (ciottoli o sedimento) coperto da materiale vegetale, è opportuno procedere al campionamento per verificare la presenza di ciano batteri:

1) In presenza di massi ricoperti da biofilm, grattare un po' di materiale in contenitori sterili (tipo tubi falcon da 50ml) con un bisturi sterile; conservare il campione al buio al fresco e portarlo in laboratorio.
2) In presenza di sedimento ricoperto da biofilm, prelevare due-tre carote del sedimento direttamente con altrettanti tubi sterili da 50ml; conservare il campione al buio al fresco e portarlo in laboratorio.
3) In presenza di macroalghe ricoperte da biofilm, prelevare direttamente il biofilm in tubi sterili o se non è possibile, prelevare un frammento di macroalga ricoperta da biofilm e conservarla in una busta di plastica sterile, avvicinando la busta chiusa al substrato da prelevare sott'acqua e aprendola all'ultimo momento, per raccogliere il frammento di alga e poca acqua circostante. Alternativamente si può utilizzare al posto della busta una bottiglia a collo largo, che permetta di introdurre agevolmente il frammento di alga.

C1.8. Trasporto e conservazione dei campioni

Dopo il campionamento pulire accuratamente l'esterno del contenitore. I campioni devono essere trasportati al laboratorio per l'analisi nel più breve tempo possibile, al buio e refrigerati.

Entro 8 ore dal campionamento, fissare le aliquote di campione destinate alla conta cellulare o alla stima del biovolume con una quantità appropriata di Lugol (1%), per una analisi a breve termine, o con formalina (2,5%), per una conservazione del campione più a lungo termine. Il resto dei campioni dovrà essere conservato/trattato in condizioni da definire in base alle analisi che si intende effettuare.

Equipaggiamento per il trasporto e la conservazione:

- Per l'analisi delle tossine algali utilizzare bottiglie di vetro scuro dal collo largo, con tappi rivestiti di teflon (o comunque di materiale inerte).
- Per la conta cellulare e/o la stima della biomassa, utilizzare contenitori puliti di plastica o vetro.
- Controllare sempre tutti i contenitori e i tappi affinché siano privi di difetti. Non utilizzare quelli che presentano imperfezioni o che non siano perfettamente puliti.

Bibliografia

Bertoni R. A Surface Bloom Sampler (SUBS) for cyanobacteria and algae. *J Limnol*, 2011;70(2):313-314.

Buraschi E, Buzzi F, Garibaldi L, Lugliè A, Legnani E, Morabito G, Oggioni A, Pozzi S, Salmaso N, Tartari G. Protocollo per il campionamento di fitoplancton in ambiente lacustre. In: *Metodi biologici per le acque. Parte I*. Roma: Agenzia per la protezione dell'ambiente e per i servizi tecnici; 2007. (APAT, Manuali e linee guida XX/2007).

C2. ANALISI TASSONOMICHE E CONTEGGIO

Rossella Barone (a)*, Roberta Congestri (b), Maura Manganelli (c), Emanuela Viaggiu (b)
(a) Dipartimento di Scienze e Tecnologie Biologiche, Chimiche e Farmaceutiche, Sezione di Botanica ed Ecologia Vegetale, Università di Palermo, Palermo
(b) Dipartimento Biologia, Università degli Studi di Roma 'Tor Vergata', Roma
(c) Dipartimento di Ambiente e Connessa Prevenzione Primaria, Istituto Superiore di Sanità, Roma
**rossella.barone@unipa.it*

C2.1. Identificazione tassonomica

C2.1.1. Introduzione

I cianobatteri (Cyanobacteria, Cyanoprokaryota, Cyanophyta) rappresentano un *phylum* di alghe procariotiche di notevole importanza sia evolutiva sia ecologica. Sono organismi privi di flagelli, caratterizzati da una notevole diversità morfologica, nutrizionale ed ecologica. Il phylum comprende circa 150 generi e oltre 2000 specie.

I principali pigmenti fotosintetici sono la clorofilla-a, raramente -b, -d, -f e le ficobiliproteine ficoeritrina (rossa), ficocianina (blu), alloficocianina (blu grigio) assemblate in ficobilisomi disposti sulle membrane tilacoidali. Il colore delle cellule varia secondo la proporzione dei pigmenti, ma più frequentemente è blu verde, azzurro e rosso.

I tilacoidi sono generalmente distribuiti alla periferia della cellula. In questo caso l'osservazione al microscopio ottico permette di distinguere una zona periferica più colorata rispetto alla zona centrale. Alcuni taxa planctonici manifestano la presenza intracellulare di peculiari strutture, rinvenute nondimeno in altri batteri, denominate aeròtopi (ex vacuoli gassosi), aggregati irregolari di vescicole gassose contenenti gas metabolici eresponsabili sia della capacità di migrazione dei cianobatteri lungo la colonna d'acqua sia del loro eventuale galleggiamento superficiale.

La fotosintesi ossigenica li distingue dagli altri batteri fotosintetici; tuttavia, alcuni cianobatteri sono capaci di fotosintesi anossigenica. Alcuni, al pari di altri batteri, sono diazotrofi e, pertanto, capaci di fissare N_2. Nei cianobatteri filamentosi diazotrofi, spesso ma non sempre, sono presenti cellule specializzate per la fissazione di N_2 atmosferico, denominati eterociti (ex eterocisti), e cellule che rappresentano stadi di resistenza (acineti) all'interno delle quali sono visibili granuli di cianoficina (riserva proteica di azoto). Eterociti e acineti sono caratterizzati da spesse pareti, in particolare gli acineti manifestano frequentemente una parete cellulare (epispora) ornamentata e/o colorata. Il principale polisaccaride di riserva è un peculiare amido (cianamilon) affine al glicogeno. La parete cellulare contiene basse quantità di peptidoglicano (batteri Gram negativi) ed è spesso circondata da una guaina mucillaginosa.

Da un punto di vista morfologico i cianobatteri manifestano essenzialmente due forme: unicellulare e filamentosa, entrambe con la possibilità di aggregazione in colonie dovuta alla produzione di mucillagine che mantiene coesi i singoli elementi. Nelle colonie, cellule e filamenti possono essere distribuiti in modi differenti (es. radialmente, in un piano, irregolarmente). I filamenti possono essere ramificati, spiralati o diritti.

Nel caso di organizzazione morfologica filamentosa l'organismo privo di guaina è definito tricoma, mentre il termine filamento indica l'organismo più la guaina che lo circonda. La divisione cellulare si attua secondo uno o più piani con differenti modalità, talvolta utilizzate

come caratteristiche tassonomiche. La riproduzione è esclusivamente asessuale per scissione (forme unicellulari), mediante singole cellule riproduttive (forme unicellulari coloniali) o frammentazione (forme filamentose e unicellulari coloniali). La divisione cellulare per scissione può essere talmente rapida da iniziare nelle cellule figlie prima ancora che sia avvenuta la separazione dalla cellula madre.

Ubiquisti e capaci di colonizzare ambienti estremi, si rinvengono in habitat sia terrestre sia acquatico (marino, di acqua dolce e salmastro), dove possono dare origine a *bloom* talvolta tossici.

Nell'ambito degli ecosistemi acquatici i cianobatteri si distribuiscono in vari gruppi ecologici algali. In particolare, si rinvengono principalmente in sospensione nelle acque (planctonici), dove possono realizzare bloom, e aderenti ad un substrato (bentonici), dove spesso formano densi feltri (*mat*). La distinzione fra organismi planctonici e bentonici, tuttavia, non è sempre netta. Alcuni generi (es. *Aphanothece*) possono includere morfospecie sia planctoniche sia bentoniche. Inoltre, la stessa morfospecie comunemente planctonica può vivere bentonicamente in peculiari condizioni ambientali (es. *Microcystis* spp.), senza dimenticare gli organismi rimossi dal substrato (ticopelagici) che possono vivere planctonicamente per un certo periodo (es. *Gloeotrichia*).

Mentre è ormai noto il ruolo dei cianobatteri tipicamente planctonici come potenziali produttori di tossine, meno attenzione hanno ricevuto i cianobatteri tipicamente bentonici, anch'essi potenzialmente tossici. Pertanto, i rischi rappresentati dalle cianotossine in acqua dolce sono stati tradizionalmente associati ai cianobatteri planctonici ai quali è stata rivolta la maggior parte dell'attenzione scientifica, mentre pochi studi sono stati diretti ai cianobatteri bentonici la cui identificazione è ormai rilevante nell'ambito delle indagini limnologiche. Quiblier *et al.* (2013) hanno recentemente realizzato una review sull'attuale conoscenza dei cianobatteri bentonici tossici. I Cianobatteri planctonici sono ascrivibili prevalentemente alle componenti picoplanctonica (0,2-2 μm) e nanoplanctonica (2-20 μm), sebbene nel caso di lunghi filamenti o di formazione di colonie siano, rispettivamente, inseribili nel microplancton (20-200 μm) e nel mesoplancton (200-2000 μm). Talvolta le colonie sono visibili ad occhio nudo raggiungendo le dimensioni di alcuni mm.

La classificazione tassonomica dei cianobatteri (Cianoprocarioti, Cianofite) manifesta un continuo aggiornamento conseguente alle revisioni basate su un approccio polifasico che integra i risultati di analisi molecolari e morfologiche, la caratterizzazione ecologica e alcuni marker biochimici (Komárek, 2012). Numerosi generi sono stati divisi e ridescritti e numerose specie sono state trasferite in entità generiche, essenzialmente sulla base di criteri molecolari, ecologici e morfologici. Pertanto, negli ultimi anni, si sono verificate numerose correzioni nomenclaturali, soprattutto nell'ambito dei cianobatteri planctonici di acqua dolce caratterizzati dalla presenza di eterociti e tradizionalmente ascritti all'ordine Nostocales. Ad esempio, i tradizionali generi *Anabaena* e *Aphanizomenon*, produttori di anatossine, cilindrospermopsine, microcistine e saxitossine, sono stati distribuiti in diversi cluster a livello generico e, in accordo alle recenti revisioni, sono stati definiti nuovi generi (*Chrysosporum*, *Cuspidothrix, Dolichospermum*, *Sphaerospermopsis*).

Komárek & Mareš (2012) riportano e descrivono i generi planctonici della famiglia Nostocaceae (Nostocales) determinati in accordo alla valutazione polifasica fino ad Agosto 2011. Tutte le variazioni tassonomiche proposte nell'ambito dei Cianobatteri che manifestano eterociti sono, peraltro, riportate nel recente compendio della serie Süsswasserflora von Mitteleuropa (Komárek, 2013). Le variazioni nomenclaturali dei Cianobatteri e i corrispondenti riferimenti bibliografici sono consultabili nei database *CyanoDB.cz - On-line database of cyanobacterial genera* (Komárek & Hauer, 2013) e *AlgaeBase* (Guiry & Guiry, 2013). Una sintesi delle più recenti variazioni nomenclaturali delle specie più comuni in Italia e la caratterizzazione morfologica dei nuovi generi sono riportate in Tabella C2.1.

Tabella C2.1. Variazioni nomenclaturali (2005-2012) delle specie più comuni ascritte ai generi *Anabaena* e *Aphanizomenon* (Nostocales)

Genere	Specie	Nuova nomenclatura
Anabaena	*A. affinis* Lemmermann	*Dolichospermum affine* (Lemmermann) Wacklin, Hoffmann & Komárek
	A. bergii Ostenfeld	*Chrysosporum bergii* (Ostenfeld) Zapomelová, Skácelová, Pumann, Kopp & Janecek
	A. circinalis Rabenhorst	*Dolichospermum circinale* (Rabenhorst ex Bornet & Flahault) Wacklin, Hoffmann & Komárek
	A. crassa (Lemmermann) Komark.-Legn. et Cronberg	*Dolichospermum crassum* (Lemmermann) Wacklin, Hoffmann & Komárek
	A. flos-aquae Brébisson ex Bornet et Flauhault	*Dolichospermum flosaquae* (Brébisson ex Bornet & Flahault) Wacklin, Hoffmann & Komárek
	A.issatschenkoi Usachev	*Cuspidothrix issatschenkoi* (Usachev) Rajaniemi, Komárek, Willame, Hrouzek, Katovská, Hoffmann & Sivonen
	A. lemmermannii Richter	*Dolichospermum lemmermannii* (Ricter) Wacklin, Hoffmann & Komárek
	A. planctonica Brunnthaler	*Dolichospermum planctonicum* (Brunnth.) Wacklin, Hoffmann & Komárek
	A. spiroides Klebahn	*Dolichospermum spiroides* (Klebahn) Wacklin, Hoffmann & Komárek
Aphanizomenon	*A. aphanizomenoides* (Forti) Horecká et Komárek	*Sphaerospermopsis aphanizomenoides* (Forti) Zapomelová, Jezberová, Hrouzek, Hisem, Reháková & Komárková
	A.ovalisporum Forti	*Chrysosporum ovalisporum* (Forti) Zapomelová, Skácelová, Pumann, Kopp & Janeček

Nell'Allegato 1 del capitolo sono riportate le schede descrittive dei nuovi generi.

C2.1.2. Strumentazione

Il microscopio ottico a luce trasmessa corredato preferibilmente di contrasto di fase, di contrasto interferenziale DIC (*Differential Interference Contrast*) e di analizzatore di immagini.

Analogamente al contrasto di fase il DIC è utilizzato per osservare strutture trasparenti altrimenti non ben visibili in campo chiaro. Combina effetti di interferenza e di polarizzazione e fornisce immagini più contrastate con un effetto di tipo tridimensionale.

Per indagini più approfondite può essere utilizzata la microscopia a fluorescenza o la microscopia elettronica a scansione (*Scanning Electron Microscopy*, SEM) e a trasmissione (*Transmission Electron Microscopy*, TEM).

Ad integrazione della strumentazione necessaria si fa riferimento a Viaggiu *et al.* (2011).

C2.1.3. Chiavi di identificazione

L'identificazione tassonomica dei cianobatteri planctonici al microscopio ottico a luce trasmessapermette di stimare la densità di ogni singolo *taxon* adottando il metodo Utermöhl. Sfortunatamente la bibliografia tassonomica tradizionale non è ottimizzata per la gestione delle acque e contiene spesso un eccesso di informazione che rischia di rallentare il percorso

identificativo. Per sopperire a tali lacune sono sempre più frequenti e disponibili dei cataloghi o linee guida limitati ai taxa nazionali o regionali, dotati di chiavi di identificazione e di immagini (es. Bonilla, 2009).

La determinazione al microscopio ottico è possibile adottando il concetto di morfospecie e rilevando le principali caratteristiche morfologiche richieste dalle chiavi di identificazione disponibili. La morfospecie è una popolazione naturale di individui fenotipicamente distinti da quelli di altre popolazioni. Definisce ogni specie in base ad un particolare insieme di caratteri strutturali e rimane tuttora il metodo con il quale si distingue la maggior parte delle specie.

L'identificazione dei cianobatteri picoplanctonti (0,2-2 µm) rende necessario l'uso della microscopia a fluorescenza o di tecniche più complesse, soprattutto se occorre rilevare la tossicità della popolazione.

Per l'identificazione è sempre preferibile osservare il materiale vivo, possibilmente raccolto mediante retino, dato che i fissativi alterano il colore naturale e frequentemente la forma delle cellule. La fissazione dei campioni retinati con formalina al 2% (concentrazione finale) è la migliore, perché, nella maggior parte dei casi, concentrazioni più elevate producono artefatti nelle guaine mucillaginose e distorcono le dimensioni e la forma delle cellule. Il Lugol, sebbene consigliato per il conteggio, non è raccomandato per l'identificazione perché disintegra le colonie, provoca cambiamenti di colore e distorsioni nella guaina e nella mucillagine. Nei casi in cui è necessario accertare l'identificazione al microscopio elettronico è raccomandabile la fissazione in glutaraldeide al 2,5%.

Nelle chiavi di identificazione, relative ai più comuni ordini, generi e specie di Cianobatteri planctonici di acqua dolce rinvenuti in Italia (Tabella C2.2) è adottata la classificazione proposta da Hoffmann *et al.* (2005) per la suddivisione in ordini, peraltro utilizzata anche in AlgaeBase (Guiry & Guiry, 2013). Per l'identificazione dei generi e delle specie i riferimenti bibliografici essenziali sono Komárek & Anagnostidis (1998, 2005) e Komárek (2013). Altri testi disponibili per l'identificazione sono riportati da Viaggiu *et al.* (2011).

I caratteri diacritici per l'identificazione variano secondo il gruppo morfologico di cianobatteri. Ad esempio, nei cianobatteri unicellulari coloniali (Chroococcales) i caratteri da osservare che determinano l'assegnazione del genere e della specie sono rappresentati dalla forma generale della colonia (es. globosa, piana, cubica) e dall'aspetto della mucillagine aggregante (es. diffluente), dalla forma e dalle dimensioni delle singole cellule, dall'eventuale presenza di aeròtopi, che al microscopio ottico si manifestano come inclusioni cellulari di colore nerastro o rossastro dovuto al loro contenuto gassoso. Nei cianobatteri filamentosi non ramificati e privi di cellule specializzate degli ordini Oscillatoriales e Pseudanabaenales i principali caratteri da osservare sono l'aspetto generale (es. tricomi diritti, flessuosi o spiralati, presenza di guaina, presenza di restringimenti della parete trasversale fra cellule contigue, estremità più o meno rastremate), la forma e le dimensioni delle cellule (soprattutto la larghezza) e la forma della cellula terminale. Nei cianobatteri filamentosi non ramificati dell'ordine Nostocales ai caratteri diacritici delle oscillatoriali e pseudanabenali sono rilevanti le osservazioni delle caratteristiche morfologiche e dimensionali delle cellule specializzate (eterociti e acineti), la loro disposizione (es. solitari, intercalari, apicali), la loro reciproca posizione (es. eterociti contigui agli acineti). Gli organismi filamentosi possono, inoltre, manifestare morfologia uguale alle estremità (isopolarità) o mostrare polarità (eteropolarità), più o meno marcata.

Peraltro, l'osservazione di cellule specializzate non è sempre possibile perché alcuni tricomi non le manifestano o perché immaturi dopo germinazione o per la frammentazione del filamento, o perché le condizioni ecologiche inibiscono la loro formazione. In particolare, in acque ricche di azoto gli eterociti sono rari o assenti. Gli acineti sono assenti ancora più spesso perché compaiono nelle popolazioni mature o in condizioni ambientali sfavorevoli. Anche gli

aeròtopi possono essere talvolta assenti e l'aspetto delle cellule apicali può mostrare una certa variabilità nella stessa popolazione.

Tabella C2.2. Chiavi di identificazione dei più comuni generi e morfospecie rinvenuti in Italia

Chiave di identificazione degli ordini

1a. Organismi unicellulari (solitari o coloniali) ..... **Chroococcales, Synechococcales**
1b. Organismi filamentosi **2**

2a. Tricomi formati solo da cellule vegetative ..... **Oscillatoriales**, **Pseudanabaenales**
2b. Tricomi formati da cellule vegetative e cellule specializzate (eterociti e acineti) ..... **Nostocales**

Chiave di identificazione dei principali generi dell'ordine CHROOCOCCALES

1a. Colonie sferiche o irregolari, talvolta clatrate (con perforazioni o aperture), cellule arrotondate con aeròtopi ..... ***Microcystis***
1b. Colonie sferiche o irregolarmente ovali, cellule ovali con aeròtopi, comunemente presenza di cellule solitarie alla periferia della colonia ..... ***Woronichinia***

Chiave di identificazione dei principale generi degli ordini OSCILLATORIALES e PSEUDANABAENALES

1a. Tricomi solitari, diritti, cilindrici o leggermenteattenuati, cellule isodiametriche o fino a tre volte più lunghe che larghe, con aeròtopi ..... ***Planktothrix***
1b. Tricomi solitari o in masse, diritti, curvi o spiralati, non attenuati, cellule sempre più lunghe che larghe, con o senza aeròtopi **2**

2a. Tricomi solitari, diritti o spiralati, sempre con guaina..... ***Planktolyngbya***
2b. Tricomi solitari o in masse, diritti o curvi, senza guaina **3**

3a. Tricomi in masseo a volte solitari, con o senza aeròtopi, cellule generalmente costrette ..... ***Pseudanabaena***
3b. Tricomi generalmente solitari, con aerotopi, generalmente senza costrizioni o leggermente costrette ..... ***Limnothrix***

Chiave di identificazione dei principali generi dell'ordine NOSTOCALES

1a. Tricomi rastremati (si assottigliano alle estremità), senza eterociti..... ***Raphidiopsis***
1b. Tricomi non rastremati o rastremati, con eterociti **2**

2a. Eterociti terminali **3**
2b. Eterociti intercalari **4**

3a. Tricomi non rastremati, eterociti originati dalla divisione asimmetrica di due cellule vegetative intercalari e contigue ..... ***Anabaenopsis***
3b. Tricomi rastremati, eterociti che si formano direttamente da cellule vegetative ..... ***Cylindrospermopsis***

4a. Tricomi non rastremati **5**
4b. Tricomi rastremati ..... ***Aphanizomenon***

5a. Acineti arrotondati o ellissoidali, isolati o a coppie, formati vicino ad un eterocita, cellule con aeròtopi ..... ***Dolichospermum***
5c. Acineti ovoidi con rivestimento brunastro localizzati da entrambi i lati di eterociti intercalari, cellule con aeròtopi… ..... ***Chrysosporum***
5d. Acineti sferici su entrambi i lati degli eterociti, cellule con aeròtopi..... ***Sphaerospermopsis***

In Allegato 2 al capitolo si riportano le schede descrittive dei più comuni generi e morfospecie rinvenuti in Italia

C2.1.4. Espressione dei risultati

La nomenclatura dei cianobatteri adottata in questo capitolo segue essenzialmente l'attuale Codice Internazionale di Nomenclatura per alghe, funghi e piante (*International Code of Nomenclature,* ICN) che, dal 1º gennaio 2012, ha sostituito il Codice Internazionale di Nomenclatura Botanica (*International Code of Botanical Nomenclature*, ICBN).

Le categorie tassonomiche phylum, ordine e famiglia sono caratterizzate dalla desinenza obbligatoria –phyta (es. Cyanophyta), –ales (es. Nostocales) e –aceae (es. Nostocaceae). Tuttavia la denominazione Cyanobacteria, accettata dall'ICN come sinonimo del phylum Cyanophyta, è attualmente la più adottata.

Inoltre, il genere e l'epiteto specifico devono essere scritti in corsivo, preferibilmente accompagnati dai nomi degli autori (es. *Chrysosporum ovalisporum* (Forti) Zapomelová, Skácelová, Pumann, Kopp & Janeček).

Le denominazioni corrette e aggiornate sono *riportate* nei database CyanoDB.cz - On-line database of cyanobacterial genera (Komárek & Hauer, 2013) e AlgaeBase (Guiry & Guiry, 2013).

C2.2. Stima della densità

La stima della densità dei cianobatteri in un campione naturale si basa su identificazione e conteggio delle unità di interesse (cellule o filamenti) al microscopio. Il materiale, prelevato in genere con bottiglie di tipo Niskin, viene versato in bottiglie di vetro scuro e immediatamente fissato. In laboratorio, oltre alla valutazione dell'abbondanza numerica, si può effettuare la stima della biomassa delle diverse morfospecie mediante misurazioni delle principali dimensioni, calcolo dei volumi cellulari e trasformazione di questi in contenuto in carbonio.

A tal fine possono essere utilizzati due approcci di microscopia, quello in campo chiaro e quello in epifluorescenza. Nel primo caso i campioni, posti in camere di sedimentazione, vengono osservati in luce trasmessa con un microscopio invertito o rovesciato (invertoscopio, obiettivi al di sotto del tavolino porta-campione) seguendo il metodo di Utermöhl. Il secondo metodo, che si basa sulla possibilità di visualizzare selettivamente gli organismi d'interesse tramite l'emissione naturale di fluorescenza (autofluorescenza) da parte di pigmenti fotosintetici (clorofilla e ficobiliproteine) eccitati con luce di lunghezza d'onda opportuna, prevede la raccolta preventiva dei campioni su filtri a membrana di adeguata porosità e la successiva osservazione attraverso un microscopio ad epifluorescenza diritto (obiettivi posti al di sopra del campione) o anche invertito, dotato di filtri ottici di eccitazione con lunghezze d'onda selezionate. In entrambi i casi gli oculari dovrebbero essere equipaggiati con una griglia, le cui dimensioni devono essere calibrate per ogni ingrandimento, utilizzando un vetrino micrometrico.

C2.2.1. Metodo Utermöhl

C2.2.1.1. Fissazione dei campioni

I campioni prelevati vengono raccolti, previo mescolamento per omogeneizzare il contenuto della bottiglia e non compromettere l'attendibilità del subcampionamento, in bottiglie di vetro o altro materiale e fissati con soluzione di Lugol. La soluzione può essere aggiunta al campione in misura dello 0,5-1% o goccia a goccia fino a che l'acqua non assume una colorazione "cognac". I campioni fissati possono essere conservati a +4°C e al buio per alcuni giorni. Le bottiglie

devono essere riempite fino ad un livello poco al di sotto dell'orlo, in modo da non lasciare un eccessivo volume di aria e nello stesso tempo consentire l'agitazione e l'omogeneizzazione del subcampione prima dell'analisi microscopica (circa 20% del volume). Dopo l'aggiunta di Lugol, per la volatilità dei componenti, è necessario coprire i contenitori (bottiglia 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. Numerosi autori hanno proposto metodi diversi per valutare l'affidabilità delle stime quantitative (Viaggiu *et al.*, 2011).

C2.2.1.2. Strumentazione

Per l'analisi quantitativa del fitoplancton con il metodo Utermöhl è impiegato un microscopio invertito (rovesciato). In questo strumento la fonte luminosa (50-100 W) e il condensatore, con un'apertura numerica (*Numerical Aperture*, NA), di almeno 0,5 e un'altezza di lavoro di circa 3 cm, illuminano il materiale in osservazione dall'alto mentre il revolver con gli obiettivi è posto al di sotto del tavolino traslatore.

Organismi con parti che riflettono la luce in modo sensibilmente differente, o per diversa densità o per la presenza di pigmenti colorati, come organismi fotosintetici, possono essere visualizzati in *campo chiaro* e visti a colori. Per organismi più piccoli, o che non abbiano organelli a densità differente, è più opportuno utilizzare il *campo scuro* o il *contrasto di fase*. Nel campo scuro, un filtro opaco è interposto fra la fonte di luce e il condensatore, in modo che la luce raggiunga il preparato obliquamente e solo la luce riflessa dal campione o da particelle presenti nel campione raggiunge l'obiettivo, facendo apparire il campione chiaro in campo scuro. Nel contrasto di fase, l'immagine che si ottiene è simile al campo scuro, ma il principio di funzionamento è diverso, in quanto viene sfruttata la diversa fase con cui la luce non assorbita dal campione viene trasferita all'oculare. Per trasformare le differenze di fase (non percepibili dal nostro occhio) in contrasti visibili, il condensatore e l'obiettivo (che si riconosce per la presenza della sigla ph.x, dove x è 1, 2, 3 a seconda dell'obiettivo) devono essere equipaggiati con degli anelli di fase. Queste ultime due modalità permettono di visualizzare anche organismi trasparenti non colorati, batteri non colorati, ciglia e flagelli.

La normale dotazione dei microscopi prevede obiettivi 10× e 20×, usati per le specie di maggiori dimensioni, e 32×, 40× e 60× (o 63×) e 100× per gli organismi più piccoli.

C2.2.1.3. Sedimentazione

Si possono usare camere cilindriche in plexiglass fisse o combinate da 5, 10 e 25, 50, 100 mL. Queste ultime sono rappresentate da un cilindro di sedimentazione 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'invertoscopio 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.

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

Seguono alcune raccomandazioni tratte da manuali specifici (Buraschi *et al.*, 2007; Karlson *et al.*, 2010; Socal *et al.*, 2010):

- Le camere di sedimentazione devono essere lavate con un detergente utilizzando dei pennelli morbidi, risciacquate con acqua deionizzata e successivamente poste ad asciugare. Al momento dell'utilizzo, le camere devono essere poste su superfici perfettamente orizzontali e non soggette a vibrazioni.
- Prima di versare il campione nelle camere di sedimentazione, è indispensabile randomizzarlo, capovolgendo la bottiglia almeno 50 volte.
- Il campione va versato nelle camere di sedimentazione lentamente, evitando la formazione di bolle. La camera deve essere chiusa con un coprioggetto, evitando il più possibile la formazione di ulteriori bolle.

Il conteggio deve avvenire quando la sedimentazione di tutti gli organismi sia da ritenersi completata. Vengono comunemente ritenuti sufficienti tempi pari a 1-3 ore per ogni centimetro di altezza del cilindro.

C2.2.2. Metodo in epifluorescenza su filtri a membrana

C2.2.2.1. Fissazione dei campioni

Per l'osservazione in fluorescenza il campione non può essere fissato con soluzione Lugol, ma si deve usare una soluzione tamponata di formaldeide per arrivare ad una concentrazione finale fra il 2-4% (v/v). Il campione dovrebbe essere fissato immediatamente dopo la sua raccolta, e poi tenuto al buio a 4°C fino all'arrivo in laboratorio (prima possibile). In alternativa, se il rientro in laboratorio è previsto entro due ore dal campionamento, si può procedere alla fissazione una volta rientrati. Il trasporto del campione deve avvenire sempre al buio e a 4°C.

Se il campione non può essere analizzato immediatamente, una volta fissato può essere conservato al buio a 4°C.

C2.2.2.2. Microscopia a fluorescenza

La microscopia a fluorescenza sfrutta le proprietà di alcune molecole di emettere luce in particolari lunghezze d'onda in seguito all'eccitazione con lunghezze d'onda inferiori. Il microscopio deve essere attrezzato specificamente per usare la fluorescenza, con adeguati obiettivi, una sorgente di luce sufficiente ad eccitare i fluorocromi (molecole fluorescenti), generalmente una lampada al mercurio o allo xeno, anche se ora cominciano ad essere disponibili sistemi con led di vari colori, un set di filtri di eccitazione ed emissione per far passare solo le lunghezze d'onda adeguate, sia in eccitazione che in emissione.

L'osservazione di campioni biologici viene fatta più precisamente in epifluorescenza, cioè con una sorgente di luce incidente che colpisce il campione dallo stesso lato da cui viene riflessa. Nel microscopio diritto la luce arriva dall'obiettivo, che ha anche la funzione di condensatore, posto al di sopra del campione. Filtri dicroici permettono il passaggio della luce di una lunghezza d'onda in eccitazione e il passaggio della luce della nuova lunghezza d'onda in emissione, proveniente dal campione.

Negli organismi fotosintetici i pigmenti fotosintetici (clorofille e ficobiliproteine) sono fluorescenti e permettono di visualizzare gli organismi in autofluorescenza (Figura C2.1), senza bisogno di colorarli con specifici fluorocromi. Inoltre, organismi fotosintetici che differiscano nella composizione relativa di fotopigmenti e di conseguenza nello spettro di emissione, possono essere separati utilizzando diversi set di filtri. Nei cianobatteri la dispersione dei pigmenti nelle cellule (assenza organelli, plastidi) ne rende possibile la visualizzazione in toto, da cui la possibilità di valutare la morfometria e i biovolumi anche su immagini in epifluorescenza.

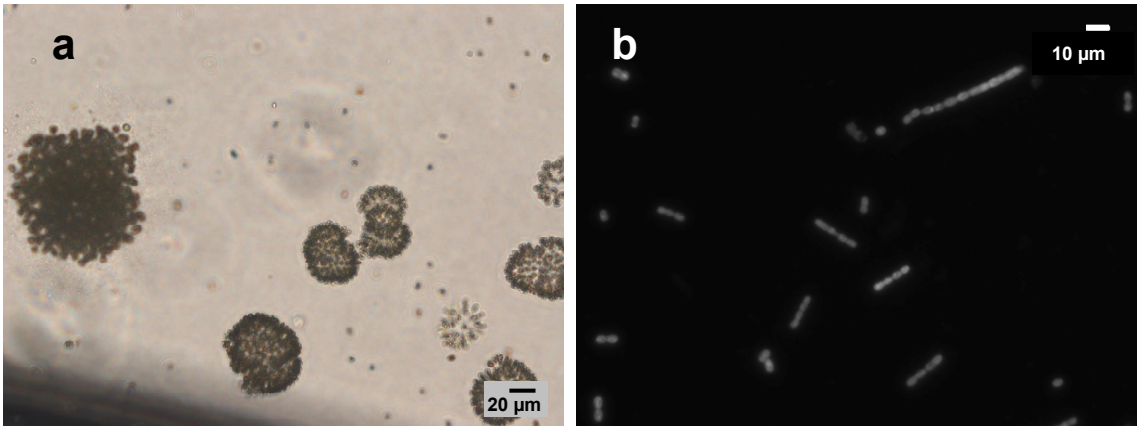


Figura C2.1. Esempi di visualizzazione: (a) in *campo chiaro* in sedimentazione, *Woronichinia naegeliana* e *Microcystis botrys*, ingrandimento 20x; (b) in autofluorescenza su filtro, *Anabaena flos-quae PCC 9302 axenica*, ingrandimento 40x (foto M. Stefanelli)

Per l'epifluorescenza viene generalmente utilizzato un microscopio diritto con diversi set di filtri per la fluorescenza e obiettivi 10×, 40× e possibilmente 100× a immersione, con elevata apertura numerica, per la conta degli unicellulari. Può essere molto utile una griglia di conta nell'oculare.

I set di filtri di eccitazione ed emissione utilizzati sono:

- eccitazione luce blu-emissione nel verde e oltre (BP450-490/FT510/LP520; filtro usato per la FITC, *Fluorescein isothiocyanate*): eccita la clorofilla-a (che appare rossa) e la ficoeritrina di tipo I (che appare giallo-arancio); non è sempre possibile discriminare in una comunità mista pro- da eucarioti fotosintetici;
- eccitazione luce verde-emissione nel giallo e oltre (BP520-560/FT580/LP590; filtro usato per la TRITC, *Tetramethylrhodamine*) eccita sia la ficocianina che la ficoeritrina di tipo II che emettono fluorescenza rispettivamente nel rosso e nell'arancio-rosso

Il passaggio rapido dal primo set di filtri al secondo aiuta a discriminare i cianobatteri e per la corretta stima della loro abbondanza (anche picoplanctonici) in ambiente acquatico.

C2.2.2.3. Filtrazione

La filtrazione su filtri a membrana in policarbonato, con una differente porosità a seconda delle dimensioni della specie da contare fra 0,2 e 5 µm, è un utile metodo per la concentrazione delle cellule. È più rapido del metodo di sedimentazione ed è sicuramente migliore per visualizzare e contare cianobatteri unicellulari.

Il sistema di filtrazione consiste di una beuta (per filtrazioni singole) o rampa (per filtrazioni multiple) da vuoto (Figura C2.2) collegata ad una pompa da vuoto, su cui è posizionato un portafiltri, inserito in un tappo di gomma. Sul filtro appoggiato sulla base viene bloccato un imbuto di vetro graduato con una pinza. Il campione viene versato nell'imbuto e immediatamente dopo viene applicato un vuoto molto gentile (50-70 mmHg ≡ 2-2,9 in.Hg), per evitare di rompere le cellule durante la filtrazione. Per avere una distribuzione uniforme delle cellule sul filtro è bene filtrare un volume di almeno 2 mL (eventualmente in casi di densità elevate si può diluire il campione prima di filtrare, anche direttamente nell'imbuto, aggiungendo ~2 mL di acqua sterile prima del campione).

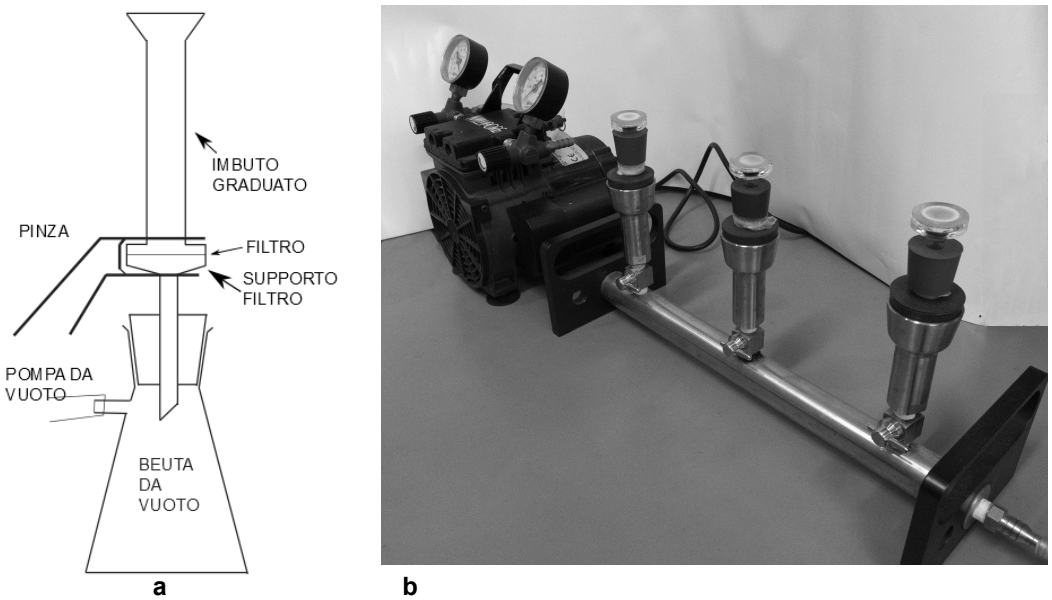


Figura C2.2. Apparato filtrante da vuoto: il portafiltro può essere utilizzato con una beuta da vuoto (a) o con rampe da vuoto (b); entrambe saranno collegate ad una pompa

Una volta terminata la filtrazione, con il vuoto ancora applicato togliere l'imbuto, prendere il filtro con le pinzette e appoggiarlo gentilmente su una carta assorbente per asciugarlo, facendo attenzione a non appoggiarlo sul lato delle cellule. Una volta asciugato il filtro viene appoggiato su una goccia di olio per immersione su un vetrino (preventivamente pulito con alcol) ed è coperto con un coprioggetto, sul quale è stata versata una goccia d'olio.

Il materiale necessario consiste in:

- filtri in policarbonato di porosità variabile (0,2-1 µm per organismi unicellulari, fino a 5 µm per cianobatteri filamentosi), diametro 25 mm;
- apparato di filtrazione (*vedi* Figura C2.2):
  - beuta da vuoto (campioni singoli)/rampa (filtrazione multipla)
  - base con supporto per filtro in vetro sinterizzato
  - imbuto in vetro graduato
  - pinza
  - pompa da vuoto, manuale o elettrica;
- vetrini portafiltro;
- vetrini coprioggetto;
- olio per microscopia;
- pinzette.

C2.2.3. Conteggio

Il conteggio viene effettuato con obiettivi 10×, 20×, 40×; per l'identificazione può essere necessario l'ausilio di obiettivi a risoluzione maggiore. 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 eseguendo una conta per transetti o per campi casuali. In entrambi i casi è necessario calcolare l'area della camera di sedimentazione, l'area del campo visivo e il numero dei campi analizzati. Si ricorda che l'area di un campo varia a seconda dell'ingrandimento utilizzato e può essere calcolata con l'uso di un oculare micrometrico.

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 peraltro può sottostimare il campione presente ai margini della camera di sedimentazione (Zingone *et al.*, 2010).

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. Tale metodo tiene conto della distribuzione del campione sia al centro che ai margini della camera.

La conta degli organismi 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. (Chorus *et al.*, 1999). In autofluorescenza, l'unità di conta può essere rappresentata da singole cellule (in questo caso si usano ingrandimenti maggiori, 40× o 100×) o singoli filamenti o colonie (sono sufficienti ingrandimenti a 10× e 20×). Se sono stati contati i singoli filamenti o colonie, è necessario determinare il numero medio di cellule per filamento/colonia su almeno i primi 30 filamenti/colonie che si incontrano osservando il campione, generalmente con un ingrandimento maggiore di quello utilizzato per il conteggio. Se le colonie hanno una forma regolare e si dispone di una macchina fotografica e un software per misurare le immagini fotografate (è disponibile gratuitamente un software di analisi di immagini *ImageJ* dei *National Institutes of Health* statunitensi (http://imagej.nih.gov/ij/), si può determinare l'area media delle colonie (sempre considerando almeno le prime 30 che si incontrano casualmente osservando il vetrino) e quindi il numero medio di cellule in base alle dimensioni medie delle cellule.

Se invece ci si trova in presenza di colonie filamentose o di grandi colonie unicellulari con una forma irregolare è necessario pretrattare il campione per rompere le colonie. Le colonie di *Microcystis* spp. possono essere disperse bollendo il campione per 6 minuti (Joung *et al.*, 2006); oppure, più genericamente, il campione può essere mischiato energicamente dopo aver effettuato una idrolisi alcalina (80-90°C per 15 minuti), oppure si può utilizzare una sonicazione gentile (Lawton *et al.*, 1999). Anche se questi metodi non raggiungono una rottura completa delle colonie, possono comunque ridurne la dimensione e renderle conteggiabili.

Generalmente viene contato un numero di campi casuali tale da contare fra le 300 e le 400 cellule (circa 20 campi con una densità media di 15-20 cellule), muovendosi sul vetrino seguendo una traiettoria sinusoidale, per esplorare la maggior superficie possibile dell'area di filtrazione.

Il calcolo del numero medio di cellule presenti (N) per mL viene effettuato in tutti i casi applicando la seguente formula e riportando il numero a 1000 mL di campione:

$$N/mL = N_i \times A/a \times 1/N_c \times 1/V$$

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 visivo in mm^2

N_c numero di campi contati
V volume del campione sedimentato in mL

Altri metodi di conteggio e l'impiego di camere di conta adeguate alla determinazione quantitativa degli organismi algali sono riportati in Socal *et al.*, 2010. Un metodo semiautomatico per valutare *Planktothrix* è riportato in Viaggiu *et al.*, 2011 e Zeder *et al.*, 2010.

C2.2.4. Espressione dei risultati

La densità può essere espressa in cell/L, cell/mL, 10^3 cell/L.

C2.3. Calcolo del biovolume/biomassa

C2.3.1. Importanza della stima biovolumetrica

L'identificazione dei taxa (diversità) e la stima della densità cellulare (abbondanza) sono essenzialmente parametri tassonomici. Nell'ambito di un monitoraggio è peraltro opportuno integrare questi dati con il calcolo del biovolume che rappresenta un descrittore morfometrico e permette di evidenziare eventuali sopravvalutazioni degli organismi di minori dimensioni.

In molti casi, infatti, densità e biovolume non corrispondono, potendo essere presenti cellule piccole con alte densità 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, la latitudine o il 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.

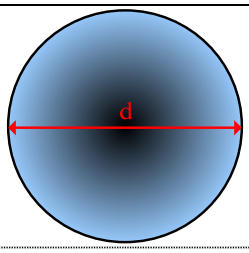
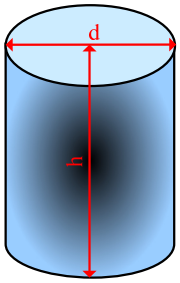
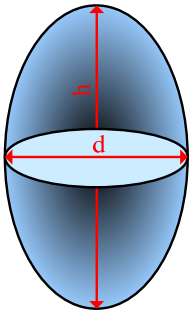
Inoltre, la potenziale concentrazione di tossine è relativa alla biomassa dei Cianobatteri. Successivamente al calcolo del biovolume si può operare una conversione in biomassa (biomassa derivata) o contenuto in C mediante fattori di conversione.

Il biovolume algale viene calcolato assimilando le alghe a forme geometriche semplici (Hillebrand *et al.*, 1999; Olenina *et al.*, 2006; Vadrucci *et al.*, 2007). Il biovolume totale di ogni specie (μm^3/L) si ottiene moltiplicando il biovolume medio per la rispettiva densità cellulare (cell/L).

C2.3.2. Forme geometriche di riferimento

Le forme geometriche di riferimento per i Cianobatteri sono essenzialmente sfera, cilindro ed ellissoide di rotazione (Tabella C2.3). Per la determinazione microscopica delle dimensioni lineari è opportuno l'uso di un sistema computerizzato di analisi delle immagini. La maggior parte dei software è fornita di calcolo diretto del biovolume, almeno per quanto riguarda i solidi di rotazione. Nel rilevamento delle misure necessarie al calcolo è opportuno misurare almeno 25 unità.

Tabella C2.3. Formule per il calcolo del volume cellulare

Forma	Grandezza fisica	Formula per il calcolo del volume
Sfera		$V=\pi/6\ d^3$
Cilindro		$V=\pi/4\ d^2\ h$
Ellissoide di rotazione		$V=\pi/6\ d^2\ h$

C2.3.3. Espressione dei risultati

Assumendo che la densità dei fitoplanctonti corrisponda a 1 g/cm^3 come l'acqua, perché il fitoplancton "galleggia", si può passare dall'espressione biovolume in mm^3/L all'espressione biomassa in mg/L.

Bibliografia

Bonilla S (Ed.). *Cianobacterias Planctónicas del Uruguay. Manual para la identificación y medidas de gestión*. Montevideo: UNESCO, Programa Hidrológico Internacional; 2009. (Documento Técnico PHI-LAC, N° 16).

Buraschi E, Buzzi F, Garibaldi L, Lugliè A, Legnani E, Morabito G, Oggioni A, Pozzi S, Salmaso N, Tartari G. Protocollo per il campionamento di fitoplancton in ambiente lacustre. In: *Metodi biologici per le acque. Parte I*. Roma: Agenzia per la protezione dell'ambiente e per i servizi tecnici; 2007. (APAT, Manuali e linee guida XX/2007).

Chorus I, Bartram J (Ed.). *Toxic cyanobacteria in water: a guide to their public health consequences, monitoring and management*. London, New York: E&FN Spon; 1999. (Published on behalf of WHO).

Guiry MD, Guiry GM. *AlgaeBase* [Internet]. Galway: National University of Ireland; 1996-2015. Disponibile all'indirizzo:www.algaebase.org; ultima consultazione 17/12/2014.

Hillebrand H, Dürselen CD, Kirschtel U, Pollingher T, Zohary T. Biovolume calculation for pelagic and benthic microalgae. *J Phycol* 1999;35:403-24.

Hoffmann L, Komárek J, Kastovsky J. System of cyanoprokaryotes (cyanobacteria) state in 2004. *Algol Stud* 2005;117:95-115.

Joung SH, Kim CJ, Ahn CY, Jang KY, Boo SM, Oh HM. Simple method for a cell count of the colonial cyanobacterium, *Microcystis* sp. *J Microbiol* 2006;44(5):562-5.

Lawton L, Marsalek B, Padisák J, Chorus I. 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*. London, New York: E&FN Spon; 1999. (Published on behalf of WHO). Chapter 12.

Karlson B, Cusack C, Bresnan E (Ed.). *Microscopic and molecular methods for quantitative phytoplankton analysis*. Paris, France. IOC-UNESCO; 2010.

Komárek J. Nomenclatural changes in heterocytous Cyanoprokaryotes (Cyanobacteria, Cyanophytes). *Fottea* 2012;12:141-8.

Komárek J. *Süsswasserflora von Mitteleuropa: Bd. 19/3. Cyanoprokaryota 3. Teil. Heterocytous Genera.* Heidelberg: Springer Spektrum; 2013.

Komárek J, Anagnostídis K. *Süsswasserflora von Mitteleuropa: Bd. 19/1 Cyanoprokaryota 1. Teil: Chroococcales.* Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag; 1998.

Komárek J, Anagnostidis K. *Süsswasserflora von Mitteleuropa: Bd. 19/2. Cyanoprokaryota 2. Teil: Oscillatoriales*. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag; 2005.

Komárek J, Hauer T. *CyanoDB.cz - On-line database of cyanobacterial genera* [Internet]. České Budějovice, Třeboň (Czech Republic): University of South Bohemia & Institution of Botany; ultimo aggiornamento 2014. Disponibile all'indirizzo: www.cyanodb.cz; ultima consultazione 17/12/2014.

Komárek J, Mareš J. An update to modern taxonomy (2011) of freshwater planktic heterocytous cyanobacteria. *Hydrobiologia* 2012;698:327-51.

Olenina I, Hajdu S, Edler L, Andersson A, Wasmund N, Busch S, Göbel J, Gromisz S, Huseby S, Huttunen M, Jaanus A, Kokkonen P, Ledaine I, Niemkiewicz E. *Biovolumes and size-classes of phytoplankton in the Baltic Sea.* Helsinki: Baltic Marine Environment Protection Commssion – Helsinki Commission; 2006. (Balt Sea Environ Proc N°. 106).

Quiblier C, Wood S, Echenique-Subiabre I, Heath M, Villeneuve A, Humbert JF. A review of current knowledge on toxic benthic freshwater cyanobacteria–Ecology, toxin production and risk management. *Wat Res* 2013;47:5464-79.

Rajaniemi P, Komárek J, Willame R, Hrouzek P, Kaštovská K, Hoffmann L, Sivonen K. Taxonomic consequences from the combined molecular and phenotype evaluation of selected *Anabaena* and *Aphanizomenon* strains. *Algological Studies/Arch Hydrobiol*, 2005;117:371-91.

Socal G, Buttino I, Cabrini M, Mangoni O, Penna A, Totti C (Ed.). *Metodologie di studio del plancton marino*. Roma: Istituto Superiore per la Protezione e la Ricerca Ambientale; 2010 (ISPRA, Manuali e linee guida 56/2010)

Vadrucci MR, Cabrini M, Basset A. Biovolume determination of phytoplankton guilds in transitional water ecosystems of Mediterranean Ecoregion Transit. *Waters Bull* 2007;2:83-102.

Viaggiu E, Congestri R, Della Libera S, Morabito G. Appendice B. Metodi di determinazione delle alghe. In: Lucentini L, Ottaviani M (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). p.162-76.

Wacklin P, Hoffmann L, Komárek J. Nomenclatural validation of the genetically revised cyanobacterial genus *Dolichospermum* (Ralfs ex Bornet et Flahault) comb. nova. *Fottea* 2009;9:59-64.

Zapomelová E, Jezberová J, Hrouzek P, Hisem D, Reháková K, Komárková J. Polyphasic characterization of three strains of *Anabaena reniformis* and *Aphanizomenon aphanizomenoides* (cyanobacteria) and their reclassification to *Sphaerospermum* gen. nov. (incl. *Anabaena kisseleviana*). *J Phycol* 2010;45:1363-73.

Zapomelová E, Skácelová O, Pumann P, Kopp R, Janeček E. Biogeographically interesting planktonic Nostocales (Cyanobacteria) in the Czech Republic and their polyphasic evaluation resulting in taxonomic revisions of *Anabaena bergii* Ostenfeld 1908 (*Chrysosporum* gen. nov.) and *A. tenericaulis* Nygaard 1949 (*Dolichospermum tenericaule* comb. nova). *Hydrobiol* 2012;698:353-65.

Zeder M, Van den Wyngaert S, Oliver Köster O, Felder KM, Pernthaler J. Automated quantification and sizing of unbranched filamentous cyanobacteria by model-based object-oriented image analysis. *Appl Environ Microbiol* 2010;76:1615-22.

Zingone A, Totti C, Sarno D, Cabrini M, Caroppo C, Giacobbe MG, Lugliè A, Nuccio C, Socal G. 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*. Roma: Istituto Superiore per la Protezione e la Ricerca Ambientale; 2010. (ISPRA Manuali e linee guida 56/2010). p. 213-37.

Allegato 1 al capitolo C2

Schede descrittive dei nuovi generi di cianobatteri

Chrysosporum Zapomělová _et al._ 2012

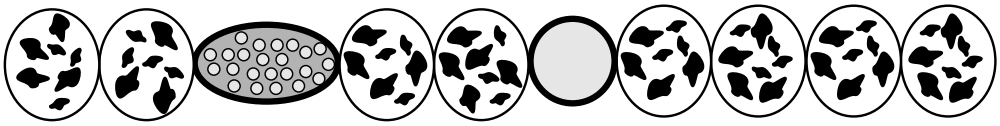
Tricomi di lunghezza variabile, solitari, diritti, si assottigliano alle estremità, più o meno ristretti fra le cellule. Cellule vegetative a barile più lunghe che larghe, con aeròtopi. Cellule terminali coniche. Eterociti intercalari, solitari, sferici o leggermente allungati. Acineti ovali, con parete cellulare brunastra o giallo-marrone distanti dagli eterociti. Tricomi planctonici in acqua dolce stagnante, laghi alofili, serbatoi ad elevata conducibilità ed estuari di grandi fiumi.
Il principale carattere diagnostico morfologico è la presenza di acineti con parete cellulare brunastra.

Cuspidothrix Rajaniemi _et al._ 2005

Tricomi solitari planctonici, relativamente sottili che, tipicamente, si assottigliano e manifestano estremità appuntite. Cellule vegetative cilindriche con aeròtopi. Presenza di eterociti cilindrici intercalari, acineti cilindrici intercalari, solitari o in paia, distanti o prossimi agli eterociti.
Il principale carattere diagnostico morfologico è la presenza di estremità notevolmente appuntite.

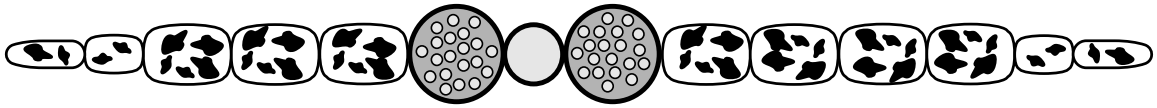
Scheda 3. _Dolichospermum_ (Ralfs ex Bornet et Flahault) Wacklin _et al._ 2009

Tricomi comunemente solitari, planctonici, diritti o variamente spiralati, più o meno cilindrici, con eterociti intercalari. Cellule vegetative da subsferiche a cilindriche, con aeròtopi, cellula terminale generalmente simile alle cellule vegetative. Eterociti sferiche, subsferiche, a forma di barile, intercalari, singole o occasionalmente in paia. Acineti generalmente ovali, comunemente connessi con gli eterociti, solitari o occasionalmente in file di 5. Tradizionalmente *Dolichospermum* era parte del genere *Anabaena*. I risultati delle analisi molecolari separano distintamente i morfotipi ed ecotipi planctonici con aeròtopi dalle specie prive di vescicole gassose che vivono in mat o biofilm.
Il principale carattere diagnostico morfologico è la presenza di aeròtopi che lo contraddistingue dal genere *Anabaena.*



Scheda 4. _Sphaerospermopsis_ Zapomělová _et al._ 2010

Tricomi con aeròtopi, solitari, diritti o spiralati. Il genere è caratterizzato da acineti quasi sferici localizzati da entrambi i lati di eterociti sferici o ovali, intercalari e solitari. Cellule vegetative a forma di barile o cilindriche, con aeròtopi. Le cellule terminali sono spesso leggermente rastremate o morfologicamente modificate. Alcune specie planctoniche tradizionalmente classificate nei generi *Anabaena* e *Aphanizomenon* sono state ascritte a questo genere.
Il principale carattere diagnostico morfologico è la posizione degli acineti sferici su entrambi i lati degli eterociti.



Allegato 2 al capitolo C2

Schede descrittive dei più comuni generi e morfospecie di cianobatteri rinvenuti in Italia

Anabaenopsis (Nostocales)

Tricomi solitari, generalmente arrotolati o curvati a formare anelli o corte spirali. Presenza di eterociti e acineti. Cellule vegetative cilindriche o a forma di barile, con aeròtopi. Eterociti che si sviluppano dalla divisione asimmetrica di due cellule contigue. Le due cellule contigue più piccole si trasformano in eterociti sferici o ovoidi che alla rottura del tricoma appaiono terminali. Acineti sferici o ovoidi, solitari o in corte file, intercalari e distanziati dagli eterociti.

Anabaenopsis elenkinii Miller
Tricomi solitari, spiralati irregolarmente. Cellule vegetative ellissoidali con aeròtopi, più lunghe che larghe, 4-9 (lunghezza) × 4-6 µm (larghezza). Eterociti sferici (3-7 µm) spesso in posizione terminale. Acineti da sferici a ellissoidali, solitari, raramente in paia, 8-12 × 9-15 µm.

Aphanizomenon (Nostocales)

Tricomi diritti e generalmente solitari, in alcune specie formano peculiari aggregati denominati fascicoli. Generalmente tricomi rastremati con cellule terminali di forma variabile, spesso ialine. Le cellule vegetative sono comunemente ellissoidali o a forma di barile. Gli eterociti sono in posizione intercalare e possono essere subsferici, ellissoidali o ovali. La forma (subsferici, ellissoidali, cilindrici) e la posizione degli acineti sono fondamentali per determinare le morfospecie.

Aphanizomenon flos-aquae Ralfs ex Bornet & Flahault
Tricomi solitari, diritti, generalmente aggregati in “fasci”. Cellule vegetative cilindriche, con aeròtopi, più lunghe che larghe, 5-14 × 4-7 µm. Eterociti intercalari, da cilindriche a ellissoidali, 10-14 × 5-6 µm. Acineti cilindrici molto lunghi distanti dagli eterociti, 40-80 × 6-10 µm. Cellula terminale ialina, molto allungata con larghezza simile a quella delle cellule vegetative, bordi arrotondati.

Chrysosporum (Nostocales)

Tricomi di lunghezza variabile, solitari, fluttuanti, diritti, più o meno ristretti alle pareti cellulari. Cellule terminali coniche. Cellule vegetative con aeròtopi, cilindriche, compresse durante la divisione. Eterociti intercalari, solitari, sferici o leggermente allungati. Acineti ovoidi (rapporto lunghezza/Larghezza 1.2-2.5), con parete cellulare brunastra o giallo-marrone, eterociti distanti. Planctonica in acqua dolce stagnante, laghi alofili, serbatoi ad elevata conducibilità ed estuari di grandi fiumi.

Chrysosporum ovalisporum (Forti) Zapomelová, Skácelová, Pumann, Kopp & Janeček
Tricomi diritti o leggermente curvi, rastremati, costrizioni fra cellule. Cellule vegetative generalmente a forma di barile, più lunghe che larghe, 4-12 × 3-6 µm. Cellula terminale allungata, parzialmente ialina a bordo arrotondato. Eterociti da subsferici a ovali, 3-12 × 4-8 µm. Acineti generalmente ovali, distanti dagli eterociti, 7-20 × 5-14 µm.

Cylindrospermopsis (Nostocales)

Tricomi solitari, diritti o leggermente curvi, rastremati alle estremità, senza guaina. Cellule vegetative cilindriche di colore verde chiaro e aspetto granuloso per la presenza di aeròtopi. Cellule apicali coniche, acuminate. Eterociti terminali, arrotondati o conici (acuminati), di colore verde chiaro omogeneo, sempre apicali e solitari. Acineti ovali, di aspetto granuloso, solitari o in paia, intercalari e comunemente separati dagli eterociti da alcune cellule.
Tipo di bloom: dispersivo, non evidente.

Cylindrospermopsis raciborskii (Woloszynska) Seenayya & Subba Raju
Tricomi solitari o leggermente curvi, lievi costrizioni fra cellule. Cellule vegetative cilindriche con aeròtopi, 2-16 × 2-4 µm. Eterociti generalmente conici in posizione terminale, 4-6 × 2-3 µm. Acineti allungati o ovali, generalmente contigui agli eterociti o alle cellule vegetative terminali quando non sono presenti eterociti, 8-15 × 2-4 µm. In assenza di eterociti le cellule terminali sono allungate.

Dolichospermum (Nostocales)

Tricomi planctonici, solitari, diritti o variamente spiralati (meno frequentemente in colonie), più o meno cilindrici, comunemente privi di guaina, con eterociti e acineti. Cellule vegetative da subsferiche a cilindriche, con aeròtopi, cellula terminale generalmente simile alle cellule vegetative. Eterociti intercalari o eccezionalmente in paia. Acineti più o meno allungati, solitari o fino a 5 in fila. Tradizionalmente parte del genere *Anabaena*. I risultati delle analisi molecolari hanno separato distintamente i morfotipi ed ecotipi planctonici con aeròtopi (*Dolichospermum*), dalle specie che vivono in mat o biofilm e sono prive di vescicole gassose (*Anabaena*).
Il principale carattere diagnostico morfologico è la presenza di aeròtopi che lo contraddistingue dal genere *Anabaena.*

Dolichospermum circinale (Rabenhorst ex Bornet & Flahault) Wacklin, Hoffmann & Komárek
Tricomi spiralati con anelli da 60 a 120 µm di lunghezza. Cellule vegetative da forme di barile a sferiche, con aeròtopi, 7-9 × 8-11 µm. Eterociti sferici di larghezza simile alle cellule vegetative. Acineti da ovali a subcilindrici, occasionalmente con estremi conici, distanti dagli eterociti, 20-28 × 15-21 µm.

Dolichospermum flosaquae (Brébisson ex Bornet & Flahault) Wacklin, Hoffmann & Komárek
Tricomi spiralati irregolarmente che spesso formano aggregati sferici visibili ad occhio nudo. Cellule vegetative sferiche, con aeròtopi, 3-7 µm. Eterociti ovali, 10-14 × 5-6 µm. Acineti da ovali a cilindrici, frequentemente reniformi, comunemente in file di 2-3, distanti dagli eterociti, 15-35 × 7-14 µm.

Dolichospermum crassum (Lemmermann) Wacklin, Hoffmann & Komárek
Tricomi spiralati regolarmente, mucillagine 20 µm di larghezza. Cellule vegetative a forma di barile o sferiche, con aeròtopi, leggermente più corte che larghe (9-15 µm). Eterociti sferici, 10-17 µm. Acineti ellissoidali allargati, distanti dagli eterociti, occasionalmente in paia, 15-42 × 13-25 µm.

Dolichospermum lemmermannii (Ricter) Wacklin, Hoffmann & Komárek
Tricomi irregolarmente spiralati, solitari o aggregati. Cellule vegetative a forma di barile o sferiche, con aeròtopi, 3-8 × 3-7 µm. Eterociti sferici o ovali, 4-6 × 4-6. Acineti allungati, leggermente curvi, con estremità arrotondate, disposti da entrambi i lati di un eterocita, 11-22 × 6-9 µm.

Dolichospermum planctonicum (Brunnth) Wacklin, Hoffmann & Komárek
Tricomi diritti larghi 8–15 µm. Cellule vegetative a forma di corto barile lunghe da 10 µm. Forma delle cellule terminali sferica, arrotondata. Forma degli eterociti arrotondata, quasi sferica, raramente leggermente ovale. Acineti ovali a quasi cilindrici con estremità arrotondate, dimensioni 15–37 × 9–21 µm, distanti dagli eterociti, solitari, meno frequentemente in paia.

Dolichospermum spiroides (Klebahn) Wacklin, Hoffmann & Komárek
Tricomi spiralati con leggere irregolarità. Cellule vegetative sferiche 6-9 µm. Acineti comunemente ovali con dimensioni 15–20 × 9–14 µm.

Limnothrix (Pseudanabaenales)

Tricomi solitari generalmente diritti, cilindrici, senza eterociti e acineti, senza costrizioni nelle pareti trasversali, generalmente senza guaina. Cellule generalmente cilindriche, con aeròtopi localizzati centralmente o apicalmente. Tricomi larghi 1-6 µm.

Limnothrix redekei (van Goor) Meffert
Tricomi solitari o in piccoli gruppi, diritti o leggermente curvi, senza mucillagine, non rastremati. Cellule vegetative cilindriche con aeròtopi disposti vicino ai setti, generalmente senza costrizioni nelle pareti trasversali. Cellula apicale cilindrica con apice arrotondato. Tricomi larghi 1-2 µm, cellule lunghe 6-16 µm.
Tipo di bloom: dispersivo, non evidente.

Microcystis (Chroococcales)

Colonie micro- e macroscopiche, sferiche, ovali, lobate, irregolari o allungate. Mucillagine incolore, diffluente o distinta. Cellule sferiche, allungate durante la divisione, con aeròtopi. Riproduzione per frammentazione delle colonie in piccoli cluster o in cellule solitarie.

Microcystis aeruginosa (Kützing) Kützing
Colonie microscopiche, lobate, globose, irregolari, generalmente clatrate, con dimensioni da 40 a 1000 µm, raramente 8 mm. Mucillagine diffusa e trasparente che oltrepassa ampiamente il limite delle cellule (5-8 µm). Cellule sferiche e scure per la grande densità di aeròtopi, concentrate nel centro delle colonie, 4-6 µm di diametro. La densità e la forma della colonia possono variare secondo lo stadio vitale. Questa specie si confonde con altre morfospecie del genere, ma anche con altri generi (*Radiocystis* e *Sphaerocavum*) per la sua notevole variabilità morfologica. Alcuni autori si riferiscono a morfotipi non identificati come appartenenti al "complesso *M. aeruginosa*".
Tipo di bloom: accumulativo in superficie. Le colonie possono ammassarsi nella zona litorale e apparire come evidenti granuli di colore verde brillante di vari mm di diametro.

Microcystis flosaquae (Wittrock) Kirchner
Colonie più comunemente microscopiche compatte, più o meno sferiche o irregolari al contorno, non lobate, con cellule densamente aggregate, con fori indistinti nelle colonie più mature. La mucillagine non eccede o quasi (1 µm) il margine del cluster cellulare, diffluente, incolore, ialina. Cellule sferiche, con aeròtopi, 4-5 µm di diametro.

Microcystis wesenbergii (Komárek) Komárek
Colonie sferiche quando giovani, successivamente allungate e lobate, talvolta composte di subcolonie, lunghe fino a 6 mm. Cellule distribuite casualmente. Mucillagine incolore con contorno distinto, non diffluente, rifrattivo. La mucillagine eccede oltre 3-6 µm. Cellule sferiche, con aeròtopi, 4-7 µm di diametro.

Planktolyngbya (Pseudanabaenales)

Filamenti (tricomi+guaina mucillaginosa) planctonici, solitari, diritti, flessuosi, ondulati, spiralati con una sottile ed evidente guaina incolore. Cellule cilindriche, larghe fino a 3 µm, generalmente più lunghe che larghe, comunemente senza aeròtopi ma se presenti solitari polari.

Planktothrix (Oscillatoriales)

Tricomi solitari, più o meno diritti, generalmente planctonici, con aeròtopi. Guaine generalmente mancanti. Cellule cilindriche, frequentemente isodiametriche o più larghe che lunghe, con numerosi aeròtopi distribuiti in tutta la cellula, cellule apicali generalmente convesse.
Tipo di bloom: accumulativo nel metalimnio o dispersivo nel corpo idrico. Peraltro, i tricomi possono ammassarsi nella zona litorale e apparire come evidenti masse.

Planktothrix agardhii (Gomont) Anagnostidis & Komárek
Tricomi di colore blu-verde, più comunemente diritti, lunghi fino a 300 µm e larghi 4-6 µm, senza guaina. Cellule più larghe che lunghe o frequentemente isodiametriche, con numerosi aeròtopi, cellule apicali generalmente convesse.

Planktothrix rubescens (De Candolle ex Gomont) Anagnostidis & Komárek
Tricomi rossastri o rosati, più comunemente diritti, larghi 6-8 µm, senza guaina. Cellule più larghe che lunghe o frequentemente isodiametriche, con numerosi aeròtopi, cellule apicali generalmente convesse.

Pseudanabaena (Pseudanabaenales)

Tricomi solitari nel plancton o in sottili mat, generalmente diritti o arcuati, cilindrici. Cellule generalmente cilindriche con estremità arrotondate, con evidenti costrizioni nelle pareti trasversali, più comunemente senza aeròtopi, se presenti polari. Tricomi larghi 0,5-2,5 µm.

Raphidiopsis (Nostocales)

Tricomi solitari più comunemente diritti o curvati, generalmente rastremati alle estremità, senza guaina. Cellule vegetative cilindriche con aeròtopi. Cellule apicali coniche, frequentemente acuminate. Eterociti sconosciuti. Acineti solitari o in corte file nella parte centrale del tricoma. È in discussione se sia un genere delimitato o una fase del ciclo di *Cylindrospermopsis*.

Sphaerospermopsis (Nostocales)

Tricomi solitari, diritti o spiralati, con aeròtopi. Il genere è caratterizzato da acineti quasi sferici localizzati da entrambi i lati di eterociti sferici o ovali, intercalari e solitari. Cellule vegetative a forma di barile o cilindriche. Le cellule terminali sono spesso leggermente rastremate o morfologicamente modificate. Alcune specie planctoniche tradizionalmente classificate nei generi *Anabaena* e *Aphanizomenon* sono state ascritte a questo genere.
Il principale carattere diagnostico morfologico è la posizione degli acineti sferici su entrambi i lati degli eterociti.

Sphaerospermopsis aphanizomenoides (Forti) Zapomelová, Jezberová, Hrouzek, Hisem, Reháková & Komárková
Tricomi solitari, diritti o leggermente curvi. Cellule vegetative a forma di barile o cilindriche, con aeròtopi, più lunghe che larghe, 3-6 × 3-5 µm. Eterociti da sferici a ovali 4-8 × 4-7 µm. Acineti sferici o subsferici, contigui agli eterociti, 8-12 × 8-14 µm. Cellula terminale arrotondata, aspetto simile a quello delle cellule vegetative occasionalmente più ristretta.

Woronichinia (Chroococcales)

Colonie più o meno sferiche, ovali irregolari, comunemente composte di subcolonie, generalmente avvolte da uno stretto stato di mucillagine. Al centro della colonia si manifesta un sistema di spessi steli orientati radialmente. Cellule generalmente ovali. Riproduzione per frammentazione delle colonie ma, soprattutto, per liberazione di cellule solitarie.

Woronichinia naegeliana (Unger) Elenkin
Colonie microscopiche, sferiche o ellissoidali fino a 180 µm di diametro, con cellule aggregate più densamente alla periferia della colonia. Talvolta composte da subcolonie. Riproduzione generalmente mediante liberazione, talvolta espulsiva, di cellule solitarie dalle colonie, facili da osservare alla loro periferia. Cellule obovoidi (con la parte più stretta verso la base) o ellissoidali, con aeròtopi, dimensioni 5-7 × 2-4 µm.

C3. METODI CHIMICI PER L'ANALISI DELLE CIANOTOSSINE NELLE ACQUE DI BALNEAZIONE

Leonardo Cerasino (a)*, Sara Bogialli (b), Licia Guzzella (c), Simona Scardala (d)
(a) Centro Ricerca ed Innovazione, Fondazione Edmund Mach, San Michele all'Adige (TN)
(b) Dipartimento di Chimica, Università di Padova, Padova
(c) Istituto di Ricerca Sulle Acque, Consiglio Nazionale delle Ricerche, Brugherio (MB)
(d) Dipartimento di Ambiente e Connessa Prevenzione Primaria, Istituto Superiore di Sanità, Roma
**leonardo.cerasino@fmach.it*

C3.1. Introduzione e procedure generali

I metodi chimici per l'analisi delle cianotossine consentono la loro identificazione e la loro quantificazione. A fronte di questi vantaggi, rispetto ad altri metodi di indagine, i metodi chimici richiedono apparecchiature più sofisticate e personale adeguatamente formato.

La performance di un metodo chimico viene generalmente espressa in termini di specificità (capacità di riconoscere con certezza le singole tossine), di sensibilità (quantità minima di tossina rilevabile) e robustezza (affidabilità durante l'impiego normale).

I metodi chimici più diffusi per analizzare le cianotossine sono quelli che si basano su un cromatografo liquido (LC, *Liquid Chromatography*) accoppiato ad un apposito rivelatore. I rivelatori possono essere di due tipologie: basati su spettroscopia molecolare (UV-vis, *diode-array*, fluorimetro), oppure rivelatori di massa (singolo o triplo quadrupolo, trappola ionica, TOF *Time-of-Flight*, ecc.). Quelli basati su spettroscopia molecolare sono più semplici e facili da gestire ma offrono performance inferiori. I rivelatori di massa (MS, *Mass Spectrometry*) sono molto più performanti, ma sono molto più sofisticati e richiedono personale adeguatamente specializzato; inoltre, in commercio esistono rivelatori di massa con tecnologie e caratteristiche costruttive molto diverse, alcuni più performanti sul lato della specificità, altri sul lato della sensibilità.

Nel momento in cui si deve implementare un protocollo analitico, occorre quindi valutare a) quale performance si desidera raggiungere e b) quale strumentazione si ha a disposizione, considerando che un metodo LC-UV/diode array/fluorimetro è in generale subito applicabile, e che, invece, un metodo LC-MS molto spesso va prima "adeguato" alla strumentazione disponibile.

I metodi chimici di analisi vengono messi a punto in maniera specifica a seconda della struttura e delle caratteristiche chimiche delle molecole in esame; il numero di sostanze che possono essere quantificate dipende dalla disponibilità di standard di riferimento. Gli standard delle cianotossine sul mercato comprendono solo una frazione delle cianotossine conosciute; sebbene questi standard rappresentino le tossine di gran lunga più frequenti, occorre sempre tenere presente che l'analisi chimica non è in grado di determinare tossine diverse da quelle per cui il metodo è stato sviluppato.

In letteratura sono stati descritti diversi metodi per l'analisi delle varie categorie di cianotossine: peptidi (microcistine, nodularine), alcaloidi (anatossine, cilindrospermopsine, saxitossine). A causa della grande eterogeneità nelle proprietà chimiche, non esiste un metodo omnicomprensivo ed efficiente per l'analisi di tutte le cianotossine (sebbene ci siano alcuni esempi descritti in letteratura), ma ogni categoria va analizzata con uno specifico metodo che garantisca adeguata specificità, sensibilità e robustezza.

C3.1.1. Generalità sulla preparazione del campione

La preparazione del campione costituisce ancora la fase critica delle analisi chimiche. La affidabilità dei risultati, sia dal punto di vista qualitativo (in termini di falsi negativi), sia dal punto di vista quantitativo (in termini di esattezza, riproducibilità, capacità di determinazione) dipendono fortemente dalla correttezza dell'applicazione dei protocolli utilizzati. Gli errori commessi in fase di preparazione del campione, insieme a quelli di campionamento e conservazione, sono i più frequenti, e non sono compensabili in alcun modo dal sistema di rivelazione, seppur di prestazioni elevate. Di conseguenza, è preferibile scegliere la procedura di preparazione del campione che preveda meno passaggi possibili, in modo da limitare la propagazione dell'errore.

Infine, per migliorare la gestione della procedura analitica, è consigliabile ricorrere all'uso di uno standard di processo (standard interno o standard surrogato). Questo dovrebbe essere in teoria il più simile possibile agli analiti target, senza provocare interferenza. Nei sistemi a MS, i composti più indicati sono i marcati isotopici degli analiti target. Nel caso delle tossine cianobatteriche, questi non sono generalmente disponibili commercialmente, quindi si ricorre spesso ad altre sostanze. Per esempio, nelle analisi di microcistine, si utilizza spesso la nodularina come standard di processo, quando sia possibile escludere la sua presenza naturale nel campione da analizzare.

C3.1.1.1. Preconcentrazione e purificazione del campione tramite tecniche di estrazione in fase solida

Molti metodi analitici prevedono uno step di preconcentrazione/purificazione del campione, quando si sia in presenza di analiti presenti in concentrazioni molto basse oppure in presenza di matrici complesse (acque con elevato contenuto di sostanze organiche, tessuti). La tecnica di estrazione in fase solida (*Solid Phase Extraction*, SPE) è utilizzata a questo scopo: si basa sull'utilizzo di cartucce riempite con diverse fasi stazionarie che trattengono i composti di interesse e lasciano passare tutte le sostanze interferenti; i composti vengono successivamente recuperati dalla cartuccia "eluendoli" con adatti solventi di estrazione. Si utilizzano fasi stazionarie diverse a seconda del tipo di tossine da analizzare.

Si deve porre particolare attenzione all'utilizzo di soluzioni compatibili con le diverse fasi adsorbenti, in modo da evitare fenomeni di *breakthrough*, ovvero di perdita di analiti dovuti alla stessa soluzione utilizzata in fase di caricamento (loading) sulla cartuccia. In particolare, il solvente di estrazione non deve essere costituito da fasi totalmente organiche quando si utilizzino fasi idrofobiche (C-18 o HLB, *Hydrophilic-Lipophilic Balance*), e da fasi acquose quando si utilizzino fasi polari (cyano, silice, florisil). In questi casi, per volumi di estratto superiori ai 10-20 mL, risulta conveniente un fase di pre-concentrazione, seguita dalla ricostituzione con fase mobile adeguata.

C3.1.2. Analisi di campioni di acqua

Il campione di acqua, prelevato in contenitore di vetro scuro, deve essere conservato refrigerato e al buio. Una volta arrivato in laboratorio, deve essere congelato fino al momento dell'analisi, se è prevista la determinazione del contenuto totale di tossine; se necessario, può essere preventivamente filtrato con filtri a fascia nera prima di essere congelato. Qualora invece si prevedesse l'analisi sia del contenuto extracellulare sia di quello intracellulare, occorre che il campione sia sottoposto il prima possibile ad una filtrazione (impiegando filtri di porosità non

superiore a 0,45 µm) per separare la biomassa dall'acqua. I filtri con la biomassa e l'acqua possono quindi essere congelati e conservati fino al momento dell'analisi.

Spesso le procedure prevedono una modifica del pH del campione per rendere la matrice compatibile con il tipo di materiale usato per la estrazione e purificazione dei composti.

C3.1.2.1. Analisi del contenuto extracellulare

Il contenuto extracellulare può essere analizzato iniettando direttamente l'acqua opportunamente filtrata nel sistema LC (accoppiato a rivelatore di spettroscopia molecolare o rivelatore di massa). L'iniezione diretta del campione, al limite preceduta solo da modifica del pH, è possibile soprattutto grazie alle recenti performance dei sistemi di rivelazioni basati sulla spettrometria di massa (Bogialli *et al.*, 2006a; Shan *et al.*, 2011; Beltrán *et al.*, 2012). 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. Qualora si necessiti di rilevare concentrazioni molto basse o si fosse in presenza di matrici complesse, occorre effettuare un passaggio di preconcentrazione/purificazione, tipicamente tramite tecniche SPE.

C3.1.2.2. Analisi del contenuto intracellulare

Le analisi sul contenuto intracellulare di cianotossine possono essere utilizzate per valutare il profilo di produzione e la rispettiva concentrazione di tossine (*toxin quota)*. È possibile avere informazioni sul contenuto intracellulare sottoponendo ad analisi i filtri. Alternativamente il contenuto intracellulare può essere ottenuto per differenza tra quello totale e quello extracellulare. Le analisi possono essere eseguite direttamente su un bloom algale, in seguito a lisi cellulare che permette la determinazione del contenuto totale (intra ed extracellulare). Quest'ultima opzione è preferibile perché le procedure di analisi per contenuto extracellulare e totale di tossine, si differenziano nei campioni di acqua solo per lo step di conservazione e filtrazione da campioni, mentre le procedure di estrazione e purificazione sono le medesime. Di conseguenza, i due protocolli analitici sono direttamente confrontabili, diversamente dai risultati ottenuti dall'estrazione da filtri e da acqua.

C3.1.3. Analisi di tessuti

I campioni di tessuto vanno tenuti congelati fino al momento dell'analisi. I tessuti sono generalmente matrici più difficili da analizzare per due motivi: la loro complessa struttura biologica, che può tradursi nella presenza di composti che interferiscono sulla determinazione finale, e la possibilità di formazione di coniugati o di legami più o meno forti tra le tossine in esame e le proteine. Per questo motivo, la preparazione del campione si divide generalmente in due step: 1) estrazione completa delle tossine dalla matrice, di solito con solventi organici e 2) purificazione dell'estratto per eliminare i possibili composti interferenti, di solito grassi e proteine. La liofilizzazione dei tessuti è utilizzata frequentemente come processo di pre-trattamento. In questo modo si migliora l'omogeneità del campione e in genere anche l'efficienza di estrazione.

Se il protocollo prevede l'uso di uno standard di processo, questo dovrebbe essere aggiunto prima della liofilizzazione/congelamento/estrazione e dell'eventuale trattamento enzimatico.

Nel più semplice degli approcci, il campione con la soluzione estraente viene sonicato e/o centrifugato, il surnatante viene concentrato per evaporazione e quindi iniettato nel sistema di rivelazione. Più frequentemente, dopo una prima fase di estrazione si procede con la purificazione, quasi sempre effettuata con la tecnica SPE.

I tessuti animali tuttavia, presentano generalmente un contenuto notevole di lipidi che devono essere eliminati prima della determinazione finale. I processi di purificazione da lipidi sono quindi più estensivi di quelli previsti per alghe e acque, e prevedono in genere l'uso di esano per il *defattening*, spesso con partizioni liquido-liquido (Geis-Asteggiante *et al.*, 2011).

C3.2. Microcistine

C3.2.1. Introduzione

Le microcistine (MC) costituiscono la classe di cianotossine più comuni. Sono eptapeptidi ciclici non ribosomali di cui sono state descritte in letteratura più di 80 varianti diverse. Nelle MC gli aminoacidi nelle posizioni 1, 3, 5, 6 e 7 sono fissi (rispettivamente D-Ala, D-MeAsp, Adda, D-Glu, e Mdha); invece gli aminoacidi nelle posizioni 2 e 4 sono variabili; per questo motivo le MC vengono indicate con due lettere che identificano quali aminoacidi si ritrovano in queste due posizioni; in Figura 1 è rappresentata la struttura della MC-LR, avente in posizione 2 una leucina (L) e in posizione 4 una arginina (R). La natura di questi aminoacidi influisce notevolmente sulla idrofilicità delle molecole: gli aminoacidi con carattere polare come la arginina rendono la MC più idrofila (per esempio le varianti di tipo RR, LR, YR), gli aminoacidi meno polari come leucina, fenilalanina, triptofano rendono la MC meno idrofila (per esempio le varianti di tipo LA, LF, LW).

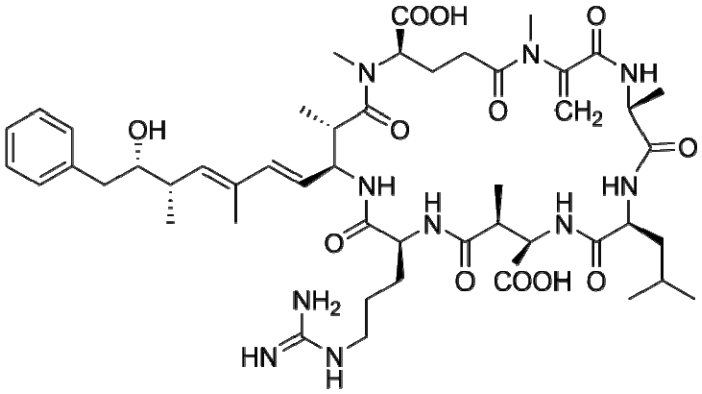


Figura C3.1. Struttura della microcistina-LR

Anche tra gli aminoacidi "fissi", però, esiste un certo grado di variabilità. Molto frequenti sono le MC con aminoacidi demetilati in posizione 3 e/o 7 (indicate con i prefissi [D-Asp^3], [Dha^7] e [D-Asp^3, Dha^7]); meno frequenti invece sono le MCs con variazioni sugli aminoacidi 1, 5 e 6, anche questi indicati da appositi prefissi (vedi p.es. Zurawell *et al.*, 2005).

La validazione dei metodi analitici per le MC deve tener conto del fatto che il numero di standard analitici disponibili sul mercato è limitato ad una decina di varianti. Di seguito sono indicate sommariamente le procedure per l'analisi delle MC nelle varie matrici.

In Tabella C3.1 viene proposta una selezione di metodi di riferimento con le relative performance.

Tabella C3.1. Esempi di procedure di analisi per le microcistine

Tipo di matrice	Pre-trattamento/estrazione	Purificazione	Metodo di rivelazione	LoD	Rif. bib.
Cianobatteri	Congelamento/scongelamento Estrazione con metanolo al 75% con sonicazione	-	HPLC-UV	-	Spoof *et al.*, 2003
			LC-MS	10 pg iniettati	
Tessuti (liofilizzato)	3×10 mL di butanolo:metanolo:acqua (1:4:15)	SPE (C-18); eluizione con 90% metanolo	HPLC-DAD	0,02 µg/g	Chen *et al.*, 2005
Tessuti	Acetonitrile/acqua (75/25) 1% acido formico	Partizione liquido-liquido con esano	HPLC-MS/MS	0,010 µg/g	Geis-Asteggiante *et al.*, 2012
Acqua	Filtrazione (extracellulare) Congelamento/scongelamento (totale)	SPE (Carbograph); eluizione con diclorometano-metanolo (80/20, v/v) 10 mM TFA	HPLC-MS/MS	0,002-0,009 µg/L	Bogialli *et al.*, 2006b
	Filtrazione Aggiunto antiossidante nelle acque potabili	SPE (HLB); eluizione con metanolo 0,05% TFA	HPLC-DAD	0,03-0,09 µg/L	Triantis *et. al.,* 2010
			HPLC-MS/MS	0,002-0,017 µg/L	
	Filtrazione (0,22 µm)	Online SPE (C-18); iniezione diretta di 100 µL	nanoLC-MS/MS	0,014-0,056 µg/L	Shan *et al.,* 2011
		Online SPE (HLB); iniezione diretta di 1mL	UHPLC-MS/MS	0,002-0,040 µg/L	Beltrán *et al.,* 2012

LoD: *Limit of Detection*
HPLC-UV: *High-Performance Liquid Chromatography with UV detection*
HPLC-DAD: *High-Performance Liquid Chromatography with Diode-Array Detection*
HPLC-MS/MS: *High-Performance Liquid Chromatography with Tandem Mass Spectrometry*

C3.2.2. Analisi di campioni di acqua

Il campione di acqua va trattato come descritto nel paragrafo C3.1.2 per determinare il contenuto di MC totali, intracellulari ed extracellulari. In Tabella C3.1 sono riportati i riferimenti relativi ai diversi metodi proposti.

C3.2.2.1. Estrazione e purificazione

Ad un semplice processo di evaporazione del campione si preferisce l'utilizzo di cartucce per SPE in modo da effettuare, contestualmente alla pre-concentrazione, anche la purificazione del

campione. Per le MC generalmente si utilizzano cartucce di tipo C-18 (Guzzella *et al.*, 2010; Meriluoto *et al.*, 2000; Harada *et al.*, 2004; Ortea *et al.*, 2004), materiali polimerici in divinilbenzene-polisterene, anche funzionalizzati con gruppi polari (HLB) (Rapala *et al.*, 2002; Triantis *et al.*, 2010), Carbon Black Grafitizzati (GCB), (Bogialli *et al.*, 2006b) colonne a immunoaffinità (Aranda-Rodriguez *et al.*, 2003) e Molecular Imprinted Polymers (Chianella *et al.*, 2003). È stata proposta anche l'estrazione contemporanea di MC e anatossina-a mediante cromatografia a coppia ionica (Pietsch *et al.*, 2001).

Un'alternativa al tradizionale formato delle cartucce per SPE consiste nell'uso di dischi per estrazione, costituiti da materiali analoghi. 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 e 1 L, ma le operazioni risultano più veloci grazie ad un'area superficiale più grande. Queste procedure sono state usate efficacemente anche per l'estrazione contemporanea di MC e anatossina-a (Maizels *et al.*, 2004).

Gli analiti sono estratti dalla cartuccia in genere dopo uno step di lavaggio per eliminare composti della matrice potenzialmente interferenti. Le soluzioni di lavaggio, non devono eluire i composti, quindi si usano soluzione acquose con basso tenore di solvente organico, in genere metanolo non superiore al 25%.

Per la ri-eluizione delle MC, le più comuni fasi organiche utilizzate per l'estrazione di MC sono costituite da metanolo, acetonitrile, soluzioni di diclorometano-metanolo, addizionate di diversi modificanti, spesso acidi (ISO, 2005; Ortea *et al.*, 2004; Traintis *et al.*, 2010; Bogialli *et al.*, 2006b).

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, o l'effetto si soppressione del segnale che si sperimenta in spettrometria di massa (MS), può rendere necessario un secondo passaggio su cartucce SPE. In questo caso, i materiali impiegati dovrebbero essere diversi da quelli utilizzati in fase di estrazione. In genere lo schema applicabile all'analisi di MC, prevede l'uso di materiali idrofobici nell'estrazione (tipo C-18 o HLB) e idrofilici in fase di purificazione, per esempio florisil o silice (Tsuji *et al.*, 1994).

La soluzione estratta dalla cartuccia SPE è in genere sottoposta a ulteriore concentrazione per mezzo di evaporazione in bagni termostatici a temperature ≤ 50°C. Il residuo è ricostituito, filtrato nel caso in cui la torbidità lo renda necessario, e un'aliquota iniettata nel sistema di rivelazione.

C3.2.3. Estrazione da bloom

Per analisi qualitative su bloom, la migliore opzione in termini di informazioni strutturali, velocità dell'analisi e sensibilità, risulta essere la spettrometria di massa (MS) con sorgente MALDI (*Matrix Assisted Laser Desorption Ionization)* (Welker *et al.*, 2004) che prevede un ridottissimo trattamento del campione.

L'analisi chimica quantitativa richiede invariabilmente l'estrazione da matrice e la determinazione con tecniche cromatografiche accoppiate a vari sistemi di rivelazione, sostanzialmente MS e spettrofotometria UV-vis (es. Guzzella *et al.*, 2010).

È stato riscontrato (Barco *et al.*, 2005; Sangolkar *et al.*, 2006) che il solvente più efficace per la estrazione delle MC da bloom algali sia una soluzione di acqua/solvente organico, in genere acqua/metanolo in rapporto bloom/solvente di circa 25 mg/mL. Un eventuale utilizzo di acidi (solitamente formico o acetico) a pH *ca* 2-3 favorisce l'estrazione delle varianti più basiche, p.es. quelle della serie R. L'utilizzo di miscele acqua/metanolo, nel range 60-80% in metanolo,

sembra essere il miglior compromesso per l'estrazione di tutte le possibili varianti (Spoof *et al.*, 2003; Barco *et al.*, 2005).

Un solo processo di centrifugazione a velocità ≥ 4000 rpm per 15 minuti sembra essere sufficiente per un'estrazione efficace delle MCs, senza bisogno di processi di sonicazione o di purificazione degli estratti.

Analoghe considerazioni sul solvente di estrazione possono essere fatte per le estrazioni del contenuto intracellulare da filtri (ISO, 2005), il cui estratto può essere però ulteriormente purificato tramite utilizzo di SPE (Ruiz *et al.*, 2013).

C3.2.4. Estrazione da tessuti

Per l'estrazione da tessuti sono state utilizzate diverse miscele, in genere acquose e di solventi organici:

- butanolo-metanolo-acqua (1:4:15) (Chen *et al.*, 2005)
- metanolo puro (Soares *et al.*, 2004; Miles *et al.*, 2013)
- metanolo 75% (Garcia *et al.*, 2010)
- acetonitrile 75% acidificato con 1% di acido formico (Geis-Asteggiante *et al.*, 2011)
- EDTA (acido etilendiamminotetraacetico), Na_2 0,01 M in 5% di acido acetico (Rios *et al.*, 2013)

La prima miscela si è dimostrata efficace anche nell'estrazione di composti coniugati (Chen *et al.*, 2005b), in particolare il glutatione-coniugato della MC-LR.

C3.3. Anatossine

C3.3.1. Introduzione

Le anatossine (ATX) rappresentano un gruppo di alcaloidi neurotossici che comprendono tre congeneri principali: ATX-a, OmoATX-a, e ATX-a(s). La struttura della ATX-a è riportata in Figura C3.2a; rispetto and ATX-a, la OmoATX-a presenta un gruppo metilico in più (una funzionalità propionilica al posto di quella acetilica); ATX-a(s) invece è un estere del guanidin-metil fosfato (Figura C3.2b).

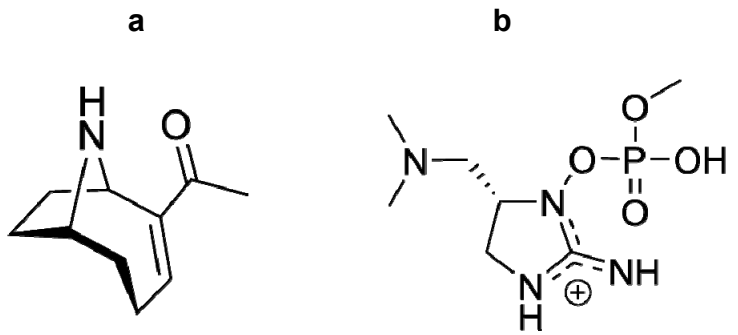


Figura C3.2. Struttura chimica della ATX-a (a) e della ATX-a(s) (b)

Si tratta di composti alquanto instabili, che vengono rapidamente degradati. Sebbene siano stati descritti metodi analitici per tutte le ATX, l'analisi dell'ATX-a è quella per cui esistono maggiori informazioni e ATX-a è l'unica di cui si dispone di standard analitico.

Di seguito sono indicate sommariamente le procedure per l'analisi delle ATX nelle varie matrici. In Tabella C3.2 vengono proposti dei metodi di riferimento con le relative performance.

Tabella C3.2. Metodi di analisi per le ATX

Tipo di matrice	Pre-trattamento/ estrazione	Purificazione	Metodo di rivelazione	LoD	Riferimento bibliografico
Cianobatteri	etanolo/acido acetico 0,1 M (20:80)	SPE (C-18); analisi su eluato	HPLC-MS/MS	-	Dörr *et al.*, 2010
Tessuti, cianobatteri	10 mL metanolo 1% HCl 1M	SPE a scambio cationico (WCX); eluizione con metanolo 0,2% TFA	HPLC-FLD	3 ng/g	Rellàn *et al.*, 2007
Acqua	pH 10,5	SPE (PGC); eluizione con metanolo 0,1% TFA	HPLC- MS/MS	0,00065 µg/L	Dimitrakopoulos *et al.*, 2010
	Filtrazione (fascia nera)	Iniezione diretta di 0,5 mL	HPLC-MS/MS	0,013- µg/L	Bogialli *et al.*, 2006a

HPLC-FLD: *High-Performance Liquid Chromatography* con *Fluorescence Detection*
HPLC-MS/MS: *High-Performance Liquid Chromatography* con *Tandem Mass Spectrometry*

C3.3.2. Analisi di campioni di acqua

Il campione di acqua va trattato come descritto nel paragrafo C3.1.2. per determinare il contenuto di ATX totali, intracellulari ed extracellulari. In Tabella C3.2 sono riportati i riferimenti per i dettagli relativi ai diversi metodi disponibili.

Per l'ATX-a è stato descritto un metodo (Bogialli *et al.*, 2006a) che prevede l'iniezione diretta del campione filtrato (0,5 mL) in un apparato LC-MS/MS. I limiti di quantificazione (0,013 µg/L) sono comunque adeguati al range di concentrazione di interesse nell'acqua. È tuttavia indispensabile prestare estrema attenzione alle condizioni di rivelazione, che possono erroneamente portare all'identificazione di ATX-a in luogo dell'aminoacido fenilalanina (Furey *et al.*, 2005).

C3.3.2.1. Estrazione e purificazione

La maggior parte dei metodi di estrazione delle ATX prevede l'utilizzo di tecniche di SPE, con considerazioni analoghe a quelle fatte nella parte generale, sul contenuto intracellulare, extracellulare e totale, sulla eventuale purificazione e/o evaporazione. Bisogna tener conto qui dell'elevata polarità delle anatossine, che hanno quindi scarsa affinità con i materiali idrofobici. Il pH del campione di acqua quindi deve essere controllato con cautela, con lo scopo di renderlo idoneo al sorbente per SPE utilizzato.

Tuttavia, materiali convenzionali come C-18 in cartucce (Pietsch *et al.*, 2001) o dischi (Maizels *et al.*, 2004) sono stati descritti per l'estrazione di ATX, utilizzando metanolo come eluente. Nel primo caso (Pietsch *et al.*, 2001) un agente di coppia ionica, acido eptafluorobutirrico è stato utilizzato per favorire la ritenzione di un composto così polare su

materiali idrofobici. Nel secondo caso (Maizels *et al.*, 2004), il pH del campione è stato reso basico.

L'estrazione di ATX-a da diversi sorbenti per SPE, come C-18, HLB e *porous graphitic carbon* (PGC) è stata valutata da un gruppo di ricerca (Dimitrakopoulos *et al.*, 2010) su campioni di acqua portati a pH 10,5. La ri-eluizione, effettuata con metanolo 0,1% di acido trifluoroacetico, è stata più efficace su PGC.

Alternativamente, sono state impiegate fasi stazionarie polari, come gli scambiatori ionici (Furey *et al.*, 2003) per l'estrazione di ATX-a, homo-ATX-a e prodotti di degradazione. In questo caso per la ri-eluizione l'acqua, generalmente acidificata, è il solvente più frequentemente utilizzato insieme a miscele acqua/metanolo (Osswald *et al.*, 2007; Namikoshi *et al.*, 2003) o metanolo acidificato con acido trifluoroacetico, anch'esso un agente di coppia ionica (Furey *et al.*, 2003).

Una procedura che prevede l'utilizzo della SPME è stata descritta (Rellàn *et al.*, 2007). Il campione acquoso portato a pH 10, viene esposto alla fibra a 45°C per 20 minuti e poi derivatizzato prima della ri-eluizione con una soluzione 60:40 di acetonitrile:acqua.

C3.3.3. Estrazione da bloom

L'estrazione dell'ATX-a dalle cellule è possibile utilizzando diversi tipi di solventi. Acqua pura, acqua acidificata, metanolo acidificato (Rellàn *et al.*, 2007) o miscele acqua/metanolo sono i solventi più comunemente usati (Osswald *et al.*, 2007). Una miscela idroalcolica acidificata, etanolo/acido acetico 0.1 M (20:80), è stata utilizzata per l'analisi della ATX-a(s) da colture liofilizzate (Dörr *et al.*, 2010). Il surnatante è stato poi purificato tramite cartucce SPE, utilizzando C-18 per trattenere i pigmenti. Quindi, in questo caso, l'anatossina rimane nell'eluato che è stato poi portato a secco, ricostituito, filtrato e iniettato nel sistema di rivelazione. Una partizione liquido-liquido con cloroformio è stata recentemente impiegata (Ruiz *et al.*, 2013) per la purificazione degli estratti da bloom.

C3.3.4. Estrazione da tessuti

L'estrazione dai tessuti di pesci dell'ATX-a viene effettuata generalmente con miscele organiche, a cui segue una purificazione tramite SPE, principalmente per rimuovere i lipidi dall'estratto. Gli estratti devono essere opportunamente diluiti prima di essere purificati su cartucce per SPE. Una miscela metanolo/acqua/acetone è stata utilizzata per estrarre ATX-a da salmone, e il residuo acquoso, addizionato con acqua e metanolo, è stato purificato su cartuccia SPE polimerica a base di stirene divinil benzene (Hormazabal *et al.*, 2000). Il metanolo acidificato con 1% di acido cloridrico 1 M è stato utilizzato come solvente di estrazione per tessuti di pesce (Rellàn *et al.*, 2007). L'estratto, portato a pH 7, è stato purificato su cartuccia SPE a scambio cationico, e ri-eluito con metanolo 0,2% in acido trifluoroacetico. Gli stessi autori propongono l'utilizzo di fibre per *Solid Phase Micro Extraction* (SPME) come procedura di purificazione alternativa, che vede l'utilizzo di una soluzione 60:40 di acetonitrile:acqua per le ri-estrazione.

Un altro metodo presente in letteratura prevede l'estrazione e purificazione in un unico passaggio, tramite la tecnica della *Matrix Solid Phase Dispersion* (MSPD). Il campione, omogeneizzato in un mortaio con cristobalite, viene estratto con 4 mL di acqua acidificata a pH 2 con acido cloridrico a 80°C. Dopo acidificazione e filtrazione, l'estratto viene iniettato all'apparato di rivelazione (Bogialli *et al.*, 2006a).

C3.4. Saxitossine

C3.4.1 Introduzione

Le saxitossine (STX), che vengono anche definite tossine PSP (*Paralityc Shellfish Poisoning*), comprendono un gruppo di alcaloidi, di cui la saxitossina propriamente detta (STX) è quella più studiata.

Nella Figura C3.3 è riportata la formula di struttura generica delle STX, e in Tabella C3.3 sono riportati gli omologhi più frequentemente rilevati.

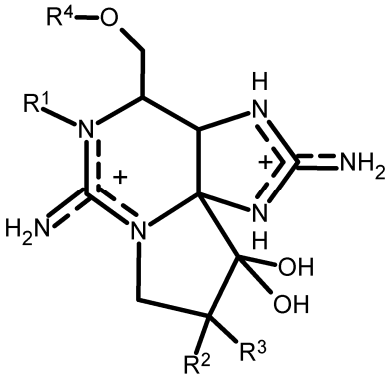


Figura C3.3. Struttura molecolare base delle saxitossine

Tabella C3.3. Gruppi R di alcuni omologhi STX più frequentemente rilevati

Tossina	R^1	R^2	R^3	R^4
STX	H	H	H	$CONH_2$
Neo-STX	OH	H	H	$CONH_2$
GTX2	H	H	OSO_3^-	$CONH_2$
GTX3	H	OSO_3^-	H	$CONH_2$
GTX5	H	H	H	$CONHSO_3^-$
C1	H	H	OSO_3^-	$CONHSO_3^-$
C2	H	OSO_3^-	H	$CONHSO_3^-$
dcSTX	H	H	H	H
dcGTX2	H	H	OSO_3^-	H

GTX = gonyautossine, C = C tossine o saxitossine disolfate, dc = decarbamil

A scopo di monitoraggio, il Gruppo europeo di esperti scientifici sui contaminanti nella catena alimentare dell'EFSA (*European Food ans Safety Authority*) ha deciso per le STX l'applicazione di valori di TEF (*Toxicity Equivalent Factor*) per esprimere gli omologhi delle STX identificati in termini di equivalenti di STX, usando tecniche di cromatografia liquida ad alta risoluzione (*High-Performance Liquid Chromatography*, HPLC). Finché non sarà disponibile una migliore conoscenza in materia, il gruppo di esperti scientifici sui contaminanti nella catena alimentare (il panel *Contaminants in the Food Chain,* CONTAM) propone i

seguenti valori TEF basati sulla tossicità acuta intraperitoneale nei topi: STX = 1, NeoSTX = 1, GTX1 = 1, GTX2 = 0,4, GTX3 = 0,6, GTX4 = 0,7, GTX5 = 0,1, GTX6 = 0,1, C2 = 0,1, C4 = 0,1, dc-STX = 1, dc-NeoSTX = 0,4, dc GTX2 = 0,2, GTX3 = 0,4 e 11-idrossi-STX = 0,3 (EFSA, 2009).

Per l'analisi delle tossine PSP un grosso limite per la determinazione analitica è rappresentato dalla scarsa reperibilità degli standard. In assenza di standard per la quantificazione, normalmente si utilizza il fattore di risposta del composto chimicamente più simile. In alcuni casi è possibile utilizzare estratti cellulari (es. di dinoflagellati Alexandrium) per produrre alcune tipologie di saxitossine non disponibili (es. per le saxitossinedisolfate C1 e C2; Jaime *et al.*, 2001).

C3.4.2. Prelevamento e conservazione del campione

Il campionamento e la conservazione dei campioni acquosi contenenti STX sono simili a quelli previsti per le altre cianotossine. Le STX vanno conservate a 4°C, in quanto è noto che a temperature di 25°C si hanno conversioni significative delle tossine-C, dalla bassa tossicità, alle più tossiche tossine dc-GTX. Va comunque evitato lo stoccaggio dei campioni per lunghi periodi prima dell'analisi (superiori alle 48 ore), in quanto pur restando invariata la concentrazione totale delle STX potrebbe risultare sostanzialmente differente il profilo delle tossine presenti.

Nella conservazione del campione gioca un ruolo molto importante anche il solvente utilizzato dell'estrazione. Nel caso di estrazione delle STX da cianobatteri, prove di laboratorio hanno mostrato che utilizzando come solvente acido acetico 0,05 M le tossine risultano essere stabili, una volte estratte, per almeno due settimane a temperatura ambiente e a 4°C (Scardala *et al.*, 2006).

C3.4.3. Preparazione del campione

Le STX sono presenti principalmente all'interno delle cellule e quindi prima di procedere all'estrazione con solvente è necessario causare la lisi cellulare o estrarre separatamente le alghe per filtrazione e poi il campione acquoso (per la metodologia di lisi cellulare o filtrazione utilizzare la stessa tecnica delle microcistine).

C3.4.4. Estrazione da bloom

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

L'estrazione dalle cellule viene effettuata generalmente utilizzando acido acetico 0,01 M o anche metanolo acidificato dopo aver separato la biomassa per centrifugazione o filtrazione e averla sottoposta ad almeno un ciclo di congelamento/scongelamento. L'estrazione delle STXs è stata effettuata anche su cellule intatte con acido acetico 0,05 M, tuttavia è stato verificato che in queste condizioni si hanno recuperi minori (Nicholson & Burch, 2001).

La determinazione delle STX dai campioni di fitoplacton viene notevolmente complicata dalla rapida interconversione di alcune delle tossine in esame durante l'estrazione: l'utilizzo di acido cloridrico nel range 0,03-1,0 N causa la conversione delle tossine C1 e C2 nelle più tossiche GTX2 e GTX3; l'acido acetico 0,05 - 1,0 N e acido cloridrico 0,01-0,02 N consentono di ottenere un profilo di estrazione paragonabile e lasciano inalterato il profilo iniziale (Ravn *et*

al., 1995). Una volta estratte, ad esempio in bagno ultrasonico (come per le altre tossine), l'estratto va centrifugato (10 min a 3000-4000 rpm) per recuperare il sopranatante oppure filtrato su un filtro da 0,45 µm in PTFE (politetrafluoretilene). Anche altri solventi possono essere utilizzati, ma la loro efficacia va verificata.

C3.4.5. Purificazione

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

C3.4.6. Separazione cromatografica e rilevazione

Anche per le STX i metodi più comunemente utilizzati sono metodi in cromatografia liquida accoppiati a rivelatori fluorimetrici (*Fluorescence Detector*, FLD) con lunghezze d'onda di eccitazione e di emissione pari a 300 nm e 390-400 nm (Costa *et al.*, 2006; García *et al.*, 2004). I metodi più comuni prevedono una ossidazione alcalina post-colonna (Molica *et al.*, 2005), anche se viene utilizzata anche l'ossidazione pre-colonna (Costa *et al.*, 2006) seguita da cromatografia di coppia-ionica accoppiata a rivelatori fluorimetrici. L'ossidazione post-colonna, nonostante possa dare origine a picchi piuttosto allargati, a causa dei volumi piuttosto ampi dei tubi di reazione (FAO, 2004), viene preferita alla più semplice ossidazione pre-colonna, in quanto diverse STX danno poi origine allo stesso derivato, permettendo in questo caso di determinare solo la concentrazione totale delle tossine e perdendo quindi informazioni preziose sul loro profilo.

Dal punto di vista cromatografico le STX presentano caratteristiche e polarità piuttosto diverse, diventa quindi difficile riuscire a separarle tutte con una sola corsa cromatografica, è possibile allora effettuare tre corse con fasi mobili diverse per separare correttamente le PSP appartenenti al gruppo delle STX (carica netta 2+), quelle appartenenti al gruppo delle GTX (carica netta 1+) e delle tossine C (carica netta 0). Per la risoluzione delle PSP, mediante una colonna C-8, eventualmente equipaggiata con una precolonna C18, vengono adottate le seguenti fasi mobili (Oshima, 1995; Kaas & Henriksen, 2000):

- 1-eptansolfonato in fosfato d'ammonio con aggiunta di acetonitrile o di acido fosforico per le saxitossine e senza aggiunta di acetonitrile o acido fosforico per le GTX, l'utilizzo di tale fase mobile permette la separazione dalle tossine decarbamate dagli analoghi carbamati;
- per la risoluzione delle C-tossine viene invece utilizzato tetrabutilammonio fosfato aggiustato a pH 5,8 con acido acetico.

I limiti di quantificazione per ciascuna tossina sono in questi casi pari a circa 0,5-1 µg/L.

Nel 2001 Jaime *et al.* hanno messo a punto un metodo per la quantificazione delle PSP, utilizzando la cromatografia liquida a scambio ionico accoppiata alla spettrometria di massa. Le misurazioni sono state effettuate in modalità *Single Ion Monitoring* (SIM). Sono stati quindi monitorati gli ioni molecolari $[M+H]^+$ delle diverse varianti di PSP disponibili. I LoD di questo metodo sono paragonabili a quelli ottenuti con rivelatori fluorimetrici per alcune varianti,

mentre per altre sono leggermente superiori. Il metodo viene comunque proposto come metodo di conferma, inoltre l'utilizzo in parallelo dei due rivelatori, fluorimetrico e di massa, può essere utilizzato per l'identificazione di saxitossine ancora sconosciute.

Anche Halme *et al.* nel 2012 hanno sperimentato un metodo simile in HILIC-MS/MS (*Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography*), in cui con una unica corsa cromatografica veloce di 9 min sono state quantificate la maggior parte delle saxitossine, validate anche per l'incertezza di analisi, utilizzando estratti cellulari a partire da un LoD di circa 3 µg/L.

C3.5. BMAA

C3.5.1. Introduzione

La β-N-metilamino-L-alanina (BMAA) (Figura C3.4) è un aminoacido non proteico considerato un possibile agente causale del cosiddetto "complesso SLA-Parkinson-Demenza" (SLA-PDC) una variante di Sclerosi Laterale Amiotrofica (SLA), patologia degenerativa rara che colpisce i motoneuroni del sistema nervoso centrale (Staton & Bristol, 1997; Myers & Nelson, 1990; Rumsby *et al.*, 2008).

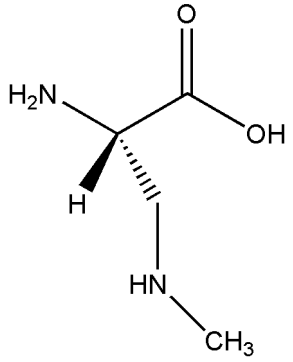


Figura C3.4. Struttura chimica della BMAA

Il ruolo dei cianobatteri nella produzione di BMAA è ad oggi ancora controversa. I primi studi effettuati, infatti, rilevavano la BMAA, anche a concentrazioni elevate, in quasi tutti i campioni di cianobatteri testati, gli studi successivi però non hanno confermato tali risultati rilevando concentrazioni molto più basse di BMAA o non rilevandola affatto (Nordic Council of Ministers, 2007).

Analizzando i diversi studi si è supposto che all'origine delle differenze vi sia la metodica analitica applicata. Alte concentrazioni di BMAA ed elevate percentuali di campioni positivi sono state trovate solo in studi effettuati con HPLC-FLD, GC(*Gas Chromatography*)-MS o elettroforesi capillare. Nel 2012 Faassen *et al.* hanno confrontato tre metodi comunemente utilizzati nella determinazione della BMAA (HPLC-FLD, LC-MS/MS su campioni derivatizzati, LC-MS/MS su campioni non derivatizzati). In linea con quanto già pubblicato, alcuni campioni testati con metodo HPLC-FLD hanno mostrato concentrazioni piuttosto elevate di BMAA, mentre solo i campioni di semi di *Cycadaceae*, utilizzati come controllo positivo, sono risultati positivi all'LC-MS/MS. Avendo testato gli stessi campioni di cianobatteri con i diversi metodi, Faassen *et al.* (2012) hanno pertanto dimostrato come le differenze nei risultati

ottenuti siano da attribuire a falsi positivi da mettere in relazione con la metodica scelta. A causa della loro bassa selettività i metodi HPLC-FLD sovrastimano la concentrazione di BMAA. È pertanto probabile che campioni risultati positivi in HPLC-FLD a livelli di mg/g contenessero livelli di tossina molto più bassi probabilmente nell'ordine dei µg/g o anche ng/g. La scelta del metodo analitico è pertanto uno step da valutare con la massima attenzione.

Un altro limite da superare nella determinazione analitica della BMAA è l'assenza di dati sufficienti ad identificare un NOAEL (*No Observed Adverse Effect Level*) o LOAEL (*Lowest Observed Adverse Effect Level*) sulla base del quale derivare una TDI (*Tolerable Daily Intake*) (Rumsby *et al.*, 2008). In assenza di tali dati infatti determinare il limite di rilevabilità che un metodo deve raggiungere per essere applicato nelle analisi di routine è assolutamente arbitrario.

C3.5.2. Estrazione e purificazione

La BMAA, oltre che in forma di aminoacido libero, può trovarsi anche in una forma legata alle proteine sia nei tessuti animali che vegetali e in letteratura la loro estrazione segue un protocollo piuttosto condiviso (Faassen *et al.*, 2009; Cervantes Cianca *et al.*, 2012; Faassen *et al.*, 2012; Cox *et al.*, 2005).

Per la determinazione della BMAA libera il pellet di cianobatteri, in genere liofilizzato, viene estratto con TCA (acido tricloroacetico) 0,1 M in modo da liberare la BMAA e precipitare le proteine. L'estrazione viene ripetuta per due volte e dopo centrifugazione, i surnatanti vengono uniti e conservati per l'analisi.

Per ottenere la frazione legata alle proteine invece il pellet, dopo l'estrazione con TCA, è sottoposto ad idrolisi con HCl 6 M a caldo. Dopo l'idrolisi, il campione viene liofilizzato o evaporato, ricostituito in HCl 20 mM o in fase mobile e conservato fino all'analisi strumentale.

Qualora non si vogliano avere le due frazioni (libera e legata) separatamente, è possibile effettuare direttamente l'idrolisi con HCl 6M a caldo per ottenere la BMAA totale (Jiang *et al.*, 2013).

In alcuni casi l'idrolizzato viene purificato utilizzando cartucce SPE C-18 (Murch *et al.*, 2004) o a scambio cationico in modalità mista (HCX, MCX) (Combes *et al.*, 2013; Jiang *et al.*, 2013; Christensen *et al.*, 2012).

C3.5.3. Separazione cromatografica e rilevazione

La separazione e quantificazione di basse concentrazioni di BMAA nei campioni naturali non è banale, a causa della presenza di altri aminoacidi e di numerose altre piccole molecole normalmente presenti che possono interferire con l'analisi. Sono stati identificati diversi composti che possono interferire, tra i quali l'acido 2,4-diaminobutirrico (2,4-DAB), un aminoacido non proteico ampiamente rilevato sia nei procarioti sia negli eucarioti. Il 2,4-DAB è un isomero strutturale della BMAA che è generalmente eluito con tempi di ritenzione molto simili alla BMAA, pertanto è importante assicurarsi che il metodo analitico scelto sia in grado di rilevare e identificare entrambi i composti.

I metodi maggiormente utilizzati per l'identificazione della BMAA sono metodi che prevedono l'uso della cromatografia liquida accoppiata a rivelatori fluorimetrici (FLD) o spettrometria di massa (Tabella C3.4).

Tabella C3.4. Esempi di procedure di analisi per la BMAA

Pre-trattamento/estrazione	Purificazione	Derivatizzazione	Metodo di rivelazione	LoD	Riferimento bibliografico
BMAA TOT: HCl 6M	SPE	AQC	HPLC-MS/MS	0,1 µg/g	Jiang *et al.*, 2013
BMAA libera: TCA 0,1M	SPE		HPLC-MS/MS	0,6 µg/g	Combes *et al.*, 2013
BMAA libera: TCA 0,1M BMAA TOT: HCl 6M			HPLC-MS/MS	2,5 µg/g	Faassen *et al.*, 2012
BMAA libera: TCA 0,1M BMAA TOT: HCl 6M		AQC	HPLC/FLD	Libera: 0,75pg iniettati Totale: 0,35pg iniettati	Cervantes *et al.*, 2012
BMAA libera: TCA 0,1M BMAA legata: HCl 6M		AQC	HPLC/FLD	0,000065 mol iniettati	Cox *et al.*, 2005
BMAA libera: TCA 0,1M BMAA legata: HCl 6M			HPLC-MS/MS	4 µg/g	Faassen *et al.*, 2009
BMAA TOT: HCl 6M	SPE	AQC	HPLC-MS/MS		Spáčil *et al.*, 2010
BMAA libera: TCA 0,1M BMAA legata: HCl 6M		AQC	HPLC-MS/MS HPLC/FLD	7,7ng iniettati in HPLC/FLD	Metcalf *et al.*, 2008

AQC: 6-Aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate

C3.5.3.1. Analisi in HPLC-FLD

Il metodo in HPLC-FLD più utilizzato è stato sviluppato da Cox e collaboratori modificando il metodo per la determinazione degli aminoacidi messo a punto da Choen e Michaud (1993). Le frazioni ottenute dall'estrazione della BMAA libera e legata sono sottoposte a derivatizzazione con il carbamato eterociclico AQC (6-Aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate). L'agente derivatizzante AQC è in grado di convertire sia gli aminoacidi primari che secondari in derivati ureici stabili e altamente fluorescenti con lunghezze d'onda di eccitazione e di emissione pari a 250 nm e 395 nm rispettivamente. L'analisi cromatografica più comunemente utilizzata per separare la BMAA dagli altri aminoacidi prevede l'uso di colonne C-18 con gradiente acetonitrile/acqua (Nordic Council of Ministers, 2007). È però riportato anche l'utilizzo di gradienti 140mM acetato di sodio e 5.6mM trietilammina (Eluente A) e metanolo al 65% in acqua (Eluente B) (Cervantes Cianca *et al.*, 2012).

È bene ricordare di nuovo, quando si applicano metodi basati sulla derivatizzazione, come quello appena illustrato, che questa aumenta l'aspecificità del metodo. Sia il tempo di ritenzione che il segnale in fluorescenza, infatti, sono caratteristiche del derivato e non dell'analita e qualsiasi composto che reagisca con l'AQC dà lo stesso segnale in fluorescenza dopo la derivatizzazione. L'AQC reagisce con i gruppi amminici primari e secondari, il che significa che reagisce con tutti gli aminoacidi e con tutti i composti che contengono gruppi amminici, pertanto la possibilità di interferenze e falsi positivi è piuttosto elevata.

C3.5.3.2. Analisi in LC-MS/MS

Appurata la complessità della matrice dei campioni naturali, ricca di composti capaci di coeluire con la BMAA, è fondamentale quindi avvalersi di metodi specifici e selettivi, come i metodi LC-MS/MS, che, oltre al tempo di ritenzione, basano l'identificazione dei vari composti anche sull'analisi di più transizioni e delle loro abbondanze relative, permettendo così di minimizzare la possibilità di ottenere falsi positivi (Rosén & Hellenäs, 2008; Spáčil *et al.*, 2010; Esterhuizen-Londt *et al.*, 2011; Faassen *et al.*, 2012).

L'analisi dello standard di BMAA in soluzione acquosa in infusione in modalità elettrospray positiva ha permesso di individuare lo ione molecolare $[M+H]^+$ della BMAA a m/z 119. I principali ioni prodotto invece sono m/z 102, 88, 76, 73 e 44, probabilmente dovuti alla perdita rispettivamente degli ioni ammonio, metilammina, CH_2=N-CH_3, acido formico e $[CH_2$=NH-$CH_3]^+$ (Nordic Council of Ministers, 2007; Faassen *et al.*, 2009). Generalmente la transizione 199>102 viene utilizzata per la quantificazione. La stessa transizione è presente anche nel segnale del 2,4-DAB, per distinguere i due composti vengono pertanto prese in considerazione anche altre transizioni come 199>88 e 199>76, che hanno abbondanze relative, rispetto alla transizione 199>102, piuttosto alte nel caso della BMAA e non sono presenti nel caso del 2,4-DAB, e la transizione 119>101 tipica proprio del 2,4-DAB (Faassen *et al.*, 2009; Combes *et al.*, 2013). Ragionamenti analoghi sono stati applicati anche per la distinzione tra BMAA e 2,4-DAB dopo derivatizzazione (Banack *et al.*, 2010).

Per quel che concerne la cromatografia sono state testate colonne con impaccamenti diversi ma i tempi di ritenzione più alti sono stati ottenuti con colonne HILIC (cromatografia liquida ad interazione idrofilica), con gruppo funzionale zwitterionico (tipo ZIC-HILIC, SeQuant AB, Sweden). L'utilizzo di questo tipo di fase stazionaria, che spesso porta ad una efficienza della colonna più bassa e picchi più larghi e meno risolti, è giustificato dal fatto che in questo modo si garantisce una buona separazione della BMAA dal suo isomero strutturale 2,4-DAB, soprattutto quando le analisi vengono effettuate senza derivatizzazione. I composti derivatizzati con AQC invece, essendo meno polari, vengono sufficientemente separati anche con la più tradizionale cromatografia a fase inversa (Banack *et al.*, 2010).

La fase mobile è in genere costituita da acetonitrile:acqua con 0.1% di acido formico (65:35) (Nordic Council of Ministers, 2007) o da gradienti sempre degli stessi solventi (Faassen *et al.*, 2009).

Per una identificazione più precisa è consigliabile solubilizzare gli standard di calibrazione negli stessi solventi dei campioni. Nel caso quindi dell'analisi separata della BMAA libera e legata, a meno che i campioni non siano stati purificati tramite SPE, è bene costruire due rette distinte, una in TCA e una in HCl. Faassen *et al.* (2009) hanno infatti rilevato che i tempi di ritenzione cambiano in funzione del solvente utilizzato; i tempi di ritenzione in TCA risultano essere più brevi di quelli in HCl.

C3.6. Cilindrospermopsine

C3.6.1. Introduzione

Le cilindrospermopsine (CYN) appartengono alla classe degli alcaloidi guanidinici; sono state riportate in letteratura per la prima volta nel 1980 (Byth, 1980). Il gruppo consiste di almeno tre congeneri (Figura C3.5): cilindrospermopsina (CYN, PM = 415 Da), 7-epi-cilindrospermopsina (7-epi-CYN, PM = 415 Da) e deossi-cilindrospermopsina (deossi-CYN, PM = 399 Da).

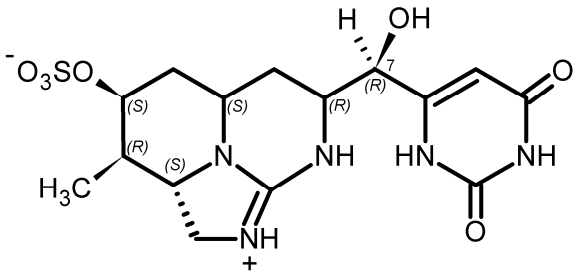


Figura C3.5. La struttura della CYN. La variante *7-epi*-CYN ha configurazione invertita in posizione 7, mentre la variante deossi-CYN possiede, sempre in posizione 7, un idrogeno al posto del gruppo idrossile

La CYN ha picco di assorbimento massimo a 262 nm (ε = 9800) e rotazione specifica $[\alpha]_D$ pari a +17.0° (Sano *et al.*, 2008).
A differenza delle microcistine, la frazione extracellulare di CYN è generalmente maggiore di quella intracellulare (Norris *et al.*, 2001; Wormer *et al.*, 2009).

La CYN disciolta in acqua pura è stabile a valori di pH compresi tra 4 e 10, ed è resistente al riscaldamento. Tuttavia, viene degradata rapidamente nelle colture esposte alla luce (tempo di dimezzamento pari a 1,5 ore) (Chiswell *et al.*, 1999; Nicholson & Burch, 2001).

Esiste in commercio lo standard analitico solo per il congenere CYN. Di conseguenza solo per questa molecola i metodi di analisi possono essere validati. Occorre mettere in evidenza che la stretta analogia strutturale tra CYN e 7-epi-CYN fa sì che tutti i metodi di analisi messi a punto per la prima sono in grado di rilevare anche la seconda.

In Tabella C3.5 vengono proposti dei metodi di riferimento con le relative performance.

Tabella C3.5. Metodi di analisi per le cilindrospermopsine

Tipo di matrice	Pre-trattamento/estrazione	Purificazione	Metodo di rivelazione	LoD	Riferimento bibliografico
Muscolo pesce	acetonitrile/acqua (70/30) 0,05% acido acetico	estrazione liquido-liquido con esano; SPE	RP-HPLC-MS/MS	0,60 ng/g	Gallo *et al.*, 2009
Acqua non filtrata	Sonicazione di campione acidificato e congelato/scongelato	SPE (carbone grafitizzato)	RP-HPLC-MS/MS	0,5 µg/L	Guzmán-Guillén *et al.*, 2012
Acqua	Filtrazione (0,22 µm) + acidificazione	SPE (carbone grafitizzato)	RP-HPLC-PDA	0,2 µg/L	Wormer *et al.*, 2009
	filtrazione	nessuna	RP-HPLC-MS/MS	0,3 µg/L (LOQ)	Bogialli *et al.*, 2006b
Cianobatteri	Liofilizzazione + estrazione con miscela acida acqua/acetonitrile	nessuna	HILIC-HPLC-MS/MS	0,3 pmol injected	Dell'Aversano *et al.*, 2004

RP-HPLC-MS/MS: reversed phase HPLC-MS/MS
HILIC: Hydrophilic interaction liquid chromatography

C3.6.2. Analisi di campioni di acqua

La frazione disciolta può essere determinata per analisi diretta dell'acqua con metodi LC-UV/Vis (ma con scarsa sensibilità: Metcalf *et al.* (2002) riportano LoD pari a 400 µg/L) o LC-MS (Bogialli *et al.*, 2006b). Un passaggio preliminare di estrazione e purificazione, come riportato di seguito, consente di ottenere migliori performance analitiche.

C3.6.2.1 Estrazione e purificazione

La CYN può essere efficacemente estratta, purificata e concentrata da matrici acquose utilizzando protocolli di SPE. In letterature sono riportati vari esempi di tecniche SPE (Gallo *et al.*, 2009; Kubo *et al.*, 2005; Metcalf *et al.*, 2002). Il metodo piú efficace sembra comunque essere quello che utilizza cartucce SPE di tipo "a carbone grafitizzato" (Guzman-Guillen *et al.*, 2012; Harada *et al.*, 1994; Wormer *et al.*, 2009). Il metodo sviluppato da Wormer *et al.*, (2009) sembra essere quello più efficace: il campione di acqua da analizzare viene acidificato e addizionato di NaCl prima di essere caricato in colonna; l'eluizione viene effettuata con miscela di metanolo e diclorometano; la soluzione ottenuta viene infine evaporata a secchezza e ricostituita con acqua, acidificata e quindi sottoposta ad analisi.

Per l'estrazione delle CYN dalla biomassa algale, si effettua una estrazione dalla biomassa preventivamente sottoposta ad un ciclo di congelamento/scongelamento (oppure ad un ciclo di liofilizzazione). Il solvente migliore da impiegare è generalmente considerata l'acqua contenente il 5% di acido formico (Törökné *et al.*, 2004). In alternativa di può usare l'acido acetico. Un passaggio di purificazione dopo l'estrazione è consigliabile.

C3.6.3 Analisi di tessuti

L'estrazione della CYN dai tessuti animali (pesci, molluschi, ecc.) viene effettuata trattando il campione biologico congelato/scongelato (o liofilizzato) con miscele acqua/acetonitrile contenenti acido formico e sonicando. Successivamente si effettua una estrazione con esano per allontanare i lipidi; infine si effettua una purificazione SPE (Gallo *et al.*, 2009).

C3.6.4. Metodi di rivelazione

La CYN viene generalmente analizzata con metodi chimico-fisici basati sulla cromatografia liquida accoppiata a diversi tipi di rivelatore (di assorbimento molecolare o di massa).

I metodi LC-UV/Vis sono applicabili nella analisi delle CYN. Essi sfruttano il massimo di assorbimento a 262 nm delle tossine. In letteratura sono riportati vari esempi (Metcalf *et al.*, 2002; Welker *et al.*, 2002; Wormer *et al.*, 2009) di cromatografia a fase inversa per la quantificazione della CYN; essi utilizzano gradienti binari di acqua e metanolo acidificati. Gli svantaggi dei metodi LC-UV/Vis stanno nella bassa sensibilità e nella bassa specificità, soprattutto con matrici complesse.

I metodi LC-MS consentono di raggiungere limiti di rilevabilità e specificità di gran lunga migliori. I metodi descritti in letteratura prevedono una separazione cromatografica in fase inversa (es. Bogialli *et al.*, 2006b) oppure in HILIC (es. Dell'Aversano *et al.*, 2004; Cerasino & Salmaso, 2012) e la determinazione con spettrometro di massa. In base al tipo di spettrometro di massa, possono essere monitorati: *i)* gli ioni molecolari delle tossine (*m/z* 416 per CYN e 7-epi-CYN, *m/z* 400 per deossi-CYN; *ii)* le transizioni 416/194, 416/176, 416/336 per CYN e 7-epi-CYN, e 400/194, 400/176, 410/336 per deossi-CYN.

Bibliografia

Aranda-Rodriguez R, Kubwabo C, Benoit FM. Extraction of 15 microcystins and nodularin using immunoaffinity columns. *Toxicon* 2003;42:587-99.

Banack SA, Downing TG, Spácil Z, Purdie EL, Metcalf JS, Downing S, Esterhuizen M, Coddd GA, Cox PA. Distinguishing the cyanobacterial neurotoxin β-N-methylamino-l-alanine (BMAA) from its structural isomer 2,4-diaminobutyric acid (2,4-DAB). *Toxicon* 2010;56:868-79.

Barco M, Lawton LA, Rivera J, Caixach J. Optimization of intracellular microcystin extraction for their subsequent analysis by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr A* 2005;1074:23-30.

Beltrán E, Ibánez M, Sancho JV, Hernández F. Determination of six microcystins and nodularin in surface and drinking waters by on-line solid phase extraction–ultra high pressure liquid chromatography tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A* 2012;1266:61-8.

Bogialli S, Bruno M, Curini R, Di Corcia A and Laganà A. Simple and rapid determination of anatoxin-a in lake water and fish muscle tissue by liquid-chromatography–tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A* 2006a;1122:180-5.

Bogialli S, Bruno M, Curini R, Di Corcia A, Fanali C, Laganà A. Monitoring algal toxins in lake water by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Environ Sci Technol* 2006b;40:2917-23.

Byth, S. Palm Island Mystery Disease. *Med J Aust* 1980;2,40-2.

Cerasino L, Salmaso N. Diversity and distribution of cyanobacterial toxins in the Italian subalpine lacustrine district. *Oceanol Hydrobiol St* 2012;41(3):54-63.

Cervantes Cianca RC, Baptista MS, Pinto da Silva L, Lopes VR, Vasconcelos VM. Reversed-phase HPLC/FD method for the quantitative analysis of the neurotoxin BMAA (β-N-methylamino-l-alanine) in cyanobacteria. *Toxicon* 2012;59:379-84.

Chen J, Xie P. Seasonal dynamics of the hepatotoxic microcystins in various organs of four freshwater bivalves from the large eutrophic lake Taihu of subtropical China and the risk to human consumption. *Environ Toxicol* 2005a;20:572-84.

Chen J, Xie P. Tissue distributions and seasonal dynamics of the hepatotoxic microcystins-LR and -RR in two freshwater shrimps, Palaemon modestus and Macrobrachium nipponensis, from a large shallow, eutrophic lake of the subtropical China. *Toxicon* 2005b;45:615–25.

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.

Chiswell RK, Shaw GR, Eaglesham G, Smith MJ, Norris RL, Seawright AA, Moore MR. Stability of Cylindrospermopsin, the toxin from the Cyanobacterium, Cylindrospermopsis raciborskii: effect of pH, temperature and sunlight on decomposition. *Environ Toxicol* 1999;14:155-61.

Christensen SJ, Hemscheid TK, Trapido-Rosenthal E, Laws EA, Bidigare RR. Detection and quantification of b-methylamino-L-alanine in aquatic invertebrates. *Limnol Oceanogr-Meth* 2012;10:891-8.

Cohen SA, Michaud DP. Synthesis of a fluorescent derivatizing reagent, 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate, and its application for the analysis of hydrolysate amino acids via high-performance liquid chromatography. *Anal Biochem* 1993;211(2):27987.

Combes A, El Abdellaoui S, Sarazin C, Vial J, Mejean A, Ploux O, Pichon V. Validation of the analytical procedure for the determination of the neurotoxin β-N-methylamino-l-alanine in complex environmental samples. *Anal Chim Acta* 2013;771:42-9.

Costa IAS, Azevedo SMFO, Senna PAC, Bernardo RR, Costa SM, Chellappa NT. Occurrence of toxinproducing cyanobacteria blooms in a Brazilian semiarid reservoir. *Braz J Biol* 2006;66(1B):211-9.

Cox PA, Banack SA, Murch SJ, Rasmussen U, Tien G, Bidigare RR, Metcalf JS, Morrison LF, Codd GA, Bergman B. Diverse taxa of cyanobacteria produce β-N-methylamino-l-alanine, a neurotoxic amino acid. *P Natl Acad Sci USA* 2005;102:5074-8.

Dell'Aversano C, Eaglesham GK, Quilliam MA. Analysis of cyanobacterial toxins by interaction liquid chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr A* 2004;1028:155-64.

Dimitrakopoulos JK, 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 *Anal Bioanal Chem* 2010;397:2245-52.

Dörr FA, Rodrıguez V, Molica R, Henriksen P, Krock B, Pinto E. Methods for detection of anatoxin-a(s) by liquid chromatography coupled to electrospray ionization-tandem mass spectrometry. *Toxicon* 2010;55:92-9.

EFSA. Scientific Opinion of the Panel on Contaminants in the Food Chain on a request from the European Commission on marine biotoxins in shellfish –saxitoxin Group. *EFSA Journal* 2009;1019:1-76.

Esterhuizen-Londt M, Pflugmacher S, Downinga TG. The effect of b-N-methylamino-L-alanine (BMAA) on oxidative stress response enzymes of the macrophyte Ceratophyllum demersum. *Toxicon* 2011;57:803-10.

Faassen EJ, Gillissen F, Zweers HAJ, Luriling M. Determination of the neurotoxins BMAA (β-N-methylamino-L-alanine) and DAB (α-,γ-diaminobutyric acid) by LC-MSMS in Dutch urban waters with cyanobacterial blooms. *Amyotroph Lat Scl Fr* 2009;10(s2):79-84.

Faassen EJ, Gillissen F, Lürling M. A comparative study on three analytical methods for the determination of the neurotoxin BMAA in cyanobacteria. *PloSone* 2012;7:36667.

FAO. *Marine biotoxins*. Roma: Food and Agriculture Organization of the United Nations; 2004. (FAO Food and Nutrition Paper, vol. 80).

Furey A, Crowley J, Lehane M, James KJ. Liquid chromatography with electrospray ion-trap mass spectrometry for the determination of anatoxins in cyanobacteria and drinking water. *Rapid Commun Mass Sp* 2003;17(6):583-8.

Furey A, Crowley J, Hamilton B, Lehane M, James KJ. Strategies to avoid the mis-identification of anatoxin-a using mass spectrometry in the forensic investigation of acute neurotoxic poisoning. *J Chromatogr A* 2005;1082:91-7.

Gallo P, Fabbrocino S, Cerulo MG, Ferranti P, Bruno M, Serpe L. Determination of cylindrospermopsin in freshwaters and fish tissue by liquid chromatography coupled to electrospray ion trap mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Sp* 2009;23:3279-84.

García C, Bravo MdC, Lagos M, Lagos N. Paralytic shellfish poisoning: post-mortem analysis of tissue and body fluid samples from human victims in Patagonia fjords. *Toxicon* 2004,43:149-58.

Garcia AC, Bargu S, Dash P, Rabalais NN, Sutor M, Morrison W, Walker ND. Evaluating the potential risk of microcystins to blue crab (Callinectes sapidus) fisheries and human health in a eutrophic estuary. *Harmful Algae* 2010;9:134-43.

Geis-Asteggiante L, Lehotay SJ, Fortis LL, Paoli G, Wijey C, Heinzen H. Development and validation of a rapid method for microcystins in fish and comparing LC-MS/MS results with ELISA. *Anal Bioanal Chem* 2011;401:2617-30.

Guzmán-Guillén R, Prieto AI, González AG, Soria-Díaz ME, Cameán AM. Cylindrospermopsin determination in water by LC-MS/MS: optimization and validation of the method and application to real samples. *Environ Toxicol Chem* 2012;31(10):2233-8.

Guzzella L, Ghislanzoni L, Pozzoni F, Cerasino L, Salmaso N. Determinazione di tossine algali (microcistine e nodularina) nelle acque superficiali. *Notiziario dei metodi analitici CNR-IRSA* 2010,1:17-31.

Halme M, Rapinoja ML, Karjalainen M, Vanninen P. Verification and quantification of saxitoxin from algal samples using fast and validated hydrophilic interaction liquid chromatography-tandem mass spectrometry method. *J Chromatogr B* 2012;880:50-7.

Harada K-I, Ohtani I, Iwamoto K, Suzuki M, Watanabe MF, Watanabe M, Terao K. Isolation of cylindrospermopsin from a cyanobacterium Umezakia natans and its screening method. *Toxicon* 1994;32(1):73-84.

Harada KI, Nakano T, Fujii K, Shirai M. Comprehensive analysis system using liquid chromatography-mass spectrometry for the biosynthetic study of peptides produced by cyanobacteria. *J Chromatogr A* 2004;1033:107-13.

Hormazábal V, Østensvik Ø, Underdal B, Skulberg OM. Simultaneous determination of the cyanotoxins anatoxin-a, microcystin-desmethyl-3,lr,rr,and yr in fish muscle using liquid chromatography-mass spectrometry. *J Liq Chrom & Rel Technol* 2000;23(2):185-96.

ISO 20179:2005. *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.

Jaime E, Hummert C, Hess P, Luckas B. Determination of paralytic shellfish poisoning toxins by high performance ion-exchange chromatography. *J Chromatogr A* 2001;929:43-9.

Jiang L, Jhonston E, Abrg KM, Nilsson U, Ilag LL. Strategy for quantifying trace levels of BMAA in cyanobacteria by LC/MS/MS. *Anal Bioanal Chem* 2013;405:1283-92.

Kaas H., Henriksen P. Saxitoxins (PSP Toxins) in Danish lakes. *Wat Res* 2000;34(7):2089-97.

Kubo T, Sano T, Hosoya K, Tanaka N, Kaya K. A new simply and effective fractionation method for cylindrospermopsin analyses. *Toxicon* 2005;46:104-7.

Maizels M, Budde ML. A LC/MS method for the determination of cyanobacteria toxins in water. *Anal Chem* 2004;76:1342-51.

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.

Metcalf JS, Beattie KA, Saker ML, Codd GA. Effect of organic solvents on the high performance liquid chromatographic analysis of the cyanobacterial toxin cylindrospermopsin and its recovery from environmental eutrophic waters by solid phase extraction. *FEMS Microbiol Lett* 2002;216:159-64.

Metcalf JS, Banack SA, Lindsay J, *et al.* Co-occurrence of b-N-methylamino-L-alanine, a neurotoxic amino acid with other cyanobacterial toxins in British waterbodies, 1990–2004. *Environ Microbiol* 2008;10,702-8.

Miles CO, Sandvik M, Haande S, Nonga H, Ballot A. LC-MS Analysis with thiol derivatization to differentiate [Dhb^7]-from [Mdha^7]-Microcystins: analysis of Cyanobacterial blooms, Planktothrix cultures and European crayfish from Lake Steinsfjorden, Norway. *Environ Sci Technol* 2013;4:4080-7.

Molica RJR., Oliveira EJA., Carvalho PVVC, Costa ANSF, Cunha MCC, Melo GL, Azevedo SMFO. Occurrence of saxitoxins and anatoxin-a(s)-like anticholinesterase in a Brazilian drinking water supply. *Harmful Algae* 2005;4:743-53.

Murch SJ, Cox PA, Banack SA, Steele JC, Sacks OW. Occurrence of β-methylamino-l-alanine (BMAA) in ALS/PDC patients from Guam. *Acta Neurol Scand* 2004;110:267-9.

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;42:533-8.

Nicholson BC, Burch MD (Ed.) *Evaluation of Analytical methods for detection and quantification of cyanotoxins in relation to australian drinking water guidelines.* Canberra: National Health and Medical Research Council of Australia, Water Services Association of Australia, Cooperative Research Centre for Water Quality and Treatment; 2001.

Nordic Council of Ministers. *Analysis, occurrence, and toxicity of ß-methylaminoalanine (BMAA). A risk for the consumer?* Copenhagen: Nordic Council of Ministers; 2007. (TemaNord 2007:561).

Norris RLG, Eaglesham GK, Shaw GR, Senogles P, Chiswell RK, Smith MJ, Davis BC, Seawright AA and Moore MR. Extraction and purification of the zwitterions cylindrospermopsin and deoxycylindrospermopsin from Cylindrospermopsis raciborskii. *Environ Toxicol* 2001;16:391-6.

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.

Oshima Y. Postcolumn derivatization Liquid Chromatographic method for Paralytic Shellfish Toxins. *J AOAC Int* 1995;78(2):528-32.

Osswald J, Rellan S, Gago A, Vasconcelos V. Toxicilogy and detection methods of the alkaloid neurotoxin produced by cyanobacteria, anatoxin-a. *Environ Int* 2007;33(8):1070-89.

Pietsch J, Fichtner S, Imhof L, Schmidt W, Brauch H-J. Simultaneous determination of cyanobacterial hepato-and neurotoxins in water samples by ion-pair supported enrichment and HPLC-ESI-MS-MS. *Chromatographia* 2001;54(5-6):339-44.

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. *Anal Chim Acta* 2002;466:213–31.

Ravn H, Anthoni U, Christophersen C, Nielsen PH, Oshima Y. Standardized extraction method for paralytic shellfish toxins in phytoplankton. *J Appl Phycol* 1995;7:589-94.

Rellán S, Osswald J, Vasconcelos V, Gago-Martinez A. Analysis of anatoxin-a in biological samples using liquid chromatography with fluorescence detection after solid phase extraction and solid phase microextraction. *J Chromatogr A* 2007;1156:134-40.

Ríos V, Moreno I, Prieto AI, Puerto M, Gutiérrez-Praena D, Soria-Díaz ME, Cameán AM. Analysis of MC-LR and MC-RR in tissue from freshwater fish (Tinca tinca) and crayfish (Procambarus clarkii) in tench ponds (Cáceres, Spain) by liquid chromatography–mass spectrometry (LC-MS). *Food Chem Toxicol* 2013;57:170-8.

Rosèn J and Hellenäs KE. Determination of the neurotoxin BMAA (β-N-methylamino-L-alanine) in cycad seed and cyanobacteria by LC-MS/MS (liquid chromatography tandem mass spectrometry). *Analyst* 2008;133:1785-9.

Ruiz M, Galanti L, Ruibal AL, Rodriguez MI, Wunderlin DA, Amé MV. First Report of Microcystins and Anatoxin-a Co-occurrence in San Roque Reservoir (Córdoba, Argentina). *Water Air Soil Poll* 2013;224:1593-609.

Rumsby P, Hall T, Pitchers R. *Risk assessment of BMAA*. Swindon: WRc; 2008. (Defra/DWI 7669). Disponibile all'indirizzo: http://dwi.defra.gov.uk/research/completed-research/reports/DWI70_2_226%20BMAA.pdf; ultima consultazione 17/12/2014.

Sangolkar LN, Maske SS, Chakrabarti T. Methods for determining microcystins (peptide hepatotoxins) and microcystin-producing cyanobacteria. *Water Res* 2006;40:3485-96.

Sano T, Kikuchi S, *et al.* New values of molecular extinction coefficient and specific rotation for cyanobacterial toxin cylindrospermopsin. *Toxicon* 2008;51(4):717-9.

Scardala S, Bogialli S, Di Corcia A. Metodi chimici per la rilevazione delle cianotossine. In: 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). p. 30-48.

Shan Y, Shi X, Dou A, Zou C, He H, Yang Q, Zhao S, Lu X, Xu G. A fully automated system with on-line micro solid-phase extraction combined with capillary liquid chromatography–tandem mass spectrometry for high throughput analysis of microcystins and nodularin-R in tap water and lake water. *J Chromatogr A* 2011;1218:1743-8.

Soares RA, Maggalhaes VF, Azavedo SMFO. Accumulation and depuration of microcystins (cyanobacteria hepatotoxin) in Tilapia rendalli (Cichlidae) under laboratory condition. *Aquat Toxicol* 2004;70:1-10.

Spáčil Z, Eriksson J, Jonasson S, *et al.* Analytical protocol for identification of BMAA and DAB in biological samples. *Analyst* 2010;135:127-32.

Spoof LP, 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. *J Chromatogr A* 2003;1020:101-15.

Törökné A, Asztalos M, Bánkiné M, Bickel H, Borbély G, Carmeli S, Codd GA, Fastner J, Huang Q, Humpage A, Metcalf JS, Rábai E, Sukenik A, Surányi G, Vasas G, Weiszfeiler V. Interlaboratory comparison trial on cylindrospermopsin measurement. *Anal Biochem* 2004;332(2):280-4.

Triantis T, Tsimeli K, Kaloudis T, Thanassoulias 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.

Tsuji K, Naito S, Kondo F, Watanabe MF, Suzuki S, Nakazawa H, Suzuki M, Shimada T, Harada K-I. A clean-up method for analysis of trace amount of microcystin in lake water. *Toxicon* 1994;32:1251-9.

Welker M, Bickel H, Fastner J. HPLC-PDA detection of cylindrospermopsin-opportunities and limits. *Water Res* 2002;36:4659-63.

Welker M, Brunke M, Preussel M, Lippert M, von Döhren H. Diversity and distribution of Microcystis (Cyanobacteria) oligopeptide chemotypes from natural communities studied by single-colony mass spectrometry. *Microbiology* 2004;150:1785-96.

Wormer L, Carrasco D, Cirés S, Quesada A. Advances in solid phase extraction of the cyanobacterial toxin cylindrospermopsin. *Limnol Oceanogr-Meth* 2009;7:568-75.

Zurawell RW, Chen HR, Burke JM, Prepas EE, Hepatotoxic cyanobacteria: A review of the biological importance of microcystins in freshwater environments. *J Toxicol Env Heal B* 2005;8,1:1-37.

C4. ANALISI IMMUNOENZIMATICHE

Mara Stefanelli (a)*, Francesca Caviglia (b)
(a) Dipartimento Innovazioni Tecnologiche e Sicurezza degli Impianti, Prodotti ed Insediamenti Antropici, Istituto Nazionale per l'Assicurazione contro gli Infortuni sul Lavoro, Roma
(b) Dipartimento Provinciale del Verbano Cusio Ossola, Agenzia Regionale per la Protezione Ambientale del Piemonte, Verbania
**m.stefanelli@inail.it*

C4.1. Caratteristiche generali del metodo

L'*Enzyme Linked Immunosorbent Assay* o ELISA è un test immunoenzimatico che si basa sull'interazione antigene/anticorpo per identificare e quantificare una sostanza chimica. Anticorpi selettivi per le cianotossine sono stati creati e incorporati in saggi generalmente semi-quantitativi per determinare la presenza di tossine cianobatteriche (Dörr *et al.*, 2010; Metcalf *et al.*, 2000; Zeck *et al.*, 2001; Yu *et al.*, 2002; Figueiredo *et al.*, 2004).

Il metodo è rapido, relativamente poco costoso e di facile applicazione: permette in poco tempo (da pochi minuti a qualche ora) di determinare piccole concentrazioni di cianotossine (circa 0,1 µg/L nel caso delle microcistine (MC) e in alcuni casi nell'ordine dei ng/L) in campioni d'acqua, organismi e tessuti (Lawton & Edwards, 2008; Sivonen, 2008), sebbene in questi ultimi casi possa esserci una interferenza da parte della matrice. Le metodologie immunoenzimatiche, paragonate ai metodi di rilevazione chimica sono in grado di rilevare la presenza di tossine, indipendentemente dalla disponibilità di standard analitici, caratteristiche che li hanno resi particolarmente utili per lo screening di campioni ambientali.

Il saggio ELISA è usato in una ampia varietà di test di tipo diverso: ELISA competitivo e non competitivo, anche detto a sandwich (Gan & Patel, 2013). Per i test competitivi, maggiore è la concentrazione di antigene (cianotossina), minore sarà il numero di immunocomplessi (cianotossina più anticorpo primario) rilevabili, per cui esiste una proporzionalità inversa tra il segnale registrato (assorbanza) e la concentrazione. Per quelli non competitivi i risultati sono direttamente proporzionali alla concentrazione dell'antigene, legato all'anticorpo che a sua volta non si legherebbe se fosse presente l'antigene nel campione sconosciuto. I saggi di tipo competitivo possono essere a loro volta ulteriormente classificati in diretti e indiretti. Nell'ELISA competitivo di tipo diretto l'anticorpo specifico per la cianotossina è adsorbito sulla superficie dei pozzetti del supporto solido, spesso costituito da una micropiastra ad alta capacità legante. Il campione, nel quale si deve determinare la presenza della cianotossina (antigene libero), e quantità prefissate di un complesso cianotossina-perossidasi (antigene complessato) vengono depositati nei vari pozzetti. Durante la fase di incubazione (circa 1 ora), l'antigene legato compete con l'antigene libero presente nel campione, per i siti di legame degli anticorpi adesi nei pozzetti.

Alla fine del periodo di incubazione, il materiale non reagito viene rimosso grazie ad opportuni lavaggi e la quantità di antigene complessato, legata dagli anticorpi immobilizzati sulla piastra, è quantificata mediante l'aggiunta di un substrato della perossidasi che forma un prodotto colorato (giallo). La reazione viene arrestata mediante l'aggiunta di una soluzione acida (stop solution) e la lettura spettrofotometrica è effettuata a 450 nm: il colore sviluppato è inversamente proporzionale alla concentrazione delle cianotossine nel campione. La quantificazione avviene per confronto/estrapolazione con una curva standard, costruita con la

cianotossina, nella quale si riportano in scala semilogaritmica le concentrazioni di cianotossina vs. % della assorbanza dello standard rispetto alla assorbanza del controllo negativo (%B0).

Nell'ELISA competitivo di tipo indiretto la cianotossina (antigene), generalmente legato ad una proteina carrier come l'albumina di siero bovino, è adsorbita sulla superficie dei pozzetti. Il campione viene addizionato nei pozzetti e successivamente si aggiunge una quantità prefissata di anticorpo specifico per la cianotossina. Durante la fase di incubazione, gli anticorpi in soluzione si ripartiscono tra la cianotossina libera, presente nel campione in analisi, e quella immobilizzata sul suporto solido. Tutto ciò che non ha reagito durante l'incubazione viene successivamente rimosso mediante lavaggi e la quantità di anticorpo legato all'analita specifico nel pozzetto viene quantificata mediante aggiunta di un anticorpo secondario (coniugato con un enzima, frequentemente anche in questo caso una perossidasi) che si lega al primo. In seguito ad una seconda fase di incubazione e ai lavaggi, si aggiunge il substrato, si arresta la reazione e si procede alla lettura. Anche in questo caso, la quantità di colore sviluppatosi risulterà inversamente proporzionale alla quantità di cianotossina libera nel campione. In altri tipi di saggi competitivi di tipo indiretto, sulla superficie dei pozzetti sono adesi, invece dellacianotossina, anticorpi in grado di legare anticorpi anti-cianotossina (X). Durante l'esecuzione del test, si aggiunge la soluzione contenente gli anticorpi anti-antigene che si legano agli anticorpi adesi. Con l'aggiunta simultanea del coniugato e del campione (in cui può essere eventualmente presente l'analita libero (X)), si origina la reazione di competizione per i siti anticorpali già vista sopra. Si procede infine ai lavaggi e all'aggiunta del substrato. La reazione viene arrestata mediante una soluzione acida (stop solution), che muta il colore da blu a giallo e la lettura spettrofotometrica è effettuata a 450 nm.

C4.2. Tipologia di ELISA disponibili

Per quanto riguarda il classico saggio ELISA, le reazioni vengono di norma eseguite all'interno di pozzetti di polivinile o polistirene (micropiastra da 12 strip da 8 pozzetti ciascuna per un totale di 96 pozzetti) (Figura C4.1) su cui sono adesi, a seconda dei casi, gli anticorpi specifici per l'antigene di interesse o l'antigene stesso.

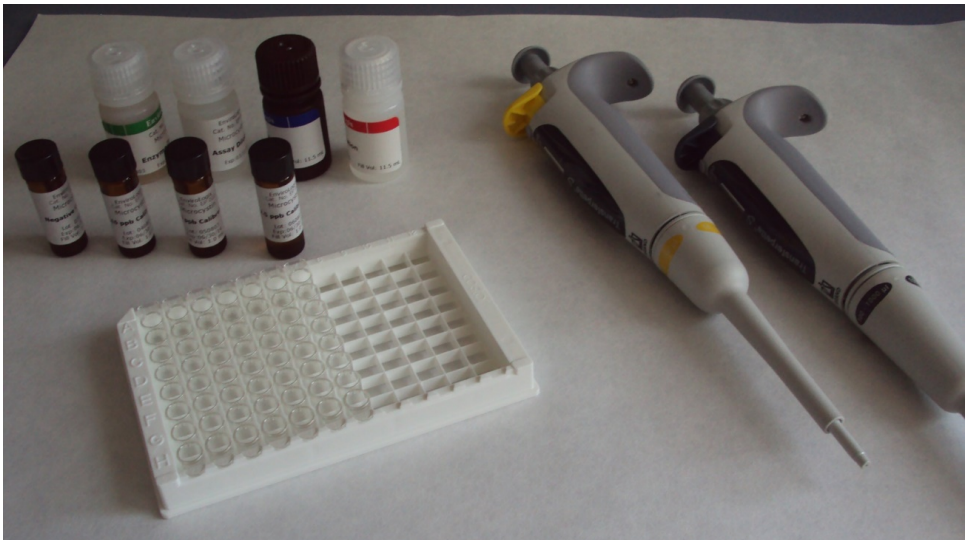


Figura 1. Esempio di micropiastra da 96 pozzetti (foto M. Stefanelli)

All'interno dei pozzetti vengono incubati i campioni da analizzare e gli opportuni reagenti intervallati da lavaggi atti a rimuovere i reagenti in eccesso. Per ultimo si aggiunge il substrato che dà origine al prodotto colorato. La positività è valutata analizzando la comparsa o meno del colore, in seguito alla reazione catalizzata dall'enzima sul substrato.

I kit, commercialmente disponibili sono semplici da usare, a risposta rapida e possono essere utilizzati in laboratorio e in alcuni casi anche su campo (Tabella C4.1).

Tabella C4.1. Kit ELISA per l'analisi delle cianotossine disponibili in commercio e caratteristiche

Saggio ELISA	Anticorpo e antigene target	Applicazione	Range di rivelazione (ppb)	Cross-reattività (%)*	Quantità campione richiesta (µL)	Tempo di analisi (min)
MICROCISTINE (MC)						
Micropiastre						
Competizione diretta	Policlonale-MC-LR	laboratorio	0,16-2,5	MC-LR: 100 MC-RR: 54 MC-LA: 62 MC-YR: 35	20	90
Competizione diretta	Monoclonale-Adda	laboratorio	0,15-5,0	MC-LR: 100 MC-RR: 53 MC-LA: 47 MC-YR: 64	100	110
Competizione indiretta	Policlonale-Adda	laboratorio	0,15-5,0	MC-LR: 100 MC-RR: 90 MC-LA: 124 MC-YR: 78	50	150
Competizione diretta	Policlonale-MC-LR	laboratorio	0,16-1,60	MC-LR: 100 MC-RR: 97 MC-LA: 23 MC-YR: 82	100	90
Competizione diretta	Policlonale-MC-LR	laboratorio	0,1-2,0	MC-LR: 100 MC-RR: 73 MC-LA: 2 MC-YR: 58 MC-LF: 3 MC-LW: 4	50	60
Competizione indiretta	Policlonale-Adda	laboratorio	0,15-5,0	Ottima con tutti i congeneri testati	50	190
Test tube						
Competizione diretta	Policlonale-MC-LR	laboratorio e su campo	0,4-2,5	MC-LR: 100 MC-RR: 40 MC-LA: 54 MC-YR: 46	75	45
Competizione diretta	Policlonale-MC-LR	laboratorio	0,15-5	MC-LR: 100 MC-RR: 87 MC-LA: 3 MC-YR: 48	500	40
Competizione diretta	Policlonale - MC-LR	laboratorio	0,3 - 5	MC-LR: 100 MC-RR: 73 MC-LA: 2 MC-YR: 58 MC-LF: 3 MC-LW: 4	500	40

segue

continua

Tipo di saggio ELISA	Tipo di anticorpo e antigene target	Applicazione	Range di rivelazione (ppb)	Cross-reattività (%)*	Quantità campione richiesta (µL)	Tempo di analisi (min)
CILINDROSPERMOPSINA (CYN)						
Micropiastre						
Competizione diretta	Policlonale - CYN	laboratorio	0,05-2,0	CYN: 100 Deoxy-CYN: 120	50	75
Competizione diretta		laboratorio	0,1-2,0	CYN: 100	50	90
SAXITOSSINE (STX)						
Micropiastre						
Competizione diretta	Monoclonale - STX	laboratorio	0,02-0,4	STX: 100 Dec-STX: 29 GTX 2-3: 23 GTX-5B: 23 Sulfo GTX 1-2: 2,0 Dec-GTX 2-3: 1,4 NeoSTX: 1,3 Dec-NeoSTX: 0,6 GTX 1-4: < 0,2	50	60
NEOSAXITOSSINE (NEO)						
Micropiastre						
Competizione diretta	Monoclonale - NEO	laboratorio	0,03-1	NeoSTX: 100 STX Dihydrochloride: 11 Dec-STX: < 1 GTX 2-3: < 1 GTX 1-4: < 0,1 Dec-GTX 2-3: 0,4 Dec-NeoSTX: 0,7	100	60
ß-N- METILAMINO-L-ALANINA (BMAA)						
Micropiastre						
Competizione diretta	Monoclonale - BMAA	laboratorio	5-500	BMAA: 100 L-Cysteine hydrochloride: 0,2 L-Glutamic acid: 0,2 L-Aspartic acid: 0,2 y-Aminobutyric acid: 0,02 DL-2,4-Diaminobutyric acid dihydrochloride: 0,01	100	120

* Le diverse varianti di MC vengono indicate con due lettere che identificano quali aminoacidi si ritrovano nelle posizioni variabili 2 e 4.

GTX: Goniautossine (*vedi* paragrafo A2.2.5)

Sotto forma di micropiastre esistono saggi diagnostici per la presenza non solo di microcistine, ma anche di cilindrospermopsina, saxitossine e neosaxitossine. Di recente produzione è anche un saggio per la determinazione della ß-N-Methylamino-L-Alanine o BMAA, per il quale però, sembrerebbe dimostrata la non attendibilità per quanto riguarda l'analisi di campioni ambientali (Fassen *et al.*, 2013).

Per la determinazione delle microcistine sono inoltre disponibili dei kit sotto forma di *Test Tube* e *Strip Test*, che permettono di avere a basso costo risultati, puramente qualitativi, in tempo reale mediante l'uso di un lettore portatile da campo. Risultati semi-quantitativi possono essere ottenuti in laboratorio (mediante l'uso di standard di MC-LR, una delle varianti di MC, *vedi* paragrafo C3.2, e successiva comparazione dei campioni con questo), ma sebbene il principio dei due test sia lo stesso, rispetto allo *Strip Test*, che prevede la lisi cellulare del campione e quindi un'analisi di MC totali, il *Test Tube* non prevede la lisi cellulare, quindi in questo caso le MC trovate saranno riferite esclusivamente alla frazione libera. Inoltre i livelli di MC misurate per lo *Strip Test* (1-10 µg/L) sono riferibili ai limiti per le acque di balneazione, mentre per il *Test Tube* a quelli per le acque potabili (0,5-3 µg/L) (Brylinsky, 2012). Per quanto riguarda questi kit, sono ancora pochi gli studi che ne hanno valutato l'attendibilità con prove di laboratorio, tuttavia, al fine di avere una valutazione del tutto preliminare, questi test sembrano dare risultati abbastanza attendibili sia su campioni ambientali che su colture di laboratorio (Lawton *et al.*, 2010; Arada-Rodriguez & Jin, 2011; Humpage *et al.*, 2012). A prescindere dal tipo di kit che si decide di usare i risultati dovranno, comunque, essere confermati con analisi di laboratorio più specifiche (*vedi* capitolo C3).

I kit possono essere usati in particolare per effettuare analisi su campioni di acqua dolce ma anche per campioni di acque marine, salmastre, estratti algali e acque potabili, previa preparazione degli stessi mediante procedure che vengono riportate nelle specifiche istruzioni.

C4.3. Protocollo di analisi con kit ELISA su micropiastre ed eventuali interferenze

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) compromettendo la qualità delle acque di balneazione. Dal punto di vista dell'analisi del rischio potenziale per la salute è quindi significativo il risultato corrispondente all'analisi del campione tal quale, al fine di rilevare la concentrazione di cianoatossine totali (frazione intracellulari + frazione extracellulari). Nella maggior parte dei protocolli allegati ai kit disponibili in commercio è infatti indicato di dispensare in micropiastra solo il campione tal quale.

C4.3.1 Preparazione del campione

Il campione, prelevato in contenitore in vetro scuro, deve essere conservato in frigorifero a 4±3°C al buio, in quanto la luce potrebbe degradare le tossine eventualmente presenti nel campione, e analizzato, entro 5 giorni dal prelievo; in alternativa i campioni devono essere congelati.

Ciascun kit comprende i seguenti reagenti:
- strip in forma di micropiastra a 96 pozzetti, con anticorpo adeso sul fondo;
- controllo negativo;
- calibratori a diverse concentrazioni (parti per bilione, ppb);

- diluente;
- coniugato;
- substrato;
- soluzione Stop;
- soluzione di lavaggio.

Per effettuare la ricerca di cianotossine con metodo ELISA ciascun laboratorio deve essere dotato di:
- frigorifero a 4±3°C;
- apparato filtrazione per campioni con presenza di particelle (siringa, filtri 0,2 µm);
- pipette graduate tarate a volumi diversi (20 µL, 100 µL, ecc.,) e pipette multicanale;
- agitatore per micropiastre;
- lettore per micropiastre a singola lunghezza d'onda con filtro a 450 nm.

L'analisi prevede la determinazione delle cianotossine totali: la frazione intracellulare (presenti all'interno delle cellule algali) più la frazione extracellulari (disciolta nei campioni di acqua). Per poter analizzare il contenuto totale è quindi necessario lisare tutte le cellule prima di iniziare il test ed è quindi indispensabile possedere un:
- bagno ad ultrasuoni;
- congelatore che raggiunga una temperatura di almeno -20°C.

Le tecniche utilizzate più frequentemente per provocare la totale lisi cellulare sono più cicli (almeno tre) di congelamento/scongelamento e/o la sonicazione. In questi casi è buona norma verificare sempre la reale rottura delle cellule mediante l'uso di un microscopio.

Oggi è anche disponibile un kit specifico per la rapida lisi delle cellule algali (QuikLyse reagent – Abraxis).

C4.3.2 Interferenze e cause di errore

Di seguito viene riportata in tutte le sue fasi la procedura per poter effettuare un saggio ELISA con particolare attenzione alla risoluzione dei punti critici riscontrabili durante l'esecuzione:

- *Fase 1*
  Pima di iniziare il test il kit va mantenuto per almeno 30 minuti a tempertaura ambiente (20-25°C).
  Criticità: bisogna evitare di lavorare a temperature minori di 10°C e maggiori di 30°C.
- *Fase 2*
  Una sub-aliquota (circa 5ml) di campione tal quale, precedentemente agitato, viene prelevata e trattata per provocare la completa lisi cellulare.
  Criticità: verificare la reale rottura di tutte le cellule, se necessario aumentare i cicli di congelamento/scongelamento prima di filtrare il campione; quest'ultimo passaggio è fondamentale per poter eliminare tutti i residui cellulari che potrebbero interferire con il test.
- *Fase 3*
  Nei saggi ELISA i campioni, gli standard e i controlli sono analizzati in doppio (o in triplo) a seconda del kit utilizzato (Tabella C4.2: esempio schematizzato per analisi in micropiastra). Le quantità delle varie soluzioni dipendono dal kit utilizzato e sono ben riportate nelle istruzioni ad esso allegate.

Tabella C4.2. Esempio di schema di analisi in micropiastra da 96 pozzetti

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Contr. Neg.	Camp1	Camp5									
B	Contr. Neg.	Camp1	Camp5									
C	Cal 0.16 ppb	Camp2	Camp6									
D	Cal 0.16 ppb	Camp2	Camp6									
E	Cal 0.6 ppb	Camp3	Camp7									
F	Cal 0.6 ppb	Camp3	Camp7									
G	Cal 2.5 ppb	Camp4	Camp8									
H	Cal 2.5 ppb	Camp4	Camp8									

Contr. Neg. = controllo negativo; Cal. = calibratore o standard; Camp. = campione

Criticità: Durante un'analisi in ELISA la manualità (precisione) dell'operatore è fondamentale per ottenere un risultato accurato. La fase di dispensazione dei campioni, degli standard, dei controlli e del diluente, deve essere effettuata in un periodo di tempo non superiore a 10 minuti per non alterare il legame antigene anticorpo. Infatti è raccomandato analizzare un numero di campioni non troppo elevato: 3 strip, è il numero idoneo da analizzare. Nel caso ci fosse la necessità di analizzare più campioni è fondamentale l'uso di pipette multicanale.

– *Fase 4*
Rispettare tutti i tempi di incubazione, specifici per i diversi KIT utilizzati, ed effettuare correttamente le fasi di lavaggio (se possibile utilizzare una pipetta multicanale e almeno 250 µL di soluzione per ogni pozzetto).
Criticità: se non si possiede un lavapiastre automatico, per evitare interferenze, si raccomanda di eliminare il più possibile i residui di soluzione di lavaggio, capovolgendo la piastra e picchiettando molto bene su carta assorbente. Nel caso si formino delle bolle d'aria cercare di eliminarle utilizzando ad esempio un piccolo ago di vetro, evitando di toccare il fondo del pozzetto.

– *Fase 5*
L'ultima fase prevede l'aggiunta di un substrato colorato, l'incubazione della piastra al buio, e infine una soluzione di stop.
Criticità: la lettura deve essere effettuata entro 30 minuti dallo stop della reazione.

Di seguito sono riportati in modo schematico due esempi di saggio ELISA (in questo caso per le MC): uno a competizione diretta (Figura C4.2) e uno a competizione indiretta (Figura C4.3) (Testai & Mattei, 2008).

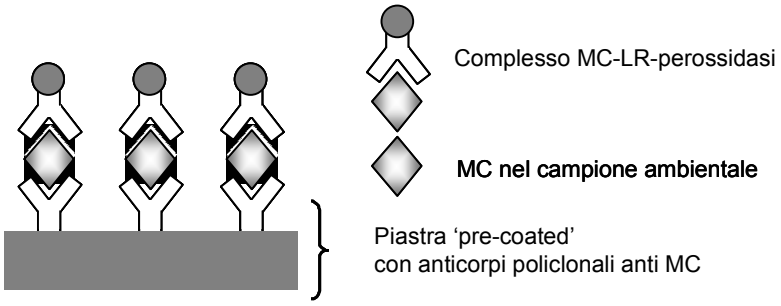


Figura C4.2. Schema di un test ELISA per competizione diretta

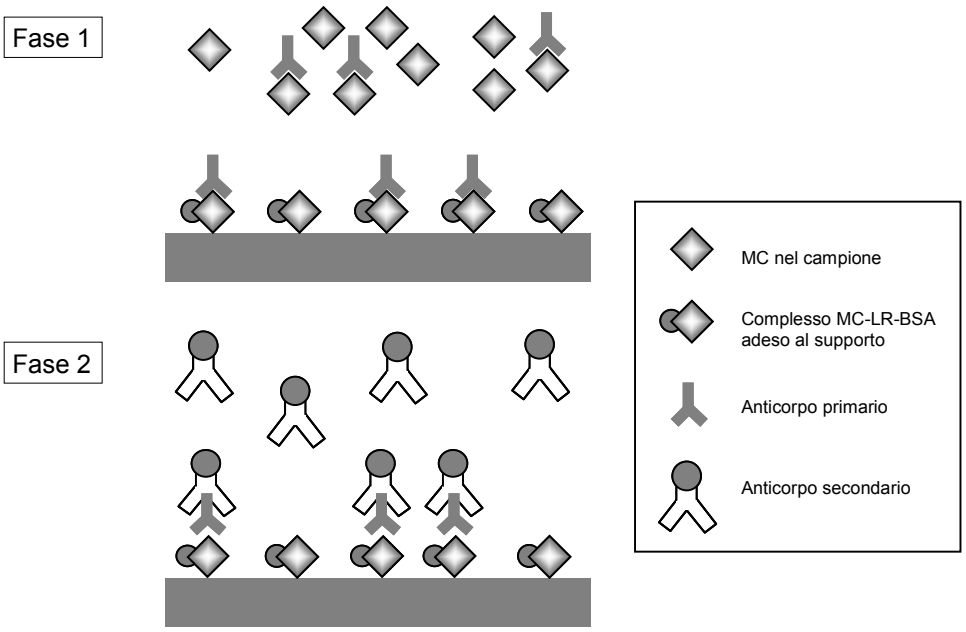


Figura C4.3. Schema di un test ELISA per competizione indiretta

C4.3.3 Quantificazione

Per ogni kit in commercio, nel foglio delle istruzioni, viene spiegata la modalità di calcolo per la quantificazione delle concentrazioni di tossina nei campioni, istruzioni che vanno seguite in modo preciso, e viene sempre riportato un esempio illustrativo della curva standard. La quantificazione avviene per confronto/estrapolazione con quest'ultima.

Di seguito viene riportato un esempio di calcolo. Per la costruzione della curva (Figura C4.4) si riportano i valori %B0 *vs* le concentrazioni di MC-LR, su una scala semilogaritmica, per meglio evidenziare il tratto lineare della curva, entro cui si ha una relazione quantitativa precisa.

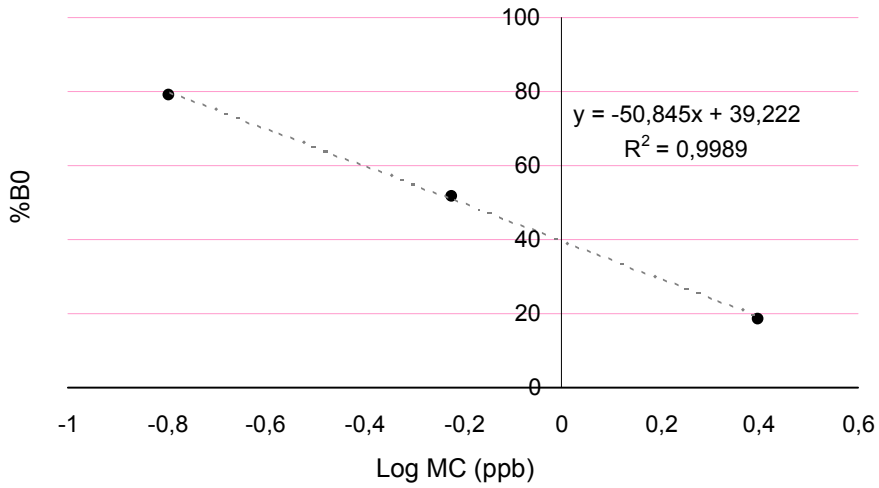


Figura C4.4. Esempio di relazione lineare tra il logaritmo della concentrazione di MC-LR e la %B0

%B0 è data dal rapporto fra la media della densità ottica (OD, *Optical Density*) o assorbanza degli standard (Tabella C4.3) o campioni (Tabella C4.4) e la media della densità ottica del controllo negativo. Il controllo negativo è dato da una soluzione non contenente MC-LR, il cui valore di % B0 corrisponde al valore massimo (100%) di densità ottica, essendo l'anticorpo adeso al supporto completamente saturato dal complesso MC-LR perossidasi (Carmichael & An, 1999).

Affinché il test ELISA sia valido il %CV [coefficiente di variazione = (deviazione standard / media) × 100] delle misure di densità ottica degli standard non deve superare il 10%.

Tabella C4.3. Calcolo di %B0 per gli standard

Concentrazione standard (ppb)	OD (450 nm)		Media OD	%CV	%B0
0 (controllo negativo)	1,23	1,21	1,22	1,16	100,00
0,16	0,97	0,96	0,96	0,73	79,06
0,60	0,62	0,64	0,63	2,24	51,64
2,50	0,24	0,21	0,23	9,43	18,69

OD: densità ottica; CV: Coefficiente di variazione; %B0: media della densità ottica degli standard o dei campioni rispetto alla media della densità ottica del controllo negativo.

Tabella C4.4. Calcolo di %B0 per i campioni

Campione	OD (450 nm)		Media OD	%CV	%B0
#1	1,139	1,166	1,15	1,66	94,47
#2	0,473	0,400	0,44	11,83	35,78
#3	0,054	0,048	0,05	8,32	4,18
#4	0,048	0,051	0,05	4,29	4,06
#5	0,053	0,051	0,05	2,72	4,26
#6	0,048	0,054	0,05	8,32	4,18

OD: densità ottica; CV: Coefficiente di variazione; %B0: media della densità ottica degli standard o dei campioni rispetto alla media della densità ottica del controllo negativo.

Affinché il test ELISA sia valido il %CV delle misure di densità ottica dei campioni analizzati non deve superare il 15%.

La curva deve essere costruita utilizzando un numero adeguato di punti in modo tale da avere un tratto lineare ampio ben definito.

Partendo dall'equazione della curva di Figura C4.4:

$$y = -50{,}845x + 39{,}222$$

si calcola la x (Tabella C4.5), che corrisponde al logaritmo della concentrazione, in questo esempio, di MC nel campione:

$$x = (39{,}222 - y)/50{,}845$$

La concentrazione in ppb (o µg/L) sarà quindi: 10^X.

Per una corretta estrapolazione il dato di assorbanza del campione deve cadere nel tratto lineare della curva standard (in questo esempio tra 0,16 e 2,50 ppb) e non agli estremi, dove la risposta non è più proporzionale alla concentrazione.

Tabella C4.5 Calcoli per determinare la concentrazione di MC nei campioni

Campione	x	10^x (ppb)	Note
#1	-1,09	0,08	Valore <0,16 = campione negativo
#2	0,07	1,17	Valore accettabile
#3	0,69	4,89	Valori >2,50 = misure da ripetere dopo diluizione dei campioni
#4	0,69	4,92	
#5	0,69	4,87	
#6	0,69	4,89	

I valori di MC che sono al di sotto della concentrazione minima di standard (in questo caso 0,16ppb), devono essere considerati negativi; quelli che risultano superiori alla concentrazione massima di standard (2,5ppb), devono essere diluiti, ed il test deve essere ripetuto, tenendo conto del fattore di diluizione per il calcolo della concentrazione finale di tossina.

C4.3.4. Affidabilità, sensibilità e utilità del metodo: quando applicarli

Questo metodo determina solo la concentrazione totale di cianotossine in un campione e non identifica i diversi isomeri così come non stima la tossicità (Lawton *et al.*, 2010). An & Carmichael (1994) hanno dimostrato che alcuni congeneri di microcistine non sono rilevati o lo sono con scarsa efficienza. La valutazione della cross-reattività di un certo numero di microcistine usando un tipico test ELISA ha mostrato una bassa correlazione tra la reattività e la tossicità acuta, il che indica una possibile sottostima della concentrazione di alcune varianti di microcistine (Triantis *et al.*, 2010). L'affidabilità e la sensibilità di un test ELISA dipendono essenzialmente dalla natura dell'anticorpo e dalla sua cross-reattività con i vari congeneri e con suoi analoghi, inclusi i coniugati. Una scarsa cross-reattività dell'anticorpo utilizzato, come avviene quando si usano anticorpi monoclonali molto specifici, può dare informazioni accurate su uno specifico congenere, ma ovviamente questa caratteristica è poco utile se lo scopo del test è lo screening. Infatti, per sapere se campioni ambientali siano o meno contaminati da cianotossine, indipendentemente dal congenere, è auspicabile la massima cross-reattività possibile. È quindi fondamentale conoscere con esattezza le caratteristiche del kit a disposizione, per capire se risponde o meno alle esigenze dello sperimentatore e soprattutto per dare la giusta interpretazione ai risultati ottenuti. Dal punto di vista dello screening, potrebbe sembrare un vantaggio avere una elevata cross-reattività attraverso lo sviluppo di un pool di anticorpi contro una miscela di congeneri, in grado di riconoscere come apteni parti diverse della molecola: purtroppo la fluttuazione nella risposta immunitaria può causare variazioni notevoli nella proporzione relativa dei vari anticorpi, anche quando ottenuti in tempi diversi dallo stesso animale, per cui il livello di cross-reattività e la risposta non sono riproducibili tra batches diversi di antisiero e questa possibilità non è quindi praticabile (Mc Elhiney & Lawton, 2005).

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

I test ELISA disponibili non sono in grado di discriminare tra molecole parentali, prodotti di degradazione e coniugati che però hanno tossicità minore. Ad esempio il kit per le MC, avendo l'Adda (acido-3-ammino-9-metossi-2,6,8-trimetil-10-fenildeca-4(*E*),6(*E*)-dienoico), comune a tutte le varianti, come sito di riconoscimento per il legame è diagnostico anche per i vari prodotti di degradazione ambientale che contengano tale amminoacido, indicativi comunque della presenza di contaminazione, e per i coniugati con glutatione e cisteina prodotti dalla detossificazione delle MC ad opera delle glutatione S-trasferasi (Kondo *et al.*, 1996; Metcalf *et al.*, 2002).

Questo aspetto è particolarmente rilevante per l'interpretazione di dati in termini di valutazione tossicologica, perché l'impossibilità di distinguere la tossina dai prodotti di detossificazione porta automaticamente ad una sovrastima della concentrazione e della potenziale tossicità del campione.

Sia il tipo di strumentazione disponibile nei singoli laboratori che la disponibilità degli operatori sono requisiti fondamentali per la scelta e l'uso dei metodi di screening da poter utilizzare. Il saggio ELISA è sicuramente idoneo per le analisi di screening delle cianotossine essendo sufficientemente sensibile e capace di determinare, anche se con capacità di responso differente, diverse varianti di cianotossine. Questo tipo di analisi, che permette di avere risposte veloci e cautelative dal punto di vista della protezione della salute dell'uomo, può quindi essere usato come azione di primo livello. È fondamentale, per avere delle valutazioni più accurate e precise, utilizzare tecniche analitiche o combinazioni di tecniche più complesse (Triantis *et al.*, 2010).

C4.4. Altri kit per l'analisi di anatossina-a

Oggi per l'analisi della anatossina-a in campioni d'acqua dolce è disponibile il *Receptor-Binding Assay* o RBA (Abraxis). La procedura di analisi è molto simile al saggio ELISA, ma si basa sull'affinità dell'anatossina-a per i recettori nicotinici dell'acetilcolina (nAChRs) piuttosto che sull'uso di anticorpi specifici. Il kit è in grado di determinare concentrazioni comprese tra 10-500 ppb (µg/L) di anatossin-a, con una LoD (*Limit of Detection*) di 10 ppb; si presenta sotto forma di micropiastra da 96 pozzetti, richiede 100µL di campione, incubazioni sia a 37°C che a temperatura ambiente e circa 3ore e 30min per essere effettuato. Per evitare la degradazione dell'anatossina-a, oltre che mantenere un pH basso, bisogna non esporre il campione alla luce diretta.

Bibliografia

An J, Carmichael WW. Use of a colorimetric protein phosphatase inhibition assay and enzyme linked immunosorbent assay for the study of microcystins and nodularins. *Toxicon* 1994;32(12):1495-1507.

Aranda-Rodriguez R, Jin Z. *Evaluation of field test kits to detect microcystins: 2010 study. Final Report.* Ottawa: Exposure and Biomonitoring Division Health Canada; 2011.

Brylinsky M. *Evaluation of two test kits for measurement of microcystin concentrations.* Halifax: Nova Scotia Department of Environment; 2012.

Carmichael WW, An J. Using an Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) and a Protein Phosphatase Inhibition Assay (PPIA) for the detection of microcystins and nodularins. *Nat Toxins* 1999;7:377-85.

Dörr FA, Pinto E, Soares RM, Feliciano de Oliveirae Azevedo SM. Microcystins in South American aquatic ecosystems: occurrence, toxicity and toxicological assays. *Toxicon* 2010;56:1247-56.

Faassen EJ, Beekman W, Lürling M. Evaluation of a commercial Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) for the determination of the neurotoxin BMAA in surface waters. *Plos One* 2013;8(6):1-7.

Figueiredo DR, Azeiteiro UM, Esteves SM, Gonçalves FJM, Pereira MJ. Microcystin producing blooms - a serious global public health issue. *Ecotoxicol Environ Saf* 2004;59:151-63.

Gan SD, Patel KR. Enzyme Immunoassay and Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *J Invest Dermatol* 2013;133:1-3.

Humpage AR, Froscio SM, Lau H-M, Murphy D, Blackbeard J. Evaluation of the Abraxis Strip Test for Microcystins™ for use with wastewater effluent and reservoir water. *Water Research* 2012;46:1556-65.

Kondo F, Matsumoto H, Yamada S, Ishikawa N, Ito E, Nagata S, Ueno Y, Suzuki M. Detection and identification of metabolites of microcystins formed in vivo in mouse and rat livers. *Chem Res Toxicol* 1996;9:1355-9.

Lawton LA, Edwards C. Conventional laboratory methods for cyanotoxins. *Advances in Exp Biol Med* 2008;619:513-37.

Lawton LA, Chambers H, Edwards C, Nwaopara AA, Healy M. Rapid detection of microcystins in cells and water. *Toxicon* 2010;55:973-8.

Mc Elhiney J, Lawton L. Detection of the cyanobacteria hepatotoxin microcystin. *Toxicol Appl Pharmacol* 2005;203:215-30.

Metcalf JS, Bell SG, Codd GA. Production of novel polyclonal antibodies against the cyanobacterial toxin microcystin-LR and their application for the detection and quantification of microcystins and nodularin. *Water Research* 2000;34(10):2761-9.

Metcalf JS, Beattie KA, Ressler J, Gerbersdorf S, Pflugmac her S, Codd GA. Cross-reactivity and performance assessment of four microcystin immunoassays with detoxication products of the cyanobacterial toxin, microcystin- LR. *J Water Supply Res and T* 2002;51(3):145-51.

Sivonen K. Emerging high throughput analyses of cyanobacterial toxins and toxic cyanobacteria. Cyanobacterial Harmful Algal Blooms: state of the science and research needs. Chapter 24. *Adv Exp Med Bio* 2008;619:547-66.

Testai E, Mattei D. Metodi biologici per la rilevazione delle cianotossine. In: Funari E, Scardala S, Testai E (Ed.). *I cianobatteri potenzialmente tossici: aspetti ecologici, metodologici e valutazione del rischio*. Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2008. (Rapporti ISTISAN 08/6). p.49-57.

Triantis T, Tsimeli K, Kaloudis T, Thanassoulias 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.

Yu FY, Liu BH, Chou HN, Chu FS. Development of a sensitive ELISA for the determination of microcystins in algae. *J Agric Food Chem* 2002;50(15):4176-82.

Zeck A, Weller MG, Bursill D, Niessner R. Generic microcystin immunoassay based on monoclonal antibodies against Adda. *Analyst* 2001;126(11):2002-7.

C5. METODI MOLECOLARI NELLA IDENTIFICAZIONE DI CIANOBATTERI TOSSICI

Susanna Vichi (a)*, Domenico D'Alelio (b)
(a) Dipartimento di Ambiente e Connessa Prevenzione Primaria, Istituto Superiore di Sanità, Roma
(b) Laboratorio di Ecologia ed Evoluzione del Plankton, Stazione Zoologica Anton Dohrn, Napoli
**susanna.vichi@iss.it*

C5.1. Introduzione

La maggior parte dei piani di monitoraggio è basata sulla determinazione della densità cellulare attraverso l'osservazione delle cellule al microscopio, ma questa procedura non permette di discriminare fra individui in grado di produrre cianotossine da quelli non tossici: questi ultimi, infatti, normalmente coesistono all'interno di una comunità planctonica senza presentare alcuna differenza visibile nella morfologia (Sivonen & Jones, 1999).

La conoscenza delle caratteristiche genetiche e dei meccanismi molecolari alla base della biosintesi delle tossine da parte di vari gruppi di cianobatteri ha permesso lo sviluppo di metodologie qualitative e quantitative di biologia molecolare a elevata specificità e versatilità. Le tecniche molecolari sono di rapida esecuzione ed estremamente sensibili, per cui si rivelano particolarmente utili negli studi di monitoraggio ambientale, specialmente quando la concentrazione del microrganismo non sia sufficientemente elevata da poter essere rilevata con i metodi tradizionali.

L'applicazione di tali metodologie ha pertanto trovato largo utilizzo nella ricerca di strategie volte al controllo del fenomeno, per una migliore gestione della qualità delle acque di balneazione e più generalmente destinate al consumo umano. Le metodologie molecolari sono rapide, offrono elevata specificità, consentono il diretto utilizzo del campione ambientale esono estremamente sensibili, per cui si rivelano particolarmente utili negli studi di monitoraggio ambientale, soprattutto nei casi in cui la concentrazione del microrganismo target all'interno di un campione eterogeneo non sia sufficiente da poter essere rilevata con metodi classici (Vichi *et al.*, 2008). L'uso di queste tecniche permette di verificare la presenza di cianobatteri diversi all'interno di una fioritura nella quale una specie sia predominante, di identificare e caratterizzare i cianobatteri da un punto di vista genetico, come pure di quantificare la presenza di individui tossici all'interno di una popolazione o di valutare l'espressione di alcuni geni, in dipendenza delle condizioni ambientali. Questi risultati si ottengono attraverso l'applicazione di metodiche di tipo qualitativo e/o quantitativo, che variano a seconda dell'obbiettivo da raggiungere. In questo capitolo saranno descritte finalità e procedure relative ad alcune delle tecniche più utilizzate.

C5.2. Identificazione e caratterizzazione molecolare dei cianobatteri

I cianobatteri tossici, descritti finora in tre delle quattro categorie dell'inquadramento tassonomico tradizionale (*Chroococcales, Oscillatoriales* e *Nostocales*) sono caratterizzati da

una notevole diversità morfologica, fisiologica e genetica. L'identificazione morfologica dei cianobatteri è subordinata a diversi fattori – tra cui il livello di conoscenze tassonomiche dell'operatore, lo stato fisiologico del ceppo o di conservazione del campione vivo – ed è difficilmente catalogabile secondo criteri predefiniti, anche a condizioni ottimali, a causa del grado di variabilità fenotipica delle singole specie/generi. I metodi molecolari sono più facilmente "standardizzabili", sebbene esistano dei fattori di incertezza anche relativamente al dato genetico, dipendenti dalla plasticità evolutiva tipica dei procarioti, oltre che da errori di PCR e sequenziamento o contaminazione del DNA in studio (questi ultimi fattori intrinseci alla qualità del dato sperimentale). Nell'identificazione tassonomica dei cianobatteri la caratterizzazione molecolare è perciò di particolare importanza. Il beneficio di un approccio morfo-molecolare è essenzialmente quello di avere un metodo standard (molecolare) che può prescindere da quello classico, ma che è complementare.D'altro canto, per loro natura, i cianobatteri sono assai eterogenei anche dal punto di vista genetico, probabilmente ancor più che sul piano fenotipico: ciò ha una inevitabile ricaduta sul processo di definizione di metodi standard per l'identificazione molecolare. A dispetto di una generale divergenza genetica tra generi (individuabile anche con un numero molto limitato di marcatori molecolari), esiste una notevole diversità intra-genere e, ad oggi, non esiste unanime consenso su quali e quanti marcatori molecolari siano necessari per pervenire ad una identificazione non ambigua. Il metodo utilizzato per l'identificazione molecolare va quindi calibrato sul bersaglio da identificare/rilevare, tenendo altresì conto del livello di diversità intrinseca al bersaglio stesso.

Inoltre, è anche importante tenere presente che fare una identificazione su un campione ambientale lasciato 'crescere' per tempi lunghi in laboratorio potrebbe non essere corretto; infatti non sempre l'attribuzione filogeneticaosservata/stabilita *in vitro* è rappresentativa della specie in natura, in quanto la specie si differenzia nel tempo e nello spazio. Per lo sviluppo di metodi molecolari standard è perciò indispensabile isolare, purificare, portare in coltura e mantenere in condizioni di purezza ceppi-tipo, per il tempo necessario allo sviluppo dei metodi stessi. Alla base dello sviluppo di un approccio molecolare, esiste quindi un costo quantificabile in uno sforzo di tipo tradizionale basato su coltivazione, identificazione morfologica e caratterizzazione fenotipica, al quale si aggiungono i costi della strumentazione e dell'expertise genetica necessaria: ma, una volta disponibili in letteratura, i metodi utilizzabili per la caratterizzazione tassonomica di un cianobatterio presente in un campione ambientale possono essere facilmente riprodotti. Conseguentemente, le tecniche molecolari possono essere considerate rapide e relativamente economiche una volta che si disponga della strumentazione e dell'*expertise* necessario.

L'utilità dell'approccio combinato morfo-molecolare è in alcuni casi indispensabile nel riconoscimento e nella caratterizzazione dei cianobatteri tossici, se il morfotipo osservato al microscopio si discosta dallo "standard" normalmente riscontrato. A titolo di esempio, si riporta il recente caso (Yang Liu *et al.*, 2013) in cui alcuni filamenti di cellule cianobatteriche dallo sviluppo tridimensionale elicoidale erano stati inizialmente attribuiti al genere *Arthrospira* (noto anche come *Spirulina*), cianobatterio dalla elevata capacità di crescita in termini di biomassa, caratteristico per la struttura elicoidale delle sue colonie, totalmente innocuo sul piano sanitario e utilizzato a fini alimentari (Vichi *et al.*, 2013). La successiva analisi della porzione 16S dell'rRNA hanno invece rivelato che i ceppi erano associabili ad una morfospecie inedita - mai riportata in precedenza e quindi totalmente ignota-all'interno del genere tossico *Planktothrix* (Yang Liu *et al.*, 2013).

Tradizionalmente, il locus molecolare 16SrRNA (RNA ribosomale 16S) è un marcatore efficace per l'identificazione molecolare dei cianobatteri a livello di genere (*vedi* paragrafi C5.2.2 e C5.2.3), insieme all'analisi dei frammenti genici cpcBA-IGS, ovvero lo spaziatore

genico (IGS) tra le due sub-unità *cpcB* e *cpcA* del ficobilisomache è altamente variabile, e al gene *rpoC1*, che codifica per la subunità γ dell'enzima RNA- polimerasi.

C5.2.1. Preparazione del campione ed estrazione del DNA

Il campione, costituito da un volume d'acqua potenzialmente contaminata da cianobatteri tossici, può essere utilizzato tal quale, oppure concentrato mediante centrifugazione (*Microcystis* a 3000 g, *Planktothrix* a 10000 g) e recupero del pellet, o ancora filtrato e raccolto su filtri in polietersulfone idrofilo o microfibra di vetro. Nella scelta del filtro è necessario avere l'accortezza di controllare che il diametro dei pori sia tale da trattenere le cellule durante la filtrazione; per le forme coloniali, come *Microcystis* spp. ma anche per *Planktothrix* spp. è sufficiente un diametro pari a 0,2 µm. Il campione (sia come filtro che come pellet) può essere conservato a -20°C fino al momento del processamento (Manganelli *et al.*, 2010).

Per l'estrazione del DNA si può ricorrere al metodo standard fenolo-cloroformio (Franche & Damerval, 1988), che prevede una preliminare lisi per shock osmotico e successivo trattamento con proteinasi K, estrazione mediante soluzione fenolo-cloroformio-alcol isoamilico e purificazione della fase acquosa con cloroformio-alcol isoamilico, precipitazione in etanolo, lavaggio e ri-sospensione del DNA. Accanto alle metodiche classiche di estrazione, è oggi ampiamente diffuso l'utilizzo di kit basati sulla tecnologia "*DNeasy*" per l'estrazione del DNA da batteri o organismi vegetali contenenti polimeri complessi come la cellulosa. Questi metodi commerciali, basati generalmente sul principio della cromatografia, o avvalendosi di biglie magnetiche, assicurano in tempi rapidi una resa soddisfacente eliminando l'inconveniente dell'utilizzo di fenolo e cloroformio. Si rimanda ai successivi paragrafi per ulteriori dettagli in merito a metodi di estrazione del DNA e alla loro influenza sulla stima quantitativa di cianobatteri tossici in campioni ambientali.

C5.2.2. Rilevamento a livello di genere

Il moderno sistema tassonomico dei cianobatteri è sempre più basato sulla definizione molecolare dei genotipi vale a dire raggruppamenti con un indice di similarità pari approssimativamente al 95% utilizzando il 16S rRNA quale marcatore standard,, i quali corrispondono grosso modo alla categoria classica "genere". Recentemente, la maggior parte dei generi di cianobatteri "tradizionali" e quelli di nuova istituzione (sulla base di caratteri morfologici selezionati alla luce di revisioni morfologiche ed ecologiche) sono stati "confermati" da metodi molecolari. Tra questi, alcuni taxa coinvolti nella produzioni di tossine come *Cylindrospermopsis*, *Microcystis* e *Planktothrix*; la posizione filogenetica di altri generi comprendenti forme tossiche, come *Aphanizomenon* e *Anabaena*, è risultata meno definita (Rajaniemi *et al.*, 2005).

Per l'identificazione a livello di genere, sono state sviluppate diverse tecniche basate su PCR[3] mirate a ridurre al minimo il numero di *step* analitici, pervenendo comunque ad un accurato livello di identificazione, evitando laboriosi procedimenti di sequenziamento e di analisi di sequenze di DNA.

---

[3] La tecnica classica della PCR (*Polymerase Chain Reaction*) attraverso l'utilizzo di corte sequenze oligonucleotidiche complementari a una porzione della sequenza del gene di interesse, permette l'amplificazione esponenziale del frammento genico oggetto di studio.

[2] La tecnica RFLP (*Terminal-Restriction Fragment Length Polymorphism*) è basata sulla digestione con endonucleasi dei prodotti di PCR. Il trattamento con endonucleasi di restrizione genera un profilo direstrizione caratteristico e spesso diagnostico di una specie (Neilan *et al*., 2002).

Una volta isolato, il DNA dal campione da analizzare si sottopone ad amplificazione mediante l'uso di generici *primer* in grado di rilevare DNA cianobatterico; poiché il prodotto di amplificazione non è sufficiente a discriminare tra i diversi generi, si usa la tecnica nota come *restriction fragment length polymorphism* (RFLP)[2], basata sui loci 16S rRNA e ITS (*Internal Transcribed Spacer*) rRNA. La RFLP su sequenze ITS è stata largamente applicata per l'identificazione di generi di cianobatteri potenzialmente tossici, in quanto la natura stessa di queste regioni ad alta variabilità li rende buoni marcatori negli studi di tassonomia per distinguere ceppi più vicini evolutivamente e quindi con elevati livelli di omologia.

Un esempio è la tecnica di identificazione attraverso ARDRA (*Amplified rDNA Restriction Analysis*), che prevede lo spezzettamento preliminare in diverse sotto-porzioni della molecola di DNA amplificato (ottenuto utilizzando *primer* di PCR universali per cianobatteri) attraverso l'utilizzo di enzimi di restrizione sito-specifici (in particolare gli enzimi AvaII, BanII e TaqI). I frammenti ottenuti sono poi sottoposti a gel-elettroforesi: in base alle diverse dimensioni, migrano con diversa velocità nel campo elettrico generato. Il numero e la dimensione dei segmenti di DNA prodotti consentono di identificare ceppi appartenenti a generi notoriamente tossici come *Phormidium, Aphanizomenon, Limnothrix, Planktothrix, Anabaena* e *Cylindrospermopsis*.

La procedura per identificazione molecolare con RFLP (16S-ARDRA) è di seguito descritta (Valério *et al.*, 2009):

1. *Preparazione della miscela di PCR*
   Le reazioni di PCR sono realizzate in un volume di 50 µL contenente DNA genomico (10-15 ng), PCR buffer (1x), ciascuno dei quattro dNTPs (*deoxynucleotide triphosphates* 0,5 mM), di ciascuno dei due primer (0.25 mM, CYAN106F e CYAN1281R), $MgCl_2$ (2 mM), BSA (0,5 $mgml^{-1}$) eTaq DNA *polymerase* (1 unità). Sequenze dei primer: *forward* CYAN106F, CGGACGGGTGAGTAACGCGTGA (direzione 5'-3'),e *reverse* CYAN1281R, GCAATTACTAGCGATTCCTCC (5'-3').
2. *Amplificazione DNA*
   Si applica il protocollo seguente: 10 minuti di denaturazione iniziale a 95°C, seguita da 35 cicli di denaturazione del DNA-innesco della polimerasi-allungamento della catena, rispettivamente a 94°C per 45 s, 55°C per 45 s e 72°C per 1 min. L'amplificazione viene infine completata con un step finale di 5 min a72°C per consentire la completa estensione del prodotto.
3. *Digestione prodotto di PCR*
   Circa 1 µg di prodotto di PCR (lunghezza 1260 bp), ottenuto come da *step* 1 e 2, viene digerito senza ulteriore purificazione con le endonucleasi di restrizione *AvaII* e *BanII* in reazioni separate secondo le istruzioni indicate dai produttori.
4. *Visualizzazione dei prodotti di restrizione*
   I frammenti vengono separati su gel di agarosio 1,2% (peso/volume). Le diverse combinazioni nelle dimensioni dei prodotti di restrizione sono infine associate ai diversi taxacianobatterici, secondo lo schema in tabella 1.

Il metodo 16S-ARDRA sembra particolarmente efficace nel distinguere sul piano molecolare generi appartenenti a tre diversi raggruppamenti di cianobatteri tossici (Tabella C5.1), vista la differenza di grandezza in termini di paia di basi (o *base pairs*, bp). In particolare, i frammenti di restrizione prodotti dal BanII sul 16S di *Planktothrix* sono nettamente distinti da quelli prodotti dalla stessa endonucleasi per altri generi. Sebbene secondo Valerio *et al.* (2009) tale metodo consentirebbe di discriminare tra taxa anche a livello di specie, in particolare all'interno del genere *Planktothrix*; rimangono delle ambiguità, legate anche al limitato numero di ceppi utilizzati per lo sviluppo del protocollo analitico.

Tabella C5.1. Frammenti di 16S-ARDRA (Amplified rDNA Restriction Analysis) generati con le endonucleasi Ava II e Ban II

Genere	Frammenti 16S-ARDRA (bp)	
	Ava II	Ban II
Chroococcales		
Microcystis aeruginosa	1260	815; 445
Synechococcu snidulans	1260	715; 430; 115
Oscillatoriales		
Limnothrix redekei	630; 630	715; 445; 100
Planktothrix agardhii	1260	665; 420; 175
Planktothrix pseudoagardhii	1260	815; 320; 125
Planktothrix rubescens	1260	640; 490; 130
Phormidium spp.	900; 360	670; 420; 170
Nostocales		
Anabaena flos-aquae	1260	815; 445
Anabaena planctonica	810; 450	815; 445
Aphanizomenon flos-aquae	810; 450	815; 445
Aphanizomenon ovalisporum	1260	715; 445; 100
Cylindrospermopsis raciborskii	1100; 160	715; 430; 115

bp=base pairs

Un protocollo analogo a quello descritto sopra, è stato sviluppato dagli stessi autori prendendo come regione di riferimento l'ITS dell'RNA ribosomiale.

Il protocollo analitico dell'ITS-ARDRA è descritto di seguito (Valério *et al.*, 2009):

1. *Preparazione della miscela di PCR.*
   Le reazioni di PCR sono realizzate in un volume di 50 µL contenente DNA genomico (10-15 ng), PCR buffer (1x), ciascuno dei quattro dNTPs (0,4 mM), ciascuno dei due *primer* (0,5 mM, CYAN106F e CYAN1281R), $MgCl_2$ (2,5 mM), BSA (0,5 mg mL^{-1}) eTaq DNA *polymerase* (1 unità).
   Sequenze dei *primer*: *forward* ITSCYA236F, CTGGTTCRAGTCCAGGAT(5'-3'), e *reverse* ITSCYA225R, TGCAGTTKTCAAGGTTCT (5'-3').
2. *Amplificazione DNA*
   Si applica il protocollo seguente: 6 minuti di denaturazione iniziale a 95°C, seguita da 35 cicli a 95°C per 45 s, 52°C per 45 s e 72°C per 1 min. Step finale di 5 min a 72°C. Il prodotto di PCR viene visualizzato in gel di agarosio 1.2 % (p/v) e la lunghezza è variabile a seconda del genere cianobatterico.
3. *Digestione prodotto di PCR*
   Circa 1 µg di prodotto di PCR, ottenuto come da step 1 e 2, viene digerito senza ulteriore purificazione con l'endonucleasi di restrizione *TaqI*, secondo le istruzioni indicate dal produttore.
4. *Visualizzazione dei prodotti di restrizione*
   I frammenti vengono separati su su gel di agarosio1,2% (p/v). Le diverse combinazioni nelle dimensioni dei prodotti di restrizione sono infine associate ai diversi taxacianobatterici, secondo lo schema in Tabella C5.2.

Oltre ai metodi sopra illustrati, si ricorda che la letteratura offre numerosi altri metodi di rilevamento dotati di buona sensibilità e basati sul riconoscimento molecolare attraverso

l'utilizzo di *primer* discriminanti (Neilan *et al.*, 1997; Kurmayer *et al.*, 2002; Kurmayer & Schober, 2003; Hisbergues *et al.*, 2003; Ostermayer & Kurmayer, 2009; Saker *et al.*, 2009) che permettono la rilevazione di specifici generi di cianobatteri, la cui scelta sarà valutata volta per volta dall'operatore in base alle proprie esigenze sperimentali.

Tabella C5.2. Frammenti di ITS-ARDRA generati con la endonucleasi Taq I

Genere	Amplificato ITS (bp)	Frammenti ITS-ARDRA (bp)
Chroococcales		
Microcystis aeruginosa	Tipo1: 930; 300; 180	ND
	Tipo 2: 470; 300	ND
	Tipo3: 300; 180	ND
Synechococcus nidulans	300	190; 110
Oscillatoriales		
Limnothrix redekei	350; 250	ND
Planktothrix agardhii	220	120; 100
Planktothrix pseudoagardhii	220	100; 90; 30
Planktothrix rubescens	220	120; 100
Phormidium spp.	220	115; 105
Nostocales		
Anabaena flos-aquae	420; 300	ND
Anabaena planctonica	300	160; 95; 45
Aphanizomenon flos-aquae	300	160; 95; 45
Aphanizomenon ovalisporum	315	225; 90
Cylindrospermopsis raciborskii	300; 195	ND

ND, non determinato; bp=*base pairs*

C5.2.3. Rilevamento a livello di specie

Il concetto di specie nei cianobatteri è fonte di dibattito scientifico (Komárek, 2010; D'Alelio & Gandolfi 2012), in quanto si teorizza, in analogia a quanto concettualizzato per i batteri patogeni umani, l'assenza di specie propriamente dette. Si configurerebbe piuttosto l'esistenza di meta-specie in continuo divenire raggruppate all'interno di generi relativamente stabili. Così come per altri organismi procarioti, si è ancora lontani dal descrivere un concetto di specie definitivo per i cianobatteri.

Studi multi-locus condotti su due tra i generi più tossici, nello specifico *Planktothrix* (D'Alelio & Gandolfi, 2012; D'Alelio *et al.*, 2013) e *Microcystis* (van Gremberghe *et al.*, 2011;Tanabe & Watanabe, 2011) hanno mostrato come: i) le entità definite dal punto di vista fenotipico come specie distinte possono in realtà essere meta-popolazioni appartenenti ad un unicum genetico e ii) un singolo morfotipo contiene svariati genotipi estremamente differenziati. Il conseguente flusso genico tra queste meta-popolazioni determina l'ibridazione del loro DNA e una ampia condivisione, da parte di ceppi di specie diverse, di una o più varianti geniche comuni. È pertanto assai difficile associare una singola variante genica ad una singola specie. Per esempio, nel genere *Planktothrix*, è tuttora impossibile associare in maniera univoca varianti geniche del 16S rRNA ad un distinto morfotipo (es. le cosiddette specie *P. rubescens* e *P. agardhii*). Inoltre, uno studio recentemente pubblicato da Tooming-Klunderud e collaboratori (2013) mostra come ceppi di *Planktothrix* identificati come *P. rubescens* (classicamente di colore rosso per la presenza di ficoeritrina) e *P. agardhii* (di colore verde per la presenza di ficocianina) possano scambiarsi intere regioni geniche associate alla produzione di ficoeritrina, modificando in tal modo il corredo pigmentario. Ne consegue la non diretta relazione tra

genotipo e fenotipo e la possibilità che genotipi diversi afferiscano al medesimo genotipo. Il concetto morfologico di specie è pertanto pressoché totalmente dissociato da quello genetico.

Sul piano metodologico, a differenza di quanto riportato nel precedente paragrafo, l'identificazione a livello di specie (o raggruppamenti sub-generici) è ottenibile prevalentemente attraverso il sequenziamento di frammenti di DNA amplificato. La ricerca di marcatori in grado di discriminare in maniera non ambigua a livello di sub-genere cianobatteri tossici è tuttora in corso ed è concentrata prevalentemente sui due generi *Planktothrix* e *Microcystis*. Per quanto riguarda le Nostocales, data l'incerta tassonomia (anche molecolare) dei generi che le compongono, lo stato di avanzamento della ricerca è decisamente inferiore rispetto agli altri due generi. Per quanto attiene *Planktothrix*, uno dei marcatori molecolari recentemente indicati come risolutivi a livello di raggruppamenti di specie o *species-complexes* è il già menzionato *rpoC1*: per esempio, il gruppo di specie formato da *P. rubescens, P. agardhii* e *P. suspensa*diverge in maniera netta dal gruppo formato da *P. pseudoagardhi* e *P. mougeotii* (Lin *et al.*, 2010; D'Alelio & Salmaso, 2011). Questo marcatore a copia singola (a differenza del 16S rDNA), specifico dei cianobatteri e dei cloroplasti delle piante superiori (BergslandandHaselkorn, 1991), mostra una maggiore diversità intra-generica del più frequentemente utilizzato 16SrRNA gene (Palenik & Haselkorn,1992; Palenik, 1994; Haande *et al.*, 2008; Yoshida *et al.*, 2008).

La procedura per l'amplificazione e il sequenziamento dell'*rpoC1* in *Planktothrix* è descritta di seguito (Lin *et al.*, 2010; D'Alelio & Salmaso 2011; D'Alelio & Gandolfi, 2012; D'Alelio *et al.*, 2013):

1. *Preparazione della miscela di PCR*
   Le reazioni di PCR sono realizzate in un volume di 25 µL contenente DNA genomico (ca. 25ng), PCR buffer (1x), dNTPs (0,2 mM), ciascuno dei due *primer* (10 pmol), $MgCl_2$(1.5 mM),Taqpolimerasi (1 unità). Sequenze dei *primer* entro il locus rpoC1: *forward* RPOF, TGGTCAAGTGGTTGGAGA, e *reverse* RPOR, GCCGTAAATCGGGAGGAA.

2. *Amplificazione DNA e purificazione*
   Si applica il protocollo seguente: 5 minuti di denaturazione iniziale a 94°C, seguita da 40 cicli a 94°C per 40 s, 55°C per 50 s e 72°C per2 min. Step finale di 5 min a 72°C. Il prodotto di PCR viene visualizzato in gel di agarosio 1% (peso/volume) e la lunghezza è variabile è di ca. 640 bp. La purificazione del DNA può essere realizzata attraverso l'impiego di kit appositamente ottimizzati (es. il QiaQuick DNA Remove, Qiagen) oppure attraverso la tecnologia di purificazione enzimatica a singolo step(es. la ExoSAP-IT® *for PCR Product Cleanup, Affimetrix*),più rapida, seguendo i protocolli indicati dai produttori.

3. *Sequenziamento*
   Gli stessi *primer* utilizzati per la reazione di amplificazione vengono separatamente usati nelle reazioni di sequenziamento (due, una con il *primer forward* e una con il *primer reverse*). Nel metodo descritto da D'Alelio & Gandolfi (2012) i segmenti ottenuti vengono preparati per il sequenziamentoattraverso la tecnologia BigDye Terminator CycleSequencing (AppliedBiosystems). Dopo purificazione in automatico utilizzando il kit MilliporeMontage SEQ96 SequencingReactionCleanup (Millipore Corporate), i prodotti vengono fatti correre su sequenziatoreautomatico (es. mediante Automated Capillary Electrophoresis Sequencer 3730XL DNA Analyzer (AppliedBiosystems).

4. *Analisi di sequenze*
   I cromatogrammi *forward* e *reverse* vengono assemblati utilizzando un software di analisi di sequenze (es. il ChromasPro). Le sequenze in formato testo di diversi ceppi vengono allineate automaticamente utilizzando un programma per allineamento(es. l'applicazione

ClustalW inclusa nel software BioEdit). Infine, l'identificazione molecolare viene completata attraverso la comparazione delle sequenze derivate con quelle presente in rete attraverso analisi BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) sul portale *National Center for Biotechnology Information* (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi).

Alcuni limiti sono tuttavia da rilevare nell'utilizzo del locus *rpoC1* nell'identificazione di raggruppamenti sub-generici in *Planktothrix*. Dati derivanti da analisi genetiche bioinformatiche su frammenti genici del locus *rpoC1* appartenenti a centinaia di ceppi, suggeriscono che l'evoluzione di questo gene all'interno del dato genere è stata fortemente influenzata da ricombinazione omologa a livello sub-generico (D'Alelio & Gandolfi, 2012). Inoltre, il locus *rpoC1* traccia in maniera efficace i processi ricombinatori avvenuti tra le morfospecie *P. rubescens, P. agardhii e P. suspensa* e, in un clade genetico diverso, tra *P. pseudoagardhii* e *P. mougeotii*. In via semplificata, la ricombinazione omologa fa si che due varianti geniche di tipo A o B generino una terza variante di tipo AB, ibrida tra le prime due ("A", dall'inizio della sequenza al punto di *crossing-over*, e "B", da quest'ultimo alla parte terminale della sequenza). Vista da una diversa prospettiva, la possibilità, tutt'altro che remota, che esistano varianti ricombinanti all'interno di un locus molecolare di un dato genere di cianobatteri tossico, espongono al rischio di associare all'una o all'altra specie "parentale" una terza e sconosciuta specie, a seconda della porzione di locus analizzata.

Un altro marcatore ampiamente indicato per l'identificazione molecolare di specie tossiche è il *cpcBA*-IGS. Questo marker, classicamente utilizzato negli studi di attribuzione filogenetica, può, in alcuni casi, avere una doppia valenza, ed essere sfruttato anche come indicatore del potenziale tossico di una popolazione all'interno del genere *Microcystis*. Infatti, analisi filogenetiche basate sullo studio di sequenze all'interno di questa regione (Tan *et al.*, 2010) hanno mostrato che ceppi di *M. wesenbergii* formano un raggruppamento distinto e separato da ceppi di altre specie all'interno del genere *Microcystis.* Poiché la presenza di *M. wesenbergii* non è mai stata associata alla presenza di microcistine (MC) nelle acque, ne consegue che il rilevamento di una fioritura prodotta da *M. wesenbergii,* in combinazione comunque con l'analisi del classico marcatore di tossicità *mcy* (*vedi* paragrafo C5.3), non desta preoccupazioni dal punto di vista sanitario (Tan *et al.*, 2010).

La procedura per l'identificazione di colonie di *Microcystis wesenbergii* è la seguente (Tan *et al.,* 2010):

1. *Preparazione della miscela di PCR*
   Le reazioni di PCR sono realizzate in un volume di 50 µL contenente DNA genomico (5-10 ng), PCR buffer (1×), dNTPs (0,2 mM), ciascuno dei due *primer* (10 pmol), $MgCl_2$(1,5 mM), Taq DNA polymerase (1 unità). Sequenze dei *primer*: *forward* PCβ-F, TGGCGTAAGCAAAATGAAAGAA (5'-3'), e *reverse* PCα-RRPOF, CGCCCTGGGTTAATTGGGAA (5'-3').
2. *Amplificazione DNA*
   Si applica il protocollo seguente: 5 minuti di denaturazione iniziale a 94°C, seguita da 35 cicli a 94°C per 30 s, 55°C per 30 s e 72°C per1 min. Step finale di 5 min a 72°C. Il prodotto di PCR viene visualizzato in gel di agarosio 1% (peso/volume) e la lunghezza è pari a ca. 680 bp.
3. *Sequenziamento:* come per l'*rpoC1.*
4. *Analsi di sequenze:* come per l'*rpoC1.*

Tuttavia, diverse ambiguità sono scaturite dall'osservazione dell'albero filogenetico di *Microcystis* pubblicato in Tan *et al.* (2010), come ad esempio la presenza di ceppi identificati

come *M. aeruginosa* e *M. flos-aquae* presenti contemporaneamente in cladi distinti e ampiamente separati, e la bassa significatività della divergenza tra *M. wesenbergii* e queste ultime specie, per cui si suggerisce la massima cautela nell'utilizzo della PCR e sequenziamento come unico strumento nell'identificazione di specie tossiche all'interno di questo genere.

C5.3. Stima quantitativa degli individui tossici attraverso qPCR

La stima accurata del numero di cellule tossigeniche all'interno di un campione ambientale mediante PCR quantitativa (*quantitative* PCR, qPCR) durante una reazione di *real time* è un ottimo indicatore del potenziale tossico di una popolazione e può aiutare a comprendere i parametri fisiologici ed ecologici che regolano la produzione delle cianotossine e i fattori che influenzano la dominanza e la variabilità delle specie *in situ* (Pearson & Neilan, 2008). La conoscenza della composizione di una colonia cianobatterica in termini di individui tossici e non tossici permette infatti di studiarne nel tempo l'evoluzione dinamica e di ipotizzare o escludere l'influenza di specifici parametri ambientali in grado di modulare la fitness di determinati genotipi.

Negli ultimi anni la qPCR ha trovato largo impiego nello studio dell'ecologia dei cianobatteri e nello studio delle variazioni spaziali e temporali delle sub-popolazioni tossiche in condizioni naturali (Hotto *et al.*, 2008; Briand *et al.*, 2009; Ha *et al.*, 2009; Rinta-Kanto *et al.*, 2009; Sabart *et al.*, 2010). La concentrazione delle MC nelle acque interessate da fioriture di cianobatteri varia in modo considerevole nel tempo e questo è ascrivibile, almeno in parte, alle diverse proporzioni di sub-popolazioni tossiche e non tossiche che compongono la comunità (Kurmayer *et al.*, 2004). Dai numerosi lavori recentemente pubblicati emerge una composizione genotipica straordinariamente dinamica delle popolazioni cianobatteriche che vivono nei sistemi acquatici, con oscillazioni ampie e repentine delle frazioni di individui tossici e non tossici. In uno studio effettuato su *Microcystis* nel lago Wannsee (Germania) da giugno del 1999 a ottobre del 2000 (Kurmayer & Kutzenberger, 2003) è stato misurato un intervallo della proporzione delle cellule tossiche (*mcyB*) che va da 1,7 al 71,0% delle cellule totali, con una ciclicità stagionale nella proporzione dei genotipi tossici (frazione minima in inverno e massima in estate). Un'ampia variabilità emerge anche da uno studio condotto sulla comunità di *Microcystis* nel lago Erie (USA), con una proporzione dei genotipi tossici (*mcyD*) compresa tra lo 0,3% e la totalità delle cellule presenti. Anche la specie *Planktothrix* è stata caratterizzata in diversi lavori attraverso qPCR, sebbene la letteratura sia in questo caso più scarsa. Nel caso del Lago di Gerosa (Italia) interessato da fioriture di *P. rubescens* (Manganelli *et al.*, 2010) la proporzione stimata di cellule mcyB-positive rispetto alla popolazione totale nel periodo ottobre 2006 – giugno 2007 è compresa tra 31% e il 79% in superficie, e incrementa con la profondità lungo la colonna d'acqua. La frazione di individui tossici aumenta proporzionalmente alla densità di cellule, ad eccezione del periodo di fioritura, in cui è stato rilevato il valore minimo. Una forte variabilità nella composizione genotipica è stata osservata anche nella comunità di *P. rubescens* nel lago di Vico nel periodo da febbraio 2009 a dicembre 2010, con una percentuale di cellule tossiche compresa tra il 9% e il 95% (Scardala *et al.*, 2011), e in 12 laghi delle Alpi (primavera 2006 – autunno 2007), ove la proporzione delle cellule potenzialmente MC-produttrici varia tra il 18 e l'82% (Ostermaier & Kurmayer, 2010). Nel caso di *Planktothrix*, la correlazione tra la densità delle cellule e l'abbondanza di MC rinvenute non è sempre chiara: alcuni autori hanno osservato che la ricorrenza di genotipi-mcy inattivi è linearmente relazionata alla densità di popolazione e che questi mutanti non tossici non siano contro-selezionati durante la transizione

dalla fase pre-fioritura alla fioritura (Ostermaier & Kurmayer, 2009), o in alternativa che intervengano meccanismi di regolazione della trascrizione dell'mRNA che portano a una diminuzione dei livelli di trascritto dei geni *mcy* (Kaebernick *et al.*, 2000), oppure la correlazione tra la densità delle cellule e l'abbondanza di MC riguarda specifici congeneri strutturali (Ostermaier & Kurmayer 2010).

La qPCR, dotata di maggiore sensibilità rispetto alla media dei comuni metodi di analisi chimica basati sulla rilevazione delle tossine (Fortin *et al.*, 2010), permette inoltre di individuare la presenza di cellule tossiche sin dalle fasi più precoci delle fioriture, offrendo un potente strumento nel monitoraggio dei corpi idrici considerati ad alto rischio per la presenza di cianobatteri tossigenici.

La stima quantitativa dei cianobatteri in grado di produrre tossine si basa sul principio che all'interno di una stessa popolazione sono presenti sia individui tossici che non tossici, indistinguibili morfologicamente ma diversi sotto il profilo genetico, per la presenza o meno dei geni che codificano per le tossine. La stima del numero totale di individui viene ottenuta prendendo come riferimento specifiche sequenze marker diagnostiche nell'ambito di ogni phylum: si sfruttano a questo scopo geni universalmente presenti come il *16S rDNA*, o il gene *rpoC1*, oppure geni esclusivamente presenti nei cianobatteri, come lo spaziatore intergenico dell'operone della Ficocianina (PC-IGS) (Garcia-Pichel, 2008; Kurmayer & Kutzenberger, 2003; Rasmussen *et al.*, 2008). La stima delle cellule tossiche viene ottenuta valutando quanti individui, tra quelli rilevati, sono portatori dei geni marker di tossicità (Figura C5.1).

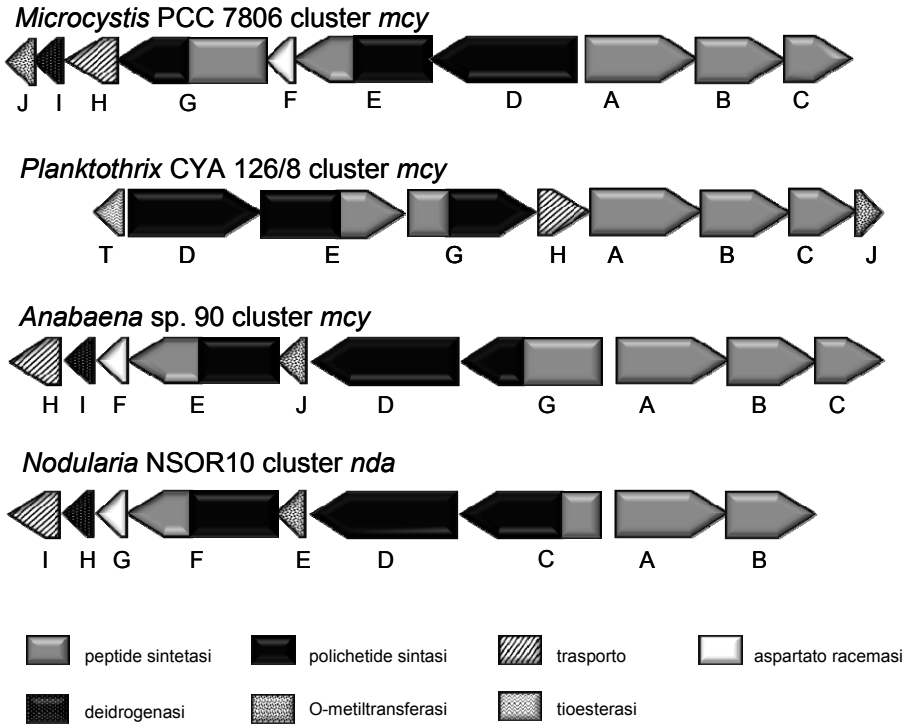


Figura C5.1. Rappresentazione schematica dei cluster microcistinasintetasi (*mcy*) in *Microcystis, Planktothrix* e *Anabaena,* e del cluster nodularinasintetasi (*nda*) in *Nodularia*

Tipicamente, per i cianobatteri produttori di MC come *Planktothrix, Microcystis* e *Anabaena* si ricerca la presenza dei geni appartenenti al cluster *mcy,* che partecipano alla sintesi delle MC attraverso un meccanismo non-ribosomale. Tra questi, *mcyB* e *mcyE* sono considerati marcatori affidabili in quanto la loro presenza correla generalmente con la potenziale epatotossicità dei cianobatteri. Tuttavia, il focus sull'utilizzo dell'operone *mcy* come indicatore di tossicità presenta alcune criticità. In primo luogo, altri marcatori nello stesso operone possono dar luogo a falsi negativi (*mcyA*) o falsi positivi (*mcyT*, *mcyTD*) per la presenza di polimorfismi genetici (Mbedi *et al.*, 2005). Inoltre, l'analisi di un elevato numero di ceppi e campioni ambientali appartenenti a *Microcystis* ha portato a identificare alcuni casi in cui i geni per la sintesi della MC erano presenti, ma l'organismo era incapace di produrne, probabilmente a causa di mutazioni all'interno della estesa macro-regione genica di regolazione (Sivonen, 2008). Anche se meno frequentemente, la qPCR è stata applicata anche allo studio di cianobatteri produttori di nodularina (NOD) e cilindrospermopsina (CYN). Per le cellule NOD-positive appartenenti a *Nodularia* è stato preso a riferimento il cluster che codifica per complesso nodularina sintetasi (generalmente *ndaF*) (Koskenniemi *et al.*, 2007), mentre per i produttori di CYN sono state identificate 2 sequenze coinvolte nella produzione della tossina, con funzione di peptide sintetasi (*ps*) e polichetidesintasi (*pks*), all'interno dei geni *aoaA*, *aoaB*, e *aoaC*, indicatori di tossicità in ceppi di *Cylindrospermopsis raciborskii* e altri produttori di CYN (Rasmussen *et al.*, 2008).

Va sottolineato che una delle maggiori criticità nello sviluppo di protocolli di qPCR consiste nella scelta dei geni da adottare come marcatori, per le difficoltà che possono scaturire nel convertire il numero delle copie dei geni nel numero delle cellule portatrici delle copie: infatti, la presenza di più copie o la presenza di copie alternative all'interno di una stessa specie può condurre a una erronea stima del numero delle cellule.

C5.3.1. Preparazione del campione

Per quanto attiene la preparazione del campione e l'estrazione del DNA, la sua quantificazione e identificazione della purezza non c'è alcuna differenza rispetto all'analisi qualitativa e le alternative sperimentali sono già state presentate; eventuali differenze possono essere evidenti tuttavia nelle fasi successive in cui si utilizzano tecniche molecolari diverse (Figura C5.2).

L'innegabile comodità di metodi basati sulla tecnologia *DNeasy*, rapidi nell'esecuzione, si accompagna a una resa generalmente più bassa rispetto ai metodi di estrazione tradizionali (es. fenolo/cloroformio), ovvero a un ritardo nell'emissione della fluorescenza nella fase esponenziale durante la reazione di *real time* PCR. Tale ritardo, tuttavia, nel caso di *Microcystis* spp. e *Planktothrix* spp. non sembra influenzare la sensibilità dei saggi, per cui l'impiego dei kit si rivela particolarmente utile nelle analisi *high throughput* di screening nei programmi di monitoraggio. Data la forte eterogeneità dei cianobatteri nella composizione polisaccaridica (De Phillipis & Vincenzini, 1998), non si esclude tuttavia che l'impiego dei sistemi di estrazione *DNeasy* possa dar luogo a differenze specie-specifiche nella resa da campioni ambientali (Schober & Kurmayer, 2006). Alcuni autori (Rasmussen *et al.*, 2008) propongono di sottoporre direttamente il campione ambientale tal quale alla reazione di qPCR, irradiando preliminarmente con microonde le cellule in un detergente contenente Triton X-100 e DTT (ditiotreitolo), eliminando la fase di estrazione del DNA. Questo metodo rapido di preparazione si rivela vantaggioso soprattutto nei casi in cui la concentrazione del cianobatteri nel campione sia bassa, in modo da ovviare al problema della perdita di materiale durante il processamento. Tuttavia è opportuno valutarne caso per caso l'applicabilità, sia a causa delle differenze fisiche delle specie cianobatteriche, come la presenza di materiale mucillaginoso sulla superficie esterna della parete cellulare, che rende le cellule diversamente suscettibili al calore, sia alla possibile presenza di contaminanti presenti nel campione che potrebbero disturbare o inibire la reazione di qPCR.

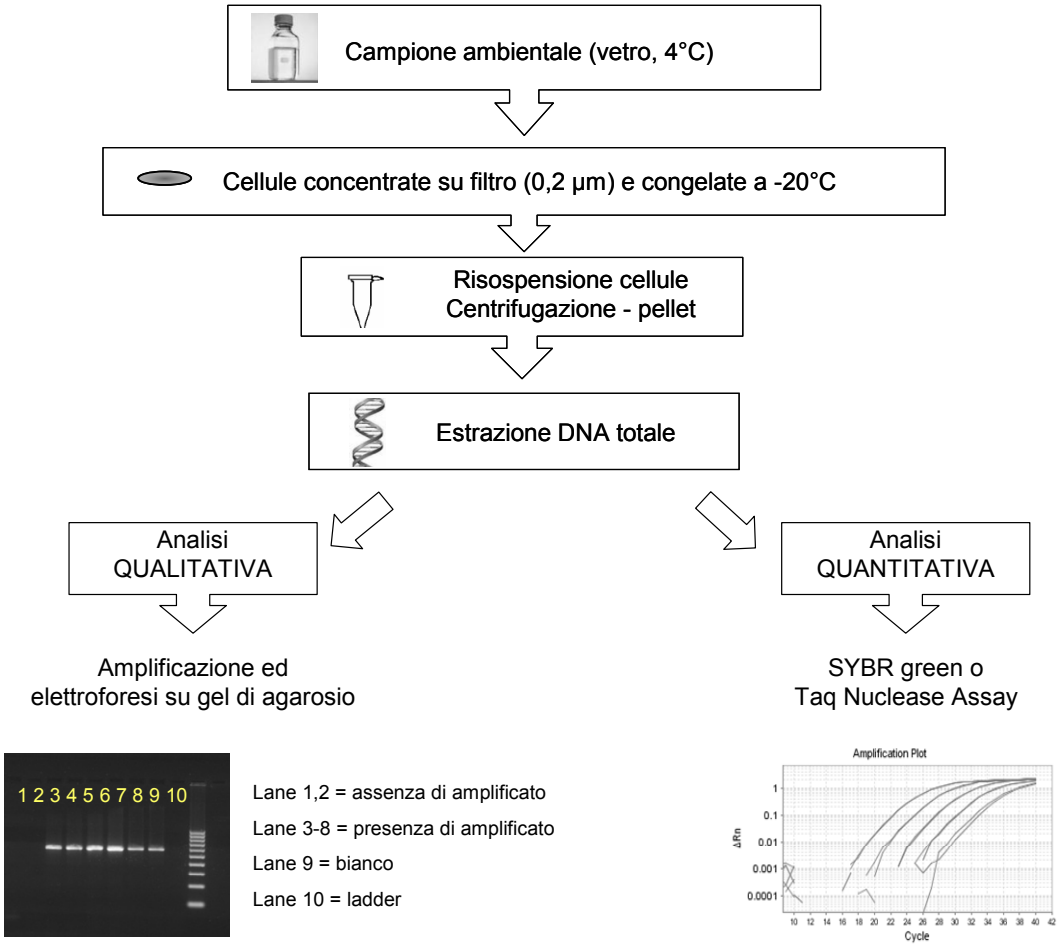


Figura C5.2. Schema della procedura da seguire per testare la presenza di cianobatteri in un campione ambientale attraverso tecniche molecolari

È necessario ricordare che per la messa a punto dei metodi di PCR e la preparazione delle rette standard (*vedi* paragrafo C5.3.2.), fasi indispensabili per la stima quantitativa dei vari genotipi, è necessario l'allestimento di colture standard del cianobatterio dominante la comunità oggetto di studio e di tutti gli altri che possono essere di interesse da un punto di vista tossicologico. La disponibilità di ceppi di controllo positivi e negativi, ovvero tossigenici e non, permette di accertare la specificità di un saggio sviluppato per la quantificazione dei soli genotipi potenzialmente produttori di tossine all'interno di una popolazione.

C5.3.2. *SYBR-green* e *Taq Nuclease Assay*: principi fondamentali e applicazioni nell'ecologia dei cianobatteri

La PCR *real time* si basa sulla rilevazione e quantificazione di un reporter fluorescente, il cui segnale cresce in modo direttamente proporzionale alla quantità di prodotto generato durante la reazione. Registrando l'intensità della fluorescenza emessa ad ogni ciclo, è possibile monitorare

la reazione di PCR durante la fase esponenziale, all'interno della quale il prodotto è strettamente correlato al numero di copie target presenti.

Il ciclo in cui la quantità di fluorescenza comincia ad aumentare velocemente, solitamente alcuni scarti quadratici medi sopra la linea di base, è chiamato il ciclo soglia (*threshold cycle*, o Ct) e corrisponde alla fase log-lineare della reazione. Il Ct è un parametro fondamentale per la quantificazione: infatti, maggiore è la quantità di templato inizialmente presente, minore è il numero di cicli necessari affinché il prodotto arrivi alla fase esponenziale. La pendenza della curva di amplificazione nella fase log-lineare fornisce inoltre una misura dell'efficienza della PCR. Gli agenti fluorescenti più comunemente usati nei saggi di qPCR sono gli agenti intercalanti come il *SYBR-green* e le sonde *Taqman* contenenti un fluoroforo reporter e un quencher (Tabella C5.3).

Tabella C5.3. Alcuni metodi di qPCR sviluppati per lo studio quantitativo di cianobatteri tossici

Gene target		*Primer* e *probe*	Metodo qPCR	Rif.
Microcystis				
Ficocianina	For:	GCTACTTCGACCGCGCC		
	Rev:	TCCTACGGTTTAATTGAGACTAGCC		
	Probe:	CCGCTGCTGTCGCCTAGTCCCTG	TNA	Kurmayer & Kutzenberger, 2003
mcyB	For:	CCTACCGAGCGCTTGGG		
	Rev:	GAAAATCCCCTAAAGATTCCTGAGT		
	Probe:	CACCAAAGAAACACCCGAATCTGAGAGG		
Microcystis, Anabaena				
mcyE	For:	GAA ATT TGT GTA GAA GGT GC	SYBR green	Vaitomaa *et al.*, 2003
	Mic Rev:	CAA TGG GAG CAT AAC GAG		
	Ana Rev:	CAA TCT CGG TAT AGC GGC		
Planktothrix				
16S rDNA	For:	ATCCAAGTCTGCTGTTAAAGA		
	Rev:	CTCTGCCCCTACTACACTCTAG		
	Probe:	AAAGGCAGTGGAAACTGGAAG	TNA	Ostermaier & Kurmayer, 2010
mcyBA1	For:	ATTGCCGTTATCTCAAGCGAG		
	Rev:	TGCTGAAAAAACTGCTGCATTAA		
	Probe:	TTTTTGTGGAGGTGAAGCTCTTTCCTCTGA		
C. raciborskii				
rpoC1	For:	GGCATTCCTAGTTATATTGCCATACTA		
	Rev:	GCCCGTTTTTGTCCCTTTGCTGC		
	Probe:	TCCTGGTAATGCTGACACACTCG	TNA	Rasmussen *et al.*, 2008
pks	For:	CCTCGCACATAGCCATTTGC		
	Rev:	GAAGCTCTGGAATCCGGTAA		
	Probe:	CGGCAGCAACACTCACATCAGT		
Nodularia				
ndaF	For:	GTGATTGAATTTCTTGGTCG	SYBR green	Koskenniemi *et al.*, 2007
	Rev:	GGA AATTTCTATGTCTGACTCAG		

Probes = sonde; For: = Forward; Rev: = Reverse; TNA = Taq Nuclease Assay

I saggi in *SYBR Green*, che hanno il vantaggio di essere più economici, risultano tuttavia generalmente meno specifici, in quanto l'agente intercalante si lega a ogni molecola di DNA a doppio filamento che si forma, indipendentemente che si tratti o meno del target. Tuttavia, l'analisi della curve di *melting* al termine della reazione di amplificazione permette di superare

questo inconveniente, assicurando la specificità del prodotto e rilevando l'eventuale formazione di dimeri di *primer*, in base al principio che ogni amplicone ha una specifica temperatura di *melting* (Tm), che dipende della sua composizione in basi (Figura C5.3).

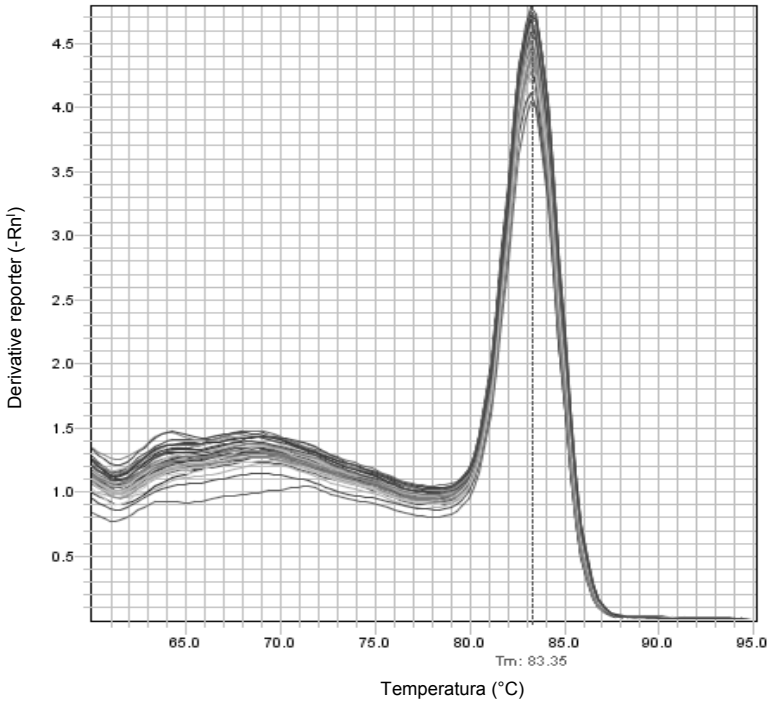


Figura C5.3. Curva di *melting* per l'identificazione del prodotto di amplificazione rispetto a prodotti aspecifici ottenuta attraverso graduale incremento della temperatura fino al superamento del valore Tm dell'amplicone

Per la determinazione quantitativa in *SYBR green* di cianobatteri appartenenti a *Microcystis* e *Anabaena* spp. in campioni ambientali può essere applicato il metodo di Vaitomaa *et al.* (2003), che si avvale dell'utilizzo di *primer* discriminanti localizzati sul gene *microcistina sintetasi E* (*mcyE).* Nel metodo, la stima del numero di copie *mcyE* nel campione ambientale è ottenuta per confronto con la retta standard costruita utilizzando quantità note di DNA estratto da cellule appartenenti a ceppi standard di *Microcystis* e *Anabaena.* Per l'analisi quantitativa di specie di *Nodularia* produttrici di nodularina può essere applicato il metodo in *SYBR green* descritto da Koskenniemi *et al.* (2007), dotato di buona sensibilità, essendo in grado di rilevare la presenza di 30 copie del gene *ndaF* per mL di campione d'acqua. La tecnologia SYBR-green risulta particolarmente utile nei casi in cui non sia possibile identificare una regione sufficientemente conservata, all'interno dell'amplicone generato dai due *primer*, per l'appaiamento di una sonda, o quando la ricerca è diretta verso una classe filogenetica di appartenenza ampia, ad esempio verso tutti i cianobatteri potenzialmente produttori di una classe di tossine. Nel metodo descritto da Al-Tebrineh (2011) la tecnologia della qPCR basata sull'impiego di SYBR green è sfruttata nella gestione della qualità delle acque per la rilevazione a tappeto di cianobatteri epatotossici produttori di microcistina e nodularina appartenenti alle classi più diffuse, come *Microcystis,*

Planktothrix, Nodularia e *Anabaena*, attraverso amplificazione all'interno dei geni *mcyE* e *ndaF*.

I saggi *Taqman* (*Taq Nuclease Assay* o TNA) sfruttano l'attività 5'esonucleasica di una DNA polimerasi per idrolizzare una sonda ibridata alla sequenza bersaglio del gene da amplificare (Heid *et al.*, 1996).

Le sonde *TaqMan* sono oligonucleotidi complementari alla sequenza posta tra i siti di legame dei *primer* e marcata alle due estremità con due differenti fluorocromi, il *reporter* al 5' (es. FAM) e il *quencher* al 3' (es. TAMRA). Fin quando entrambe si trovano sulla stessa sonda integra, la molecola *quencher* ha la capacità di inibire la fluorescenza della molecola reporter. Nel corso dell'amplificazione, però, la sonda viene rotta mediante idrolisi dall'attività esonucleasica della polimerasi, effettuando il distacco del reporter dal *quencher* e provocando emissione di fluorescenza, con un incremento proporzionale alla velocità di idrolisi della sonda stessa. I saggi *Taqman*, mediamente più costosi ma dotati di una maggiore specificità e sensibilità, sono largamente applicati allo studio dell'ecologia dei cianobatteri (Kurmayer & Schober, 2003; Manganelli *et al.*, 2010).

Prima di procedere con l'analisi del campione ambientale, per assicurare la specificità dei *primer* nei confronti di una specie bersaglio sarà opportuno controllare alcuni parametri del saggio quantitativo scelto: per inciso, la formazione di prodotto con Ct tardivo può essere indicativa di un appaiamento dei *primer* con una sequenza diversa dal target, per cui alla fine della reazione sarà necessario valutare con cautela i cicli di uscita della fase log-lineare. Una elettroforesi di controllo evidenzierà la presenza di un singolo amplicone la cui lunghezza è quella corrispondente alla regione di interesse, quando i *primer* saranno preliminarmente testati con ceppi di riferimento la cui appartenenza alla specie target è documentata, mentre nessun prodotto sarà presente quando il saggio sarà provato sottoponendo come templato il DNA di altre specie. In alternativa, come già ricordato, l'analisi della *melting-curve*, per i saggi in SYBR-Green, rivelerà la presenza di un unico picco di *melting* corrispondente alla Tm del prodotto, escludendo la formazione di dimeri di *primer* (Savichtcheva *et al.*, 2011).

La determinazione quantitativa si ottiene attraverso la costruzione, per ogni gene, di una curva di calibrazione ottenuta amplificando, contemporaneamente ai campioni ignoti, diluizioni seriali di DNA a concentrazione nota estratto da ceppi standard di riferimento (Figura C5.4).

Poiché il campione ambientale potrebbe contenere contaminanti in grado di disturbare o inibire la PCR, è importante accertarsi che l'efficienza di reazione negli *standard* e nei campioni ambientali sia comparabile (Kurmayer & Schober, 2003). In aggiunta, la realizzazione di test *in silico* preliminari alla fase sperimentale permetterà di valutare la reazione in termini di efficienza e selettività dei *primer*, tenendo conto di molteplici fattori quali il contenuto di GC, l'efficienza di *binding*, la complementarietà tra i *primer*, la formazione di strutture secondarie e il *melting point*.

Recentemente, la messa a punto di metodiche di RT-qPCR (*quantitative Reverse Transcription PCR*) nei saggi di espressione genica ha reso possibile una più completa caratterizzazione dei ceppi tossici, poiché è stato osservato che la produzione di tossine può essere indotta o repressa in risposta a specifici stimoli ambientali come la temperatura, l'intensità di luce, lo stress ossidativo, l'abbondanza o scarsità di nutrienti e metalli (fosforo, azoto, ferro) (Sevilla *et al.*, 2011; Pearson *et al.*, 2010; Jiang *et al.*, 2008).

Tuttavia, occorre tenere presente che l'influenza di tali fattori sulla produzione delle tossine non è a oggi completamente chiara, soprattutto per la difficoltà nella definizione di condizioni sperimentali standard, poiché le risposte possono variare in modo consistente in base ai ceppi di cianobatteri scelti per gli esperimenti, alle condizioni di coltura, ai livelli di stress ambientali testati e non ultimo ai diversi metodi usati per l'estrazione e la quantificazione delle tossine nelle cellule.

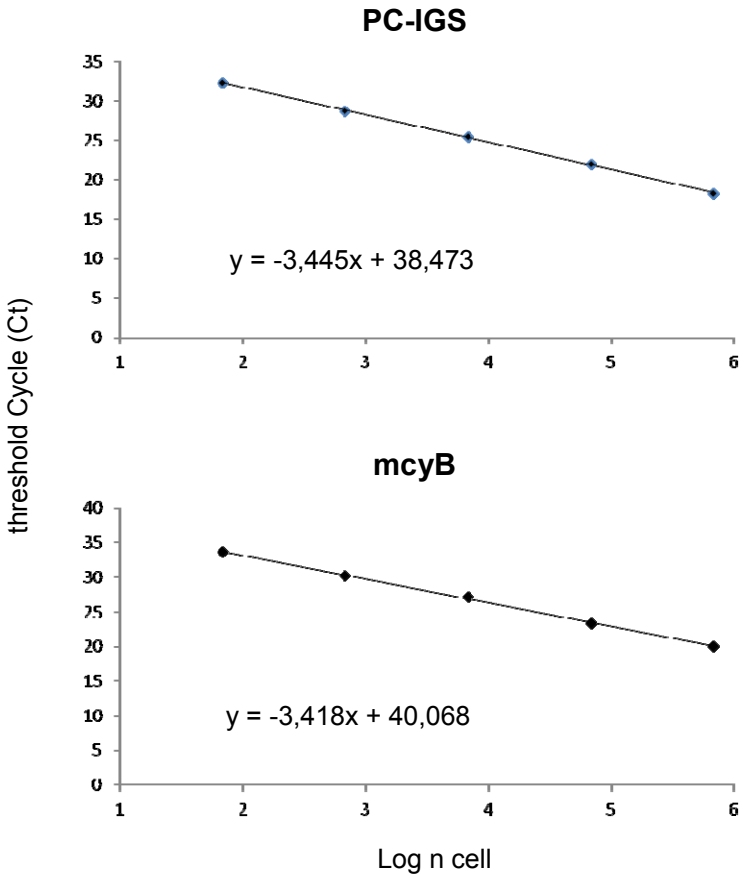


Figura C5.4. Curve standard per i marcatori PC-IGS e mcyB costruite sulla base di concentrazioni predeterminate di *P. rubescens* CCAP 1460/3 correlando le concentrazioni note di DNA (in equivalenti di cellule) nelle diluizioni seriali ai Ct

Parallelamente, occorre anche ricordare che, laddove sia rilevato un aumento di mRNA dovuto a induzione dei geni coinvolti nella biosintesi delle tossine (es *mcy*), non consegue necessariamente un aumentato livello di queste ultime nelle cellule (Kaebernik *et al.*, 2000), per cui l'analisi quantitativa del trascritto, fondamentale nella comprensione dei processi fisiologici che regolano le risposte cellulari, non deve prescindere dalla verifica del prodotto finale.

Bibliografia

Al-Tebrineh J, Gehringer MM, Akcaalan R, Neilan BA. A new quantitative PCR assay for the detection of hepatotoxigenic cyanobacteria. *Toxicon* 2011; 15;57(4):546-54.

Bergsland KJ, Haselkorn R. Evolutionary relationships among Eubacteria, Cyanobacteria, and Chloroplasts – evidence from the rpoC1 gene of Anabaena sp. strain PCC-7120. *J Bacteriol* 1991;173:3446-55.

Briand E, Escoffier N, Straub C, Sabart M, Quiblier C, Humbert J. Spatiotemporal changes in the genetic diversity of a bloom-forming *Microcystis aeruginosa* (cyanobacteria) population. *ISME J* 2009;3:419-29.

D'Alelio D, Salmaso N, Gandolfi A. Frequent recombination shapes the epidemic population structure of Planktothrix (Cyanoprokaryota) in Italian subalpine lakes. *J Phyco* 2013;49:1107-17.

D'Alelio D, Gandolfi A. Recombination signals in rpoc1 suggest gene flow between Planktothrix (Cyanoprokaryota) species. *J Phycol* 2012; 48:1424-32.

D'Alelio D, Salmaso N. Occurrence of an uncommon Planktothrix (Cyanoprokaryota, Oscillatoriales) in a deep lake south of the Alps. *Phycologia* 2011;50:379-83.

De Phillipis R, Vincenzini M. Exocellular polysaccharides from cyanobacteria and their possible applications. *FEMS Microbiol Rev* 1998;22,151-75.

Fortin N, Aranda-Rodriguez R, Jing H, Pick F, Bird D, Greer CW. Detection of microcystin-producing cyanobacteria in Missisquoi Bay, Quebec, Canada, using quantitative PCR. *Appl Environ Microbiol* 2010;76:5105-12.

Franche C, Damerval T. Test on nif probes and DNA hybridizations. *Methods Enzymol* 1988;167:803-8.

Funari E, Testai E. Human health risk assessment related to cyanotoxins exposure. *Crit Rev Toxicol* 2008;38(2):97-125.

Garcia-Pichel F. Molecular ecology and environmental genomics of cyanobacteria. In: Herrero A, Flores E (Ed.). *The cyanobacteria: molecular biology, genomics, evolution*. Norfolk: Caister Academic Press; 2008. p. 59-87.

Haande S, Rohrlack T, Ballot A, Roberg K, Skulberg R, Beck M, Wiedner C. Genetic characterisation of Cylindrospermopsisraciborskii (Nostocales, Cyanobacteria) isolates from Africa and Europe. *Harmful Algae* 2008;7:692-701.

HeidCA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM. Real time quantitative PCR. *Genome Res* 1996;6:986-94.

Hisbergues M, Christiansen G, Rouhiainen L, Sivonen K, Börner T. PCR-based identification of microcystin-producing genotypesof different cyanobacterial genera. *Arch Microbiol* 2003;180:402-10.

Hotto AM, Satchwell MF, Berry DL, Gobler CJ, Boyer GL. Spatial and temporal diversity of microcystins and microcystin producing genotypes in Oneida Lake, NY. *Harmful Algae* 2008;7:671-81.

Jiang Y, Ji B, Wong RNS, Wong MH. Statistical study on the effects of environmental factors on the growth and microcystins production of bloom-forming cyanobacteriumMicrocystisaeruginosa. *Harmful Algae* 2008;7:127-36.

Kaebernick M, Neilan BA, Borner T, Dittmann E. Light and the transcriptional response of the microcystin biosynthesis gene cluster. *Appl Environ Microbiol* 2000;66:3387-92.

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;639:245-59.

Koskenniemi K, Lyra C, Rajaniemi-Wacklin P, Jokela J, Sivonen K. Quantitative real-time PCR detection of toxic *Nodularia* cyanobacteria in the Baltic Sea. *Appl Environ Microbiol* 2007;73:2173-9.

Kurmayer R, Christiansen G, Fastner J, Borner T. Abundance of active and inactive microcystin genotypes in populations of the toxic cyanobacterium Planktothrix spp. *Environ Microbiol* 2004;6:831-41.

Kurmayer R, Dittmann E, Fastner J, Chorus I. Diversity ofmicrocystin genes within a population of the toxic cyanobacteriumMicrocystis spp. in Lake Wannsee (Berlin, Germany). *Microbial Ecology* 2002;43:107-18.

Kurmayer R, Kutzenberger T. Application of real-time PCR for quantification of microcystin genotypes in a population of the toxic cyanobacterium *Microcystis sp. Appl Environ Microbiol* 2003;69:6723-30.

Kurmayer R, Schober E. *A manual for the use of in situ genetic techniques to quantify genotypes of cyanobacteria in freshwater under non-bloom conditions and to predict cyanopeptide occurrence under bloom conditions*. Deliverable 2.2 of the EU project PEPCY "Toxic and other bioactive peptides in cyanobacteria" Dec 2003; QLK4-CT-2002-02634. Disponibile all'indirizzo: http://www.uibk.ac.at/limno/files/pdf/deliverable2.pdf; ultima consultazione 20/12/14.

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;9:87-97.

Liu Y, Wang Z, Lin S, Yu G, Li R. Polyphasic characterization of Planktothrixspiroides sp. nov.(Oscillatoriales, Cyanobacteria), a freshwater bloom-forming alga superficially resembling Arthrospira. *Phycologia* 2013;52(4):326-32.

Manganelli M, Scardala S, Stefanelli M, Palazzo F, Funari E, Vichi S, Buratti FM, Testai E. Emerging health issues of cyanobacterialblooms. *Ann Ist Super Sanità* 2012;48(4):415-28.

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 *Planktothrixrubescens*: An integrated approach to design tailored monitoring programs for human exposure to cyanotoxins. *Water Res* 2010;44(5):1297-306.

Mbedi S, Welker M, Fastner J, Wiedner C. Variability of the microcystinsynthetase gene cluster in the genus Planktothrix (Oscillatoriales, Cyanobacteria). *FEMS Microbiol Lett* 2005;245(2):299-306.

Neilan BA, Jacobs D, Del Dot T, Blackall LL, Hawkins PR, Cox PT, Goodman AE. rRNA sequences and evolutionary relationshipsamong toxic and non-toxic cyanobacteria of the genusMicrocystis. *Int J Syst Bacteriol* 1997;47:693-7.

Ostermaier V, Kurmayer R. Application of real-time PCR to estimate toxin production by the cyanobacterium*Planktothrix sp. Appl Environ Microbiol* 2010;76(11):3495-502.

Ostermaier V, Kurmayer R. Application of Real-Time PCR to estimate toxin production by the cyanobacterium*Planktothrix sp*. *Appl Environ Microbiol* 2010;76:3495-502.

Ostermaier V, Kurmayer R. Distribution and abundance of nontoxic mutants of cyanobacteria in lakes of the Alps. *Microb Ecol* 2009;58(2):323-33.

Palenik B, Haselkorn R. Multiple evolutionary origins of prochlorophytes, the chlorophyll b-containing prokaryotes. *Nature* 1992;355:265-7.

Palenik B. Cyanobacterial community structure as seen from RNA polymerase gene sequence analysis. *Appl Environ. Microbiol* 1994;60:3212-9.

Pearson L, Mihali T, Moffitt M, Kellmann R, Neilan B. On the chemistry, toxicology and genetics of the cyanobacterial toxins, microcystin, nodularin, saxitoxin and cylindrospermopsin. *Mar Drugs*2010;8:1650-80.

Pearson LA, Neilan BA. The molecular genetics of cyanobacterial toxicity as a basis for monitoring water quality and public health risk. *Curr Opin Biotechnol* 2008;19:281-8.

Rajaniemi P, Hrouzek P, Kaštovská K, Willame R, Rantala A, Hoffmann L, Komárek J, SivonenK.Phylogenetic and morphological evaluation of the genera Anabaena, Aphanizomenon, Trichormus and Nostoc (Nostocales, Cyanobacteria). *Int J Syst Evol Microbiol* 2005;55(1):11-26.

Rasmussen JP, Giglio S, Monis PT, Campbell RJ, Saint CP. Development and field testing of a real-time PCR assay for cylindrospermopsin-producing cyanobacteria. *J Appl Microbiol* 2008;104:1503-15.

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;8:665-73.

Sabart M, Pobel D, Briand E, *et al.* Spatiotemporal variations in microcystin concentrations and in the proportions of microcystin-producing cells in several Microcystis aeruginosa populations. *Appl Environ Microbiol* 2010;76:4750-9.

Saker ML, Jungblut AD, Neilan BA, Rawn DF, Vasconcelos VM.Detection of microcystinsynthetase genes in health food supplements containing the freshwater cyanobacteriumAphanizomenonflos-aquae. *Toxicon* 2005;46(5):555-62.

Savichtcheva O, Debroas D, Kurmayer R, Villar C, Jenny JP, Arnaud F, Perga ME, Domaizon I. Quantitative PCR enumeration of total/toxic Planktothrixrubescens and total cyanobacteria in preserved DNA isolated from lake sediments. *Appl Environ Microbiol* 2011;77(24):8744-53.

Scardala S, Stefanelli M, Vichi S. Fioriture di cianobatteri tossici in acque dolci: un approccio integrato per la valutazione e la gestione del rischio. Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2011. (Rapporti ISTISAN 11/23). p.46-63.

Schober E, Kurmayer R. Evaluation of different DNA sampling techniques for the application of the real-time PCR method for the quantification of cyanobacteria in water. *Lett Appl Microbiol* 2006;42(4):412-7.

Sevilla E, Martin-Luna B, Bes MT, Fillat MF, Peleato ML. An active photosynthetic electron transfer chain required for mcyD transcription and microcystin synthesis in Microcystisaeruginosa PCC7806. *Ecotoxicology* 2012;21(3):811-9.

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, New York: E&FN Spon; 1999. (Published on behalf of WHO). p. 41-111.

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.

Tan W, Liu Y, Wua Z, Lin S, Yu G, Yu B, Li R. cpcBA-IGS as an effective marker to characterize Microcystiswesenbergii (Komárek) Komárek in Kondrateva (cyanobacteria). *Harmful Algae* 2010;9:607-12.

Tanabe Y, Watanabe M. M. Local expansion of a panmictic lineage of water bloom-forming cyanobacteriumMicrocystisaeruginosa. *PLoS One* 2011;6(2):e17085.

Tooming-Klunderud A, Sogge H, Rounge TB, Nederbragt AJ, Lagesen K, Glöcknerd G, Hayes, PK, Rohrlack T, Jakobsen KS. From Green to Red: Horizontal Gene Transfer of the Phycoerythrin Gene Cluster between Planktothrix Strains *Appl Environ Microbiol* 2013;79(21):6803-12.

Vaitomaa J, Rantala A, Halinen K, Rouhiainen L, Tallberg P, Mokelke L, Sivonen K. Quantitative real-time PCR for determination of microcystinsynthetase e copy numbers for microcystis and anabaena in lakes. *Appl Environ Microbiol* 2003; 69(12):7289-97.

Valério E., Chambel L, Paulino S, Faria N, Pereira P, Tenreiro R. Molecular identification, typing and traceability of cyanobacteria from freshwater reservoirs. *Microbiology* 2009;155(2):642-56.

van Gremberghe I, Leliaert F, Mergeay J, Vanormelingen P, Van der Gucht K, Debeer A-E, Lacerot G, De Meester L, Vyverman W. Lack of phylogeographic structure in the freshwater CyanobacteriumMicrocystisaeruginosa suggests global dispersal. *PLoS ONE* 2011;6:e19561.

Vichi S, Gemma S, Testai E. Metodi genetici nell'identificazione di cianobatteri e della loro potenziale tossicità. In: 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). p. 59-67.

Vichi S, Lavorini P, Funari E, Scardala S, Testai E. Contamination by Microcystis and microcystins of blue-green algae food supplements (BGAS) on the Italian market and possible risk for the exposed population. *Food Chem Toxicol* 2012;50(12):4493-9.

Liu Y, Wang Z, Lin S, Yu G, Li R. Polyphasic characterization of Planktothrixspiroides sp. nov. (Oscillatoriales, Cyanobacteria), a freshwater bloom-forming alga superficially resembling Arthrospira. *Phycologia* 2013;(52)4:326-32.

Yoshida M, Yoshida T, Satomi M, Takashima Y, Hosoda N, Hiroishi S. Intra-specific phenotypic and genotypic variation in toxic cyanobacterial *Microcystis* strains. *J Appl Microbiol* 2008;105:407-15.

Serie Rapporti ISTISAN
numero di dicembre 2014, 2° Suppl.

Stampato in proprio
Settore Attività Editoriali – Istituto Superiore di Sanità
Roma, dicembre 2014