



RAPPORTI ISTISAN 22|12

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

Miscele tossiche con cianotossine: effetti sinergici

M. Bruno, V. Messineo



AMBIENTE
E SALUTE

ISTITUTO SUPERIORE DI SANITÀ

**Miscele tossiche con cianotossine:
effetti sinergici**

Milena Bruno, Valentina Messineo
Servizio Grandi Strumentazioni e Core Facilities

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

Rapporti ISTISAN
22/12

Istituto Superiore di Sanità

Miscele tossiche con cianotossine: effetti sinergici.

Milena Bruno, Valentina Messineo

2022, 40 p. Rapporti ISTISAN 22/12

La contaminazione mista delle acque interne è una nuova prospettiva di rischio che si riscontra sempre più frequentemente nelle indagini e nel monitoraggio su campo. In queste evidenze viene riscontrato che il rilevamento di contaminanti misti complica sia la valutazione completa del rischio per l'uomo che l'attuazione tempestiva delle contromisure. Sebbene i metodi più tradizionali di valutazione del rischio presuppongano l'adesione dei componenti di una miscela tossica al modello di addizione della concentrazione, consentendo di prevedere il grado di tossicità totale per la somma delle tossicità dei singoli componenti, gli studi hanno dimostrato che possono verificarsi interazioni che alterano la tossicità totale, rendendola inferiore o superiore al previsto. In questo rapporto si analizzano diverse tipologie di miscele di cianotossine e altri contaminanti, i loro effetti studiati in letteratura internazionale e alcune delle metodologie di rilevazione.

Parole chiave: Cianotossine; Inquinanti; Miscele tossiche; Metalli pesanti; Pesticidi; Idrocarburi; Nanoplastiche

Istituto Superiore di Sanità

Toxic mixtures with cyanotoxins: synergistic effects.

Milena Bruno, Valentina Messineo

2022, 40 p. Rapporti ISTISAN 22/12 (in Italian)

Mixed contamination of inland waters is a new risk perspective that is increasingly encountered in field surveys and monitoring. In these evidences it is found that the detection of mixed contaminants complicates both the complete risk assessment for humans and the timely implementation of countermeasures. Although more traditional methods of risk assessment assume the adhesion of the components of a toxic mixture to the concentration addition model, allowing to predict the degree of total toxicity for the sum of the toxicities of the individual components, studies have shown that interactions can occur that alter total toxicity, making it lower or higher than expected. This report analyses different types of mixtures of cyanotoxins and other contaminants, their effects studied in international literature and some of the detection methods.

Key words: Cyanotoxins; Pollutants; Toxic mixtures; Heavy metals; Pesticides; Hydrocarbons; Nanoplastics

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

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

Citare questo documento come segue:

Bruno M, Messineo V. *Miscele tossiche con cianotossine: effetti sinergici*. Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2022. (Rapporti ISTISAN 22/12).

Legale rappresentante dell'Istituto Superiore di Sanità: *Silvio Brusaferrò*

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: *Sandra Salinetti*

La responsabilità dei dati scientifici e tecnici è dei singoli autori, che dichiarano di non avere conflitti di interesse.



INDICE

Introduzione	1
Miscela di cianotossine e altri contaminanti	5
Metalli.....	5
Metalli e inquinanti organici persistenti.....	7
Pesticidi fungicidi, erbicidi, insetticidi.....	9
Particelle e contaminanti microplastici e nanoplastici.....	12
Farmaci.....	13
Nitriti.....	16
Detergenti: alchilbenzensolfonato.....	17
Idrocarburi Policiclici Aromatici.....	17
Virus, funghi tossici, batteri, protozoi.....	20
Miscela di cianotossine.....	22
Metodi di rilevazione complessiva	23
Implicazioni per le linee guida sulla sicurezza dell'acqua, la legislazione e il trattamento delle acque	25
Bibliografia	26

INTRODUZIONE

La contaminazione mista delle acque interne è una nuova prospettiva di rischio che si riscontra sempre più frequentemente nelle indagini e nel monitoraggio su campo (Wang *et al.*, 2012; Akparido *et al.*, 2015). In queste evidenze viene riscontrato che il rilevamento di contaminanti misti complica sia la valutazione completa del rischio per l'uomo che l'attuazione tempestiva delle contromisure. Sebbene i metodi più tradizionali di valutazione del rischio presuppongano l'adesione dei componenti di una miscela tossica al modello di addizione della concentrazione, consentendo di prevedere il grado di tossicità totale per la somma delle tossicità dei singoli componenti (Ostgaard *et al.*, 1994; Feron *et al.*, 1998; Almeda *et al.*, 2018), gli studi hanno dimostrato che possono verificarsi interazioni che alterano la tossicità totale, rendendola inferiore o superiore al previsto (Krewski *et al.*, 1989; Heys *et al.*, 2016).

Meccanismi sinergici, non completamente chiariti, possono riguardare una migliore affinità per i siti bersaglio, una maggiore persistenza degli effetti tossici ma anche la produzione di effetti tossici variabili dove le singole sostanze non abbiano alcuna tossicità (Palikova *et al.*, 2014; Kopp *et al.*, 2014). Gli effetti delle miscele nell'ambiente acquatico possono anche facilitare lo sviluppo di organismi tossici e stimolarne la crescita (Harris *et al.*, 2016).

A seguito di intossicazioni da parte di animali selvatici, animali domestici ed esseri umani dovute all'esposizione a cianobatteri, negli ultimi anni il volume delle ricerche sulla tossicologia di cianobatteri e cianotossine è aumentato notevolmente e tale crescita continua (Carmichael 1981; Meriluoto *et al.*, 2017, Svircev *et al.*, 2017).

In riconoscimento della co-occorrenza di più varianti all'interno di singole classi di cianotossine, di diverse classi di cianotossine e di cianotossine più ficotossine, è incoraggiante che siano in fase di sviluppo metodi fisico-chimici per la co-analisi di queste combinazioni (Meriluoto *et al.*, 2017, Gimenez-Campillo *et al.*, 2019; Roy-Lachapelle *et al.*, 2019; Di Pofi *et al.*, 2020; Merlo *et al.*, 2020).

Tuttavia, poiché le fioriture di cianobatteri si sviluppano comunemente in corpi idrici che sono soggetti ad uso antropico intensivo (es. per lo scarico di acque reflue domestiche, industriali e agricole, estrazione per il trattamento dell'acqua potabile, attività ricreative, irrigazione delle colture e pesca) dovrebbe essere anticipato che i cianobatteri tossigeni possono coesistere con un'ampia gamma di altri fattori biologici e di rischi chimici per la salute. In effetti, esistono sufficienti esempi, qui recensiti, di incidenti sanitari riguardanti animali e umani, e intossicazioni associate a molteplici rischi per la salute, incluse le cianotossine e altre tossine biologiche, patogeni microbici e antropogenici e prodotti chimici.

Mentre ulteriori ricerche consolidate ed emergenti sulla tossicità delle cianotossine sono necessarie con test biologici (Blaha *et al.*, 2017), è opportuno portare avanti più biotest sulle cianotossine, in combinazione con altre tossine ambientali e sostanze tossiche.

Dati sulla tossicità delle cianotossine in combinazione con altre biotossine e composti chimici tossici possono quindi contribuire alla valutazione se i valori guida e la legislazione per la protezione della salute includono l'esposizione multipla alle cianotossine in concomitanza con altri agenti biologici e chimici.

La via di somministrazione delle cianotossine può anche influenzare l'esito tossicologico o le miscele di composti che possono essere presenti, come piombo e particolari materiali (*Particulate Matter*: PM_{2,5} e PM₁₀) che possono presentarsi come componenti aerodispersi (Manton *et al.*, 1985; Querol *et al.*, 2008), potenzialmente in aggiunta alle cianotossine (Metcalf *et al.*, 2012).

Il riconoscimento della presenza multipla e della tossicità combinata delle cianotossine, oltre ad altri tossici e patogeni, è un'area di ricerca in crescita e tali co-occorrenze possono aumentare

ulteriormente con la crescita della popolazione umana, le crescenti richieste di risorse idriche e i cambiamenti climatici. Tuttavia, tali compresenze possono aver già influito negativamente sulla salute umana in periodi passati.

Alte concentrazioni di mercurio o di fosfato compatibili con condizioni eutrofiche, oltre ad ampliconi di rRNA 16S che indicano le fioriture di *Planktothrix* e *Microcystis* (quindi con potenziale presenza di microcistine), sono stati trovati in profili di sedimenti datati da ex bacini idrici che servivano l'antica città Maya di Tikal in Guatemala. Questa combinazione potenzialmente tossica potrebbe aver contribuito alla scomparsa della popolazione Maya e della città nel IX secolo d.C. (Lentz *et al.*, 2020).

Negli ambienti marini e d'acqua dolce e negli habitat terrestri e aerei, mentre i cianobatteri possono facilmente apparire come "dominanti", ad esempio, per rappresentare la maggior parte della biomassa microbica, essi possono essere accompagnati da una vasta gamma di altri microbi tra cui microalghe, batteri chemioeterotrofi e protozoi (Canter-Lund *et al.*, 1995; Whitton 2012). Laddove tali ambienti siano soggetti a pressioni antropiche intense (es. smaltimento di acque reflue e acque fognarie umane, e scarichi industriali), i cianobatteri dominanti possono coesistere con ulteriori tossine biologiche (Gimenez-Campillo *et al.*, 2019), inquinanti chimici (es. metalli) (Whitton 2012), e microbi patogeni (Islam *et al.*, 1994).

La Tabella 1 prende in esame esempi della compresenza di cianotossine, oltre ad altri agenti chimici e agenti patogeni microbici, e casi di coesposizione; i risultati in diversi sistemi sono stati influenzati dalle concentrazioni relative e, in alcuni casi, dalla tempistica delle applicazioni di tossine/tossici.

Tabella 1. Esempi di valutazione della tossicità mediante saggio biologico di cianotossine purificate in combinazione e di cianotossine più ulteriori tossine/inquinanti ambientali. Mod. da Metcalf *et al.*, 2020

Agente tossico	Organismo testato/linee cellulari	Risultato	Bibliografia
MC-LR + ATX-a	Topo, biosaggio intranasale	SIN	Fitzeorge <i>et al.</i> 1994
MC-LR + ATX-a	<i>Selenastrum capricornutum</i>	SIN	Chia <i>et al.</i> 2019
MC-LR + ATX-a	<i>Cyprinus carpio</i> , cellule di Carpa	Potenzialmente SIN	Rymuszka <i>et al.</i> 2013
MC-LR + Antx-	<i>Vallisneria natans</i> e biofilm microbico	ANTAG	Li <i>et al.</i> 2020
MC-LR + Microcystis LPS	<i>Artemia salina</i> e <i>Daphnia sp</i>	ANTAG	Lindsay <i>et al.</i> 2006
MC-LR + CYN	<i>Chlorella vulgaris</i>	SIN	Pinheiro <i>et al.</i> 2016
MC-LR + acido λ -linoleico cianobatterico	<i>Daphnia magna</i>	ADDIT	Reinikainen <i>et al.</i> 2001
MC-LR + aflatossina B1	Cellule epatiche umane	ANTAG	Wang <i>et al.</i> 2020
MC-LR + aflatossina B1 + Fumonisina B1	Line cellular HepG2, Caco2, MDBK	ADDIT, SIN, ANTAG	Meneely <i>et al.</i> 2018
MC-LR + Rame	<i>Danio rerio</i>	SIN	Wei <i>et al.</i> 2020
MC-LR + Rame	<i>Vallisneria natans</i>	SIN	Wang <i>et al.</i> 2017
MC-LR + alchilbenzene sulfonato lineare	<i>Lactuca sativa</i>	SIN	Wang <i>et al.</i> 2011
MC-LR + fenantrene	<i>Lemna gibba</i>	ADDIT, SIN, ANTAG	Wan <i>et al.</i> 2019
CYN + cloropirifos	Linea Cellulare umana neuroblastoma SH-SY5Y	ANTAG	Hinojosa <i>et al.</i> 2020
CYN + bifenoli	Cellule HepG2	ADDIT, SIN	Hercog <i>et al.</i> 2020

ADDIT, additivo; **ANTAG**, antagonista; **ATX-a**, anatossina-a; **CYN**, cilindropermopsina; **MC-LR**, microcistina-LR; **SYN**, synergico

La ricerca per comprendere ulteriormente il significato delle cianotossine per la salute viene discussa in un contesto più ampio di compresenza di cianotossine e co-esposizioni con ulteriori agenti tossici biologici e antropogenici.

È assodato che quando l'esposizione a composti tossici comporta miscele di due o più sostanze tossiche, l'effetto di tali miscele su individui o popolazioni suscettibili può essere imprevedibile, ma diversa dall'esposizione a ciascuna delle tossine se applicata separatamente.

Le classi di tossine prodotte dai cianobatteri, ad eccezione della guanitossina (Fiore *et al.*, 2020), racchiudono tutte molteplici strutture chimiche, che vanno da poche – per esempio anatoxina-a (ATX-a) e omoanatoxina-a – a centinaia di varianti, nel caso delle microcistine (>240) (Spooft *et al.*, 2017). Allo stesso modo, analisi di fioriture e colture di cianobatteri hanno dimostrato che possono esistere più varianti negli estratti di singoli ceppi, come per *Microcystis* PCC7820 con almeno 10 varianti di microcistina segnalate (Robillot *et al.*, 2000) e un ceppo thailandese di *Cylindrospermopsis* sp. che ha dimostrato di produrre due varianti aggiuntive di cilindrospermopsina (Wimmer *et al.*, 2014).

Pertanto, quando viene eseguita la valutazione della tossicità, anche se le classi di cianotossine possono essere identificate, le diverse quantità di varianti, ad esempio microcistine o anatoxine, ciascuna con tossicità potenzialmente differenti se determinate individualmente (es. Ward *et al.*, 1999), possono influenzare il rischio valutazione di tale materiale di fioritura. A volte, alcuni ceppi sono stati segnalati per includere più classi di tossine, ad esempio microcistina e guanitossina, come in *Anabaena* 525-17 (Harada *et al.*, 1991).

Oltre a queste cianotossine, tutti i cianobatteri producono tipicamente endotossine lipopolisaccaridiche (Monteiro *et al.*, 2017). Fitzgeorge *et al.* hanno fornito prove precoci dell'azione sinergica di due cianotossine purificate (ATX-a e microcistina-LR) quando somministrate per via intranasale ai topi. In questo caso, la somministrazione di una dose subletale di microcistina-LR 30 min prima di quella di ATX-a abbassava la LD50 di quest'ultima di quattro volte.

L'evento di avvelenamento umano forse di maggior profilo si è verificato a Caruaru, in Brasile (Pouria *et al.*, 1998, Jochimsen *et al.*, 1998).

Indagini approfondite sulla morte di 50 persone in una clinica di emodialisi hanno identificato le microcistine come la causa principale più probabile dei decessi, sebbene siano stati segnalati diversi sintomi. Sono proseguite le indagini sulle intossicazioni ed è stata coinvolta anche la cilindrospermopsina, il che suggerisce la possibilità di esposizioni multiple alle cianotossine (Carmichael *et al.*, 2001)

In letteratura sono disponibili alcune evidenze di esposizione a rischi ambientali per la salute oltre a cianobatteri tossici o cianotossine specifiche negli episodi di avvelenamento della fauna selvatica. Così, mentre è stato identificato il ruolo importante delle microcistine e dell'ATX-a nella mortalità di massa dei fenicotteri minori (*Phoeniconaias minor*) nei laghi del Kenya, sono stati individuati contributi aggiuntivi dovuti a metalli pesanti e pesticidi, ed è probabile che si sia verificata un'infezione da micobatteri (Krienitz *et al.*, 2003; Pennycott *et al.*, 2004).

Il ruolo importante delle microcistine è similmente stato dedotto dalle analisi e dalla patologia delle cianotossine nelle morti di cigni reali (*Cygnus olor*) nel Regno Unito, sebbene il contributo aggiuntivo del piombo sia stato dedotto dall'abbondanza nello stomaco degli uccelli di pesi in piombo dei pescatori (Pennycott *et al.*, 2004).

È stato rilevato che fioriture di cianobatteri produttori di microcistina, saxitossina e cilindrospermopsina abbiano contribuito precocemente ad una estesa e importante moria di pesci nel fiume Lower St. John, in Florida. Fattori successivi derivanti dalla decomposizione e dalla lisi dei cianobatteri includevano concentrazioni più basse di ossigeno disciolto, elevate concentrazioni di ammoniaca e il contributo emolitico dell'alga dinoflagellata *Heterosigma akashiwo* (Landsberg *et al.*, 2020).

Casi di malattia umana associati all'esposizione a cianobatteri tossici indicano anche il possibile contributo di ulteriori fattori. Nel 1979 si verificò un grave focolaio di epato-enterite tra consumatori (principalmente bambini) di acqua potabile da un bacino idrico di Palm Island nel Queensland, in Australia, contenente una fioritura di *Cylindrospermopsis raciborskii* (Hawkins *et al.*, 1985). Il successivo isolamento e caratterizzazione di cilindrospermopsina da *C. raciborskii* dal serbatoio ha fornito una forte evidenza del ruolo della cianotossina nella epidemia di Palm Island.

Tuttavia, come sottolineato da Hawkins *et al.*, l'evidenza ha suggerito che la fioritura che produce cilindrospermopsina dovrebbe essere considerata come una sola possibile causa (Hawkins *et al.*, 1985).

Non è noto se anche la concentrazione di rame nell'acqua, derivante dal precedente trattamento per uccidere la fioritura di *C. raciborskii* abbia contribuito alla malattia.

Un episodio che richiese ricovero in ospedale di cadetti dell'esercito sottoposti a esercizi di nuoto e canoa a Rudyard Lake, nel nord Inghilterra, si è verificato dopo che i cadetti avevano ingerito la schiuma di *Microcystis aeruginosa* contenente microcistina (Turner *et al.*, 1990).

Polmonite atipica, danni al fegato e vesciche intorno alla bocca sono stati attribuiti all'ingestione della microcistina. Tuttavia, sebbene non fosse evidente alcuna prova di contaminazione dell'acqua da enterovirus, i conteggi di *Escherichia coli* indicavano che l'acqua non era adatta per fare il bagno (Turner *et al.*, 1990).

Esiste un'ampia gamma di rischi microbici e chimici per la salute con cui i cianobatteri possono essere associati. Le associazioni spaziano dall'utilizzo di materiali purificati in laboratorio in progetti sperimentali per studiare le risposte tossicologiche combinate *in vitro* e *in vivo*, alla co-occorrenza di molteplici rischi in ambienti aperti, alcuni dei quali verranno esaminati qui di seguito.

MISCELE DI CIANOTOSSINE E ALTRI CONTAMINANTI

Metalli

Le relazioni tra cianobatteri e metalli costituiscono un vasto campo di indagine.

Di rilevanza tossicologica sono:

- i) gli effetti cronici e acuti dei metalli sulla crescita, il metabolismo e la sopravvivenza dei cianobatteri;
- ii) la capacità dei cianobatteri di accumulare, detossicare, metabolizzare e sequestrare i metalli (Fiore *et al.*, 2017; Baptista *et al.*, 2006; Ramakrishnan *et al.*, 2010).

A seconda delle condizioni di crescita, gli effetti degli ioni metallici disciolti (es. Ca, Cu, Pb, Cd) possono includere sia l'inibizione che la stimolazione delle fioriture di *Microcystis* (Gu *et al.*, 2020), e la presenza di rame può influenzare la detossificazione, ad esempio, della nodularina (NOD) distruggendo i microbi che possono degradare questa cianotossina (Heresztyn *et al.*, 1997).

Il rame (Cu) è spesso usato come biocida per lisare le cellule cianobatteriche durante le fioriture. Sebbene di successo, nel caso ad esempio di *Microcystis*, questo ha l'effetto di rilasciare cianotossine da un ambiente intracellulare ad un ambiente extracellulare con il risultato che possono verificarsi danni al fegato dopo aver bevuto acqua dalla quale sono state rimosse cellule cianobatteriche e detriti cellulari, ma senza la rimozione sicura di microcistina (MC) extracellulare (Falconer *et al.*, 1983).

Inoltre, se il rame utilizzato per la lisi non viene efficacemente rimosso durante il trattamento dell'acqua potabile, ciò può successivamente rappresentare un ulteriore fattore tossicologico a carico di persone e animali.

La ricerca su metalli e cianotossine si è in gran parte concentrata sugli effetti del ferro (Fe) nella produzione di MC.

Studi pionieristici sulla limitazione del ferro nelle colture axeniche di *Microcystis aeruginosa* hanno rivelato aumenti nella produzione di MC-RR e MC-LR (Utkilen *et al.*, 1995).

Ulteriori indagini sulla produzione di MC da parte di *M. aeruginosa*, *Microcystis novacekii* e *Phormidium autumnale* hanno incluso aumenti di produzione in seguito all'aggiunta di ferro, ma aumenti anche in caso di limitazione del ferro durante la coltura.

Effetti positivi degli ioni di rame, zinco e manganese sulla produzione di MC in condizioni di arricchimento di metalli e limitazione di metalli sono state osservate anche in colture di cianobatteri, che probabilmente indicano ruoli fisiologici e biochimici dei metalli nella biosintesi delle MC, oltre a una funzione siderofora per la stessa nell'acquisizione di metalli (Facey *et al.*, 2019).

Non sono state trovate differenze specifiche nella produzione di ATX-a da parte di *P. autumnale* in risposta alla crescita sotto una gamma ambientale, da bassa ad alta, di concentrazioni di ferro o rame (Harland *et al.*, 2013).

L'interazione diretta tra molecole di cianotossine e metalli è stata studiata *in vitro* con due classi di cianotossine.

La neurotossina bloccante neuromuscolare post-sinaptica purificata, BMAA, è un potente chelante di cationi metallici bivalenti, inclusi rame e zinco (Nunn *et al.*, 1989). Se tale chelazione si verifica nelle cellule cianobatteriche che producono BMAA e, in tal caso, se la tossicità è in questo modo influenzata, non è ancora noto.

Il legame bivalente con rame e zinco avviene per almeno tre MC purificate (MC-LR, MC-LW, MC-LF) con costanti di formazione (K_i) indicanti che tutte e tre le cianotossine sono leganti

metallici di media resistenza. La sostituzione di un singolo aminoacido nell'anello eptapeptidico della MC (arginina con triptofano o con fenilalanina) non influenza la forza dell'associazione metallo-MC (Humble *et al.*, 1997).

Non è noto se il legame metallo-MC influenzi la tossicità e se questo legame si verifichi nelle cellule produttrici di cianobatteri e/o nell'acqua circostante anche dopo il rilascio di MC.

Tuttavia, questa possibilità è valutata insieme all'aumento di prove per la tossicità combinata di MC e metalli: saggi biologici di co-esposizione che coinvolgono MC-LR e rame, a concentrazioni riscontrate nell'ambiente, hanno rivelato una tossicità sinergica nello stadio precoce di sviluppo del pesce zebra, *Danio rerio*. La valutazione della tossicità di BMAA e metilmercurio verso le cellule primarie neurocorticali mostra una tossicità sinergica (Rush *et al.*, 2012) ed è necessario valutare la tossicità di altre cianotossine accompagnate da forme organiche di metalli.

In uno studio di Huimin *et al.* del 2020 sono stati esaminati gli effetti tossici singoli e combinati di MC-LR e rame (Cu) nello sviluppo iniziale del pesce zebra (*Danio rerio*).

Il rame (Cu) è un elemento essenziale degli organismi e uno dei componenti principali di molti enzimi (Pereira *et al.*, 2016); un leggero aumento nella concentrazione di Cu può causare un'elevata tossicità per gli organismi acquatici (Banci *et al.*, 2008).

L'esposizione al Cu può influenzare la permeabilità della membrana cellulare, l'attività enzimatica, l'espressione del DNA e la sintesi proteica a causa dello stress ossidativo indotto dal ciclo redox tra Cu^{2+} e la produzione di specie reattive dell'ossigeno nella catalisi Cu^+ (Yruela, 2005; Monferran *et al.*, 2009). In un ambiente acquatico, lo ione Cu forma immediatamente legami con carbonati, solfati, materia organica e argilla nell'acqua e alla fine precipita nei sedimenti, dove possono formarsi legami minerali forti.

Tuttavia, la presenza di Cu libero può essere ancora rilevata in acqua, con un intervallo di concentrazione di 0–10 $\mu\text{g/L}$ (Zhang *et al.*, 2016; Yin *et al.*, 2018).

MC-LR e Cu possono coesistere dopo l'applicazione di fertilizzanti da biomassa di cianobatteri tossici o irrigazione con acqua eutrofica in terreni coltivati inquinati da Cu.

Alte concentrazioni di MC-LR e Cu sono state riportate dopo l'applicazione di Cu chelante o algicidi a base di sali di Cu (Kumar e Sinha, 2014). A causa del ruscellamento arricchito con nutrienti e Cu (Hedberg *et al.*, 2014), la co-presenza di MC-LR e Cu è stata comunemente osservata in grandi laghi, come il lago Taihu, il lago Dianchi e il lago Chaohu in Cina (Song *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2012; Liu *et al.*, 2018; Shan *et al.*, 2019) e il lago Erie negli Stati Uniti (Hoostal *et al.*, 2008; Francy *et al.*, 2016).

La singola tossicità di MC-LR e Cu è stata studiata relativamente bene, ma gli effetti tossici congiunti rimangono poco conosciuti.

In questo studio, i valori di $\text{LC}_{50\ 72\text{-h}}$ erano 2,79 mg/L per MC-LR e 3,23 mg/L per Cu. Le concentrazioni sub-letali di MC-LR ($\leq 600\ \mu\text{g/L}$) non influenzavano il normale sviluppo del pesce zebra ma ne ritardavano la schiusa. Sono stati osservati forti effetti tossici sinergici dopo co-esposizione a MC-LR e Cu a concentrazioni ambientali ($\leq 60\ \mu\text{g/L}$). Gli effetti tossici sinergici di questi due composti potrebbero essere attribuiti all'aumentato bioaccumulo di entrambi, mediato dai trasportatori MC-LR (ad esempio, *oatp1d1* e *oatp2b1*) e dai trasportatori Cu (ad esempio, *ctr1* e *atp7a*), nel pesce zebra.

Tale bioaccumulo ha causato stress ossidativo, come suggerito dall'espressione genica interrotta di enzimi antiossidanti (ad es. Cu/Zn-SOD, Mn-SOD e CAT). I risultati di questo lavoro hanno rivelato per la prima volta gli effetti tossici sinergici e il potenziale meccanismo tossico di MC-LR-Cu negli animali acquatici. Questi effetti sinergici dovrebbero essere considerati quando si valuta il rischio ecologico di fioriture tossiche di cianobatteri.

L'arsenico è uno dei contaminanti ambientali più tossici. Nell'ambiente acquatico si può trovare sia naturalmente, proveniente da fonti geologiche, sia come risultato di attività umana

(Bhattacharya *et al.*, 2007). L'arsenico può essere facilmente accumulato nei tessuti dei pesci marini e in altri organismi marini (es. Zhang *et al.*, 2011; Ruttens *et al.*, 2012). I pesci d'acqua dolce possono essere esposti a un'elevata esposizione all'arsenico quando vengono alimentati con miscele di mangimi commerciali contenenti farina di pesce marino.

Nella Repubblica Ceca, l'arsenico contenuto nel mangime per pesci è limitato a 6 mg/kg ai sensi del decreto ceco n. 356/2008 sui mangimi.

Kopp *et al.* (2014) ha dimostrato che la co-esposizione all'arsenico e ai cianobatteri può causare una significativa diminuzione o un aumento degli elettroliti nella trota iridea. Nel lavoro di Palikova *et al.* (2015), viene esaminato l'effetto combinato di esposizione di cianobatteri e arsenico inorganico (+5mg/kg) sui parametri ematologici e immunologici della trota iridea (*Oncorhynchus mykiss* W.). Lo scopo di questo studio era di verificare l'ipotesi che entrambi i fattori di stress possano combinarsi, incrementando il loro effetto sui pesci.

Nei gruppi esposti sono stati evidenziati ritrovamenti patologici grossolani nei gruppi esposti ad arsenico e ad arsenico/cianobatteri dopo 30 giorni. Una forte diminuzione della concentrazione dell'emoglobina è stata osservata dopo 10 giorni di esposizione in tutti i gruppi sperimentali che hanno ricevuto arsenico. La conta totale dei leucociti è aumentata notevolmente nei pesci esposti alla biomassa cianobatterica e a concentrazioni di arsenico più elevate entro la fine della sperimentazione (30 giorni). I neutrofili sono diminuiti significativamente alla fine dell'esposizione.

Allo stesso modo, l'esposizione a cianobatteri e/o arsenico ha portato alla soppressione delle esplosioni respiratorie dei neutrofili indotte da particelle di zimosan opsonizzate (opsonised zymosan particle-induced neutrophil respiratory bursts). Questi risultati dimostrano che gli effetti dell'esposizione a biomassa cianobatterica e arsenico sui pesci sono più forti quando i contaminanti sono combinati. In particolare, l'esposizione a lungo termine porta ad anomalie della conta leucocitaria. La modulazione della fagocitosi, che è la prima linea di difesa contro i patogeni invasori, suggerisce che l'azione combinata porta, nella trota arcobaleno, ad una diminuzione della capacità di controllare le infezioni.

Metalli e inquinanti organici persistenti

Nelle acque eutrofiche i cianobatteri dannosi sono spesso associati ad altri inquinanti ambientali, come gli inquinanti organici persistenti (*Persistent Organic Pollutants*, POP) e i metalli. Ci sono ancora poche informazioni sulla fitotossicità e il bioaccumulo di cianotossine coesistenti con questi inquinanti ambientali.

In uno studio del 2018 di Jia *et al.*, sono state sistematicamente indagate le fitotossicità combinate di tre tipi di inquinanti associati ai cianobatteri: MC-LR, cadmio (Cd), 2, 4, 4'-triclorobifenile (PCB-28).

Dopo 7 giorni di esposizione, sono stati rilevati forti effetti sinergici nel caso in cui semi e piantine di *Arabidopsis thaliana* fossero esposti a miscele binarie di MC-LR + PCB-28 e PCB-28 + Cd. L'inibizione più forte si è verificata nel caso di esposizione di *A. thaliana* alla loro miscela ternaria sia in condizioni di serra che di semi-campo.

Inoltre, il bioaccumulo di MC-LR, Cd e PCB-28 risultava aumentato quando le piantine erano esposte alle miscele binarie/ternarie, specialmente quando le piantine erano state trattate con concentrazioni più elevate di sostanze tossiche (MC-LR, 1 mg/L; CD, 10 mg/L; PCB-28, 1 µg/L).

Inoltre, gli effetti tossici pronunciati sono stati determinati entro 7 giorni dall'irrigazione delle piantine con acqua grezza contenente una fioritura di cianobatteri (raccolta dal lago Taihu in Cina) e le sue diluizioni. La produzione di semi risultava diminuita significativamente dopo l'irrigazione continua con acqua contenente fioriture di cianobatteri.

I contaminanti tossici provenienti dall'acqua eutrofica potrebbero generalmente essere trasferiti e accumulati nei tessuti vegetali tramite irrigazione o altre vie di esposizione.

Codd *et al.* (1999) hanno riferito che le piante coltivate potrebbero accumulare alte concentrazioni di tossine dopo l'irrigazione a spruzzo con acqua eutrofizzata. Chen *et al.* (2004) hanno anche evidenziato che le MC potrebbero accumularsi nelle piantine di riso dopo esposizioni a 3 µg di MC-LR equivalenti/mL per 10 giorni. Risultati simili sono stati riportati da Pflugmacher *et al.* (2007) in altre piante coltivate.

I risultati dello studio di Jia *et al.* indicano che la co-esposizione di piantine di *A. thaliana* a sostanze tossiche derivate da fioriture cianobatteriche ha portato ad un bioaccumulo molto più elevato di diverse sostanze tossiche, simile ai risultati degli studi sull'irrigazione delle piantine di lattuga con un tensioattivo anionico (LAS) e MC-LR (Wang *et al.*, 2011). Il meccanismo può essere spiegato con la possibile influenza di un agente sulla solubilità e sul bioassorbimento di altri.

Un fenomeno simile è stato riportato anche in studi precedenti associati al bioaccumulo di ioni metallici e MC nelle cellule algali (Saito *et al.*, 2008). Secondo le spiegazioni di cui sopra, l'aumento del bioaccumulo di Cd può essere causato dall'effetto antagonista tra Cd e MC, che riducono significativamente la disponibilità di Cd nei tessuti vegetali. D'altra parte, i PCB e gli inquinanti organici tossici possono anche interagire tra loro e influenzare ulteriormente l'essudazione della pianta e la successiva complessazione e assorbimento del Cd.

Alkio *et al.* (2005) hanno suggerito che gli IPA (Idrocarburi Policiclici Aromatici) penetrerebbero passivamente nelle membrane delle cellule radicali senza alcun vettore, il che potrebbe facilitare la penetrazione di metalli (o complessi metallici) nelle cellule.

I contaminanti tossici provenienti dall'acqua eutrofica potrebbero essere trasferiti e accumulati nei tessuti vegetali tramite irrigazione o altre vie di esposizione (Bruno *et al.*, 2020).

Poiché l'irrigazione con acque eutrofiche contenenti MC a bassa concentrazione potrebbe rappresentare un potenziale rischio per le piante coltivate, la fertilizzazione e/o l'irrigazione con concime da fioriture cianobatteriche, raccolto in Cina meccanicamente dai laghi eutrofizzati, porterà inevitabilmente a danni per le piante coltivate.

Le sostanze tossiche derivate dalle fioriture di cianobatteri presentano sicuramente una fitotossicità molto più elevata e quindi porteranno ad alte concentrazioni di bioaccumulo nelle piante coltivate. Inoltre, metalli e MC possono essere trasferiti liberamente e accumularsi nei tessuti vegetali, mentre i PCB e altri contaminanti idrofobici potrebbero accumularsi principalmente nei semi di piante come *A. thaliana* a causa degli olii di semi idrofobici.

Poiché le sostanze tossiche potrebbero accumularsi in diversi tessuti delle piante coltivate, questo processo potrebbe comportare un potenziale rischio per il consumo umano (Suk *et al.*, 2002). Questi potenziali rischi sono stati valutati mediante l'assunzione giornaliera di sostanze tossiche (*Tolerable Daily Intake*, TDI) e l'indice di rischio per la salute (*Health Risk Index*, HRI).

Per le MC, l'Organizzazione Mondiale della Sanità (World Health Organization, WHO) raccomanda un limite di dose giornaliera tollerabile (TDI) umana di 0,04 µg/kg di peso corporeo al giorno (WHO, 2020).

Le linee guida per il rischio acuto e cronico (TDI) proposte dalla US EPA (Environmental Protection Agency) sono rispettivamente 0,006 e 0,003 µg/kg di peso corporeo al giorno (US EPA, 2006). La US EPA ha sviluppato due valori di avviso sanitario per la salute di 10 giorni a 0,3 µg/L per l'esposizione dei bambini fino al primo anno di vita, e a 1,6 µg/L per l'esposizione degli adulti, fino a 21 anni di età (US EPA, 2015).

Per i rischi per la salute dei PCB, il JECFA (Joint Food and Agriculture Organization/World Health Organization Expert Committee on Food Additives), il comitato congiunto di esperti FAO/WHO sugli additivi alimentari e sui contaminanti, ha suggerito un'assunzione mensile

massima tollerabile provvisoria di 70 pg TEQ (Tossicità Equivalente) / kg (peso corporeo) / mese (JECFA, 2002).

Per ragioni pratiche, le assunzioni massime possono essere gestite come se si trattasse di un'assunzione giornaliera tollerabile (TDI) di 2 pg TEQ kg/giorno/peso corporeo (Baars *et al.*, 2004). Le linee guida provvisorie sull'assunzione giornaliera umana di Cd (cibo) sono fornite da US EPA e WHO rispettivamente con valori di 10 µg/kg/giorno (US EPA, 1999) e 25 µg/kg (peso corporeo) / mese (JECFA 2010).

Pesticidi fungicidi, erbicidi, insetticidi

Le alghe sono in grado di accumulare pesticidi attraverso tre fondamentali processi di base: il primo comprende la chimica fisica delle sostanze coinvolte.

Se il pesticida è lipofilo, come la gran parte di essi, avrà una maggiore affinità per lipidi e olii che per l'acqua (Jaffè, 1991). Perciò, tenderà ad essere assorbito dalle membrane degli organismi viventi nei corpi d'acqua, ed è probabile che venga trasferito nelle goccioline oleose all'interno delle alghe che le contengono. L'immagazzinamento dei pesticidi nelle goccioline lipidiche delle alghe è tuttavia già stato dimostrato (Baeza-Squiban *et al.*, 1987).

Il secondo processo coinvolge l'intensità dei processi di concentrazione biologica, che devono contrastare la tendenza della sostanza a diventare diluita. I processi fisiologici all'interno delle cellule spesso tendono a concentrare certe sostanze all'interno di particolari parti della cellula. Ciò favorisce un movimento delle sostanze contro il gradiente di concentrazione, vale a dire da aree a bassa concentrazione come l'ambiente acquatico che circonda la cellula, a siti di alta concentrazione all'interno della cellula.

Inoltre, alcune alghe potrebbero essere più adatte a promuovere questo trasporto a causa della peculiare distribuzione delle sostanze lipidiche e non-lipidiche all'interno delle cellule.

Una cianotossina, la N-idrossiguanidina ciclica fosforilata o guanitossina esercita tossicità attraverso l'inibizione irreversibile delle acetilcolinesterasi, in comune con i pesticidi organofosforici (Metcalf *et al.*, 2012, 2017). Non è noto se altre cianotossine abbiano le stesse modalità di azione dei pesticidi sintetici. La compresenza di cianobatteri e di pesticidi, compresi gli erbicidi, fungicidi e insetticidi, è motivo di preoccupazione per quanto riguarda le risorse idriche con un alto utilizzo da parte dell'uomo.

Ad esempio, nelle risaie i cianobatteri che fissano l'azoto possono fungere da prezioso biofertilizzante e contribuire alla produzione di riso e un obiettivo è ridurre gli impatti negativi dei pesticidi sulla crescita di cianobatteri (Singh *et al.*, 2018). Tuttavia, l'ingresso involontario nei corpi idrici di pesticidi derivanti dalle attività umane, in particolare dall'agricoltura, sembra essere un processo onnipresente.

Sono stati condotti alcuni studi sull'impatto inibitore dei pesticidi sul biota acquatico. Un'ampia indagine sugli effetti dei pesticidi su microbi acquatici includeva gli effetti di insetticidi, erbicidi e fungicidi sulla vitalità dei cianobatteri, con una inibizione della crescita complessivamente dose-dipendente (Staley *et al.*, 2015).

La maggior parte dei cianobatteri presi in considerazione in questo studio erano membri dei taxa produttori di cianotossine. Tuttavia, le indagini fino ad oggi non sembrano aver riguardato le relazioni tra pesticidi e produzione e impatti delle cianotossine.

In aggiunta al possibile contributo dei pesticidi (e metalli) all'effetto delle cianotossine nella morte di massa di fenicotteri Lesser nei laghi dell'Africa orientale (Krienitz *et al.*, 2003, 2005; Bettinetti *et al.*, 2011), sia i pesticidi che le cianotossine possono contribuire al marcato calo della popolazione di alligatori americani (*Alligator mississippiensis*) nel lago eutrofico Apopka,

Florida, caratterizzati da alta incidenza di uova non produttive e funzione endocrina anomala (Woodward *et al.*, 2011).

In uno studio di Cerbin *et al.* (2010), l'invertebrato adulto erbivoro *Daphnia pulicaria* è stato esposto al pesticida purificato carbaryl (1-naftil metilcarbammato) e in più a cellule intere di *M. aeruginosa* produttore MC in un intervallo di concentrazioni subletali (Cerbin *et al.*, 2010). La dose effettiva di MC assimilata per animale è stata stimata dall'analisi dell'intera *D. pulicaria* mediante ELISA, sebbene il dosaggio immunologico utilizzato non riesca a distinguere tra MC autentiche e una gamma di prodotti di disintossicazione da MC (Metcalf *et al.*, 2002).

Tuttavia, ad una gamma di concentrazioni subletali di carbaryl, si sono riscontrati effetti negativi sul numero di uova per femmina, la maturazione era ritardata e si è registrata mortalità della prole e malformazioni corporee con risultati negativi, amplificati dall'aggiunta di cellule di *M. aeruginosa*.

Sono state indicate azioni additive e sinergiche tra il carbaryl e le cellule cianobatteriche contenenti MC (Cerbin *et al.*, 2010). Hinojosa *et al.* hanno di recente fornito un esempio significativo degli studi necessari, quantitativi e di riferimento sulla tossicologia dei pesticidi in concomitanza con le cianotossine. Saggi biologici *in vitro*, utilizzando la linea cellulare di neuroblastoma umano SH-SY5Y, hanno valutato gli effetti dell'esposizione singola, rispetto a quella combinata, alla cilindrospermopsina purificata e al clorpirifos [O,O-dietil O-(3,5,6-tricloro-2-piridinolo) fosforotionato]. Dopo 24 e 48 ore di esposizione a concentrazioni rilevanti dal punto di vista ambientale, è stata rilevata un'azione antagonista tra il pesticida e la cianotossina (Hinojosa *et al.*, 2020).

L'erbicida glifosato [N-(fosfonometil)glicina] è l'erbicida più diffuso e usato in agricoltura ed è stato rilevato nei corpi idrici, con tossicità dimostrata (Gill *et al.*, 2017). La sua presenza nei corsi d'acqua è ben nota ed è provato il suo effetto negativo sulla crescita dei cianobatteri, compresa *Microcystis* (Zhang *et al.*, 2018). Ulteriori effetti del glifosato sui cianobatteri includono un maggiore rilascio extracellulare di MC (Wu *et al.*, 2016) con la possibilità per gli organismi di rispondere a combinazioni di MC e glifosato, come avviene per la cozza *Unio pictorium* (Malecot *et al.*, 2013).

Il glifosato agisce inibendo l'attività di un enzima chiave (5-enolpiruvil-shikimato-3-fosfato sintasi) nella via dell'acido shikimico (via metabolica in batteri, piante e alghe per la biosintesi degli aminoacidi aromatici (fenilalanina, tirosina e triptofano) dal metabolismo dei carboidrati) (Duke & Powles, 2008). Poiché la via dell'acido shikimico è essenziale per la biosintesi di vari composti aromatici legati al metabolismo e alla crescita, il glifosato è altamente efficace nel sopprimere la crescita delle erbe infestanti (Leino *et al.*, 2020).

La produzione annuale di glifosato è arrivata fino a 90×10^4 tonnellate nel 2016 (Myers *et al.*, 2016), rappresentando oltre il 30% del mercato globale totale degli erbicidi.

Il glifosato contamina gli ambienti acquatici principalmente attraverso il deflusso agricolo ed è stato ampiamente rilevato nelle acque superficiali globali (Smedbol *et al.*, 2017). Lo scarico di glifosato negli ambienti acquatici ha il potenziale per interrompere le attività fisiologiche di organismi non bersaglio che hanno la via shikimato, come le piante acquatiche, le microalghe eucariotiche, cianobatteri e batteri (Lozano *et al.*, 2018; Wu *et al.*, 2016).

Ad oggi, le risposte proteomiche dei cianobatteri al glifosato non sono state riportate. Dal momento che varie sostanze chimiche antropogeniche vengono contemporaneamente scaricate negli ambienti acquatici a causa delle attività umane, è possibile in natura trovare l'inquinamento combinato di glifosato con altri contaminanti.

Miscela di glifosato e MC-LR sono state testate nel citato lavoro di Malecot *et al.* (2013) sul mollusco d'acqua dolce *Unio pictorium*. In qualità di filtratori, le cozze d'acqua dolce sono particolarmente esposte agli inquinanti. Come molte specie di bivalvi autoctoni, *Unio pictorium* soffre di un continuo declino in Europa. Nell'ottica di acquisire una visione più approfondita della

sua risposta ai contaminanti, *U. pictorum* è stato esposto a 10 µg/L di MC-LR o alternativamente a 10 µg/L di glifosato o ad una miscela di entrambi. Le proteine delle ghiandole digestive sono state estratte e analizzate tramite la tecnologia *Differential Gel Electrophoresis* (DIGE).

L'analisi del gel ha rivelato 103 punti con variazioni statistiche e la risposta è apparsa essere minore verso il glifosato che verso la MC-LR. Specifici spot hanno mostrato variazioni solo se esposti alla miscela, dimostrando che esiste un'interazione di entrambi i contaminanti nelle risposte innescate: sono state individuate le proteine di 30 spot. Esse appartengono principalmente alla famiglia delle proteine del citoscheletro, ma anche le proteine della via ossidativa, della disintossicazione e del metabolismo energetico sono risultate influenzate dal glifosato o dalla MC-LR o dalla miscela.

Questi risultati dimostrano l'importanza di studiare i contaminanti a basse concentrazioni, rappresentative di quelli presenti nell'ambiente, e di considerare che le multicontaminazioni possono portare a differenti percorsi di risposta.

Il piriproxifene è un insetticida indicato dalla WHO per controllare la zanzara *Aedes aegypti* (vettore delle malattie Dengue, Chikungunya e Zika), tuttavia gli effetti su specie non bersaglio, come i pesci, non sono ben descritti. Le prime fasi della vita (*Early Life Stages*, ELS) dei pesci sono più sensibili alle sostanze chimiche a causa del tasso metabolico più elevato, del sistema immunitario immaturo e dell'elevato rapporto area/volume superficiale.

In uno studio di Azevedo-Linares *et al.* del 2018, ELS di *R. quelen*, un pesce neotropicale, sono stati esposti a concentrazioni ambientalmente realistiche di MC (1, 10 e 100 µg/L; gruppi M1, M2 e M3, rispettivamente) proveniente da un estratto di alghe, di piriproxifene (1 e 10 µg/L, gruppi P1 e P2) e della miscela dei due contaminanti (co-esposizione). Sono state analizzate le deformità dopo la schiusa, la sopravvivenza e lo stadio larvale ed è stato applicato un modello matematico per valutare ulteriormente gli effetti sulla dimensione della popolazione nelle varie generazioni.

Entrambi i composti si sono rivelati tossici per embrioni/larve di pesci, con effetti più pronunciati in M2, P1M2 e P2M1 per la schiusa e M2, P1M2, P2M1 e P1 per la sopravvivenza. Le deformità prevalenti nei gruppi esposti alle sostanze chimiche 48 ore dopo la fecondazione suggeriscono una interazione tossicologica in P1M2, P2M1 e P2M2 a 48 e 72 CV.

Nei gruppi esposti alle sostanze chimiche 96 ore dopo la fecondazione, i livelli di deformità erano inferiori rispetto ai precedenti. Il modello di previsione della densità di popolazione su 100 anni ha dato come risultato una diminuzione di 0,5 (50%) in tutti i gruppi, ad eccezione di P1M1, rilevando così il rischio di estinzione. Il gruppo P1M2 ha avuto i risultati peggiori, seguito da M2, P1M3 e P2M1. Le fioriture di cianobatteri possono comportare livelli di MC-LR superiori a M2 (10 µg/L), e il suggerimento di un'interazione tossicologica con il piriproxifene si è dimostrato rilevante perché entrambi i composti possono potenzialmente coesistere negli ambienti acquatici. Infine, i modelli matematici possono fornire un'interpretazione ecologica del rischio di esposizione dei pesci.

La tossicità e l'attività di promozione tumorale sono state riportate sia per PCB complanari che non complanari senza attività di legame AhR, come il PCB 153 (Lavoie *et al.*, 1994; Kopec *et al.*, 2010). È stata inoltre dimostrata la cancerogenicità del Fluorantrene (FLU) (Busby *et al.*, 1984). È interessante notare che sia il PCB 153 che il FLU hanno dimostrato di indurre una rapida inibizione della comunicazione intercellulare giunzionale gap (*Gap Junctional Intercellular Communication*, GJIC) (Blaha *et al.*, 2002; Machala *et al.*, 2003), che potrebbe essere un meccanismo coinvolto nell'attività di promozione del tumore e nella tossicità di queste sostanze chimiche. Questi risultati sono stati confermati nello studio di Bartova, che ha anche fornito nuove informazioni sull'additività dei loro effetti inibitori.

Particelle e contaminanti microplastici e nanoplastici

L'inquinamento ambientale e l'accumulo di plastica nell'ambiente stanno diventando una preoccupazione crescente, dato il costante aumento della produzione di plastica e il rilascio di diversi contaminanti antropogenici nell'ambiente. I rifiuti organici stanno causando l'eutrofizzazione dei corpi idrici, che, insieme al cambiamento climatico, crea condizioni favorevoli per un'ampia proliferazione di cianobatteri.

La presenza globale di particelle microscopiche di plastica (microplastiche) negli oceani del mondo è stata riconosciuta da diversi anni (Moore *et al.*, 2008) e la loro ulteriore presenza nelle feci umane, in laghi d'acqua dolce e fiumi, acque sotterranee ed estuari sta diventando sempre più nota (Yokota *et al.*, 2017. Yao *et al.*, 2020).

I Cianobatteri sia in ambienti marini che d'acqua dolce fanno parte della vasta gamma di microbi che, insieme alle particelle minerali, si attaccano alle microplastiche, formando un biofilm. L'adesione dei microbi, con successivo sviluppo di uno strato polisaccaridico extracellulare, può contribuire alle proprietà di affondamento o galleggiamento di questi complessi, e all'ulteriore assorbimento di metalli, in particolare ferro e manganese (Leiser *et al.*, 2020) Tra i rischi tossicologici rappresentati dalle microplastiche che si accumulano nelle risorse idriche ci sono i contaminanti del bifenolo che interferiscono con il sistema endocrino, inclusi i bifenoli A, S, F e AF (Feng *et al.* 2020).

La cilindropermissina (CYN) è un forte candidato per la valutazione della tossicità in combinazione con bifenoli poiché la sua ampia presenza geografica nelle acque dolci sta diventando più evidente, un'alta percentuale del pool totale di CYN è extracellulare quando le cellule di *C. raciborskii* produttrici sono ancora intatte, e la cianotossina mostra un'ampia gamma di azioni, tra cui epatotossicità, inibizione della sintesi proteica, genotossicità e potenziale cancerogenicità (Metcalf *et al.*, 2012; Buratti *et al.*, 2017; Hercog *et al.*, 2020).

Di conseguenza, l'esposizione a miscele di cianotossine e contaminanti legati alla plastica come i bifenoli (BP) desta crescente preoccupazione. Un complesso di interazioni tra CYN purificata e bifenoli è stato riscontrato in saggi biologici in vitro utilizzando cellule HepG2. Lo studio di Hercog *et al.* (2020) descrive gli effetti genotossici indotti dalla co-esposizione a CYN (0,5 µg/mL), una delle cianotossine emergenti, e i BP (10 µg/mL) (Bifenolo A, BPA; S, BPS; e F, BPF) in cellule HepG2 dopo 24 e 72 ore di esposizione.

Sono state valutate la citotossicità e la genotossicità attraverso la misurazione dell'induzione di rotture del doppio filamento (DSB) del DNA con il saggio H2AX. Nessuno dei BP da solo ha ridotto o indotto la vitalità cellulare. Nessuna differenza significativa è stata osservata tra le cellule esposte a CYN e CYN/BP, eccetto con CYN/BPA, in cui è stata rilevata l'attività antagonista del BPA contro CYN.

La deregolamentazione di alcuni dei geni testati (CYP1A1, CDKN1A, GADD45A e GCLC) era più pronunciata dopo l'esposizione alle miscele CYN/BP rispetto ai singoli composti, suggerendo che esista un'azione additiva o sinergica. Questo studio conferma l'importanza degli studi di co-esposizione a miscele inquinanti visto il manifestarsi di effetti diversi da quelli confermati per l'esposizione ai singoli composti (Hercog *et al.*, 2020).

Nessun saggio biologico che coinvolga MC purificate con micro o nanoplastiche è già disponibile, anche se interazioni tossicologicamente significative sono state segnalate tra nanoplastiche e cellule di *Microcystis aeruginosa* (Feng *et al.*, 2020) ed è anche noto che le plastiche legano le MC in soluzione (Hyenstrand *et al.*, 2001, 2001) e le nanoparticelle di plastica possono anche legare il glifosato (Zhang *et al.*, 2018).

Le nanoplastiche di polistirene amminico modificate aumentano la produzione di MC da parte delle cellule cianobatteriche e aumentano anche il rilascio extracellulare della/e tossina/e secondo dosaggio immunologico della MC. La prevalenza e la vicinanza di microplastiche, nanoplastiche

e cianobatteri (Yokota *et al.*, 2017; Yao *et al.*, 2020, Leiser *et al.*, 2020), e la diffusa capacità di questi ultimi di produrre MC (Meriluoto *et al.*, 2017; Svircev *et al.*, 2017 e 2019, Buratti *et al.*, 2017; Metcalf *et al.*, 2019), richiedono ulteriori ricerche sulle interazioni tossicologiche di questi composti sintetici onnipresenti, e naturalmente sui rischi biologici per la salute.

Farmaci

Attraverso il consumo di acqua potabile contaminata o da attività ricreative come il nuoto, gli esseri umani sono esposti a MC-LR combinata con altri inquinanti dell'acqua piuttosto che a MC-LR da sola (Swanson & Hammer, 2000). La comprensione degli effetti reali delle miscele di inquinanti chimici sull'uomo è una delle principali preoccupazioni per la salute pubblica (Monosson, 2005). Prodotti farmaceutici e per la cura della persona (*Pharmaceutical And Personal Care Products*, PPCP), compresi farmaci da prescrizione, farmaci da banco (antibiotici, farmaci antinfiammatori, sedativi), e cosmetici (metalli pesanti), vengono rilevati in acqua superficiale, falde acquifere, fiumi, laghi, suolo e cibo (Wang *et al.*, 2014).

Diversi studi sull'inquinamento idrico hanno dimostrato che la contaminazione più pervasiva si trova in Cina (Liang *et al.*, 2013; Wu *et al.*, 2011). I composti farmaceutici più comuni nell'ambiente sono antibiotici, farmaci antinfiammatori, lipidi regolatori, farmaci antitumorali, steroidi e ormoni correlati (testosterone) (Nikolaou *et al.*, 2007; Richardson & Terne, 2011, 2014). Queste sostanze chimiche sono ampiamente utilizzate e rilasciate nell'ambiente e possono avere effetti tossici sugli organismi viventi, compresi gli esseri umani (Subedi *et al.*, 2012). La MC-LR prodotta dai cianobatteri è la tossina più potente presente in natura (Graham *et al.*, 2010). Gli ecosistemi d'acqua dolce sono contaminati in modo severo dai cianobatteri in Cina (Srivastava *et al.*, 2013).

La contaminazione dell'acqua potabile o superficiale presenta un pericolo significativo per la salute umana, essendo causa di necrosi epatica ed emorragie.

Il Cloramfenicolo (CAP) è largamente utilizzato nella pratica veterinaria come antibiotico ad ampio spettro contro una varietà di patogeni. L'utilizzo sistemico o topico può causare effetti avversi fatali negli esseri umani, inclusa l'anemia aplastica (Page, 1991). L'uso del CAP negli animali da produzione alimentare era espressamente vietato negli Stati Uniti e nell'Unione Europea (UE) sin dal 1994 (Stolker & Brinkman, 2005). Tuttavia, l'uso illegale del CAP provoca l'inquinamento dei fiumi e delle risorse idriche utilizzate per approvvigionamento di acqua potabile (Wang *et al.*, 2014).

Il Testosterone (T) è un ormone steroideo del gruppo degli androgeni. Sebbene possa essere benefico per la salute, l'abuso di T è diffuso nella società odierna. Viene somministrato ad animali negli allevamenti di pollame e zone di allevamento ittico per migliorare il tasso di crescita. Tuttavia, T interrompe le normali funzioni fisiologiche e interferisce con la fertilità. Inoltre si diffonde nell'ambiente, riducendo la qualità dell'acqua e danneggiando l'ambiente e la salute umana (Kolpin *et al.*, 2002).

Più antibiotici vengono contemporaneamente scaricati negli ambienti acquatici dopo un ampio utilizzo in medicina umana, agricoltura e acquacoltura (Yang *et al.*, 2018), esponendo così gli organismi acquatici a miscele miste. Le miscele di antibiotici stimolano la fotosintesi, la crescita e la produzione di MC in *M. aeruginosa* ai livelli di contaminazione attualmente segnalati (ng/L) (Jiang *et al.*, 2020b; Liu *et al.*, 2017). Diversi contaminanti possono agire in modo additivo, sinergico o antagonistico negli organismi acquatici (De Stefano *et al.*, 2018). Tuttavia, gli effetti combinati della contaminazione da antibiotici e glifosato nei cianobatteri non sono stati indagati. Una singola esposizione al glifosato o ad un antibiotico può facilitare la crescita dei cianobatteri a causa dell'ormesi.

Tuttavia, l'influenza di questi contaminanti sui cianobatteri non è stata studiata in condizioni di esposizione combinata. In uno studio di Xu *et al.* del 2021 sono stati studiati i meccanismi proteomici degli effetti combinati di glifosato e di una miscela di antibiotici quaternari (amoxicillina, sulfametossazolo, tetraciclina e ciprofloxacina) su un cianobatterio dominante che forma fioritura (*Microcystis aeruginosa*) e sono stati confrontati con quelli per esposizione singola al glifosato. Il tasso di crescita di *M. aeruginosa*, l'attività fotosintetica indicata da Fv/Fm (Valore della fluorescenza variabile in rapporto alla fluorescenza massima, rappresenta la massima efficienza quantistica potenziale del Fotosistema II se tutti i centri di reazione capaci fossero aperti) e la capacità di produzione di MC hanno mostrato una tipica dose-risposta ormetica a forma di U all'esposizione al glifosato.

Proteine sovraregolate relative alla fotosintesi e alla biosintesi, nonché l'aumento dell'attività fotosintetica, sono state responsabili della stimolazione della crescita indotta da 0,1 e 5 µg/L di glifosato, mentre la sovraregolazione della proteina mcyB ha contribuito all'aumento della sintesi della MC nelle cellule trattate con glifosato.

La presenza di una miscela di antibiotici a 0,04 e 0,2 µg/L ha migliorato significativamente ($p < 0,05$) gli effetti di stimolazione del glifosato. L'esposizione combinata al glifosato e agli antibiotici misti ha promosso la sintesi della MC attraverso la sovraregolazione di sei proteine regolatrici della sintesi di MC (mcyC, mcyF, mcyG, mcyI, MAE_56520 e ntcA) e ha stimolato la crescita dei cianobatteri attraverso la sovraregolazione delle proteine coinvolte nella fotosintesi, nella divisione cellulare, nella fissazione del carbonio, nel pentoso fosfato, nella traduzione e nella sintesi della clorofilla.

L'esposizione combinata a glifosato e contaminanti antibiotici promuove la crescita di cianobatteri a concentrazioni prive di effetti con esposizione singola (0,04 µg/L per antibiotici misti; 0,05, 10 e 100 µg/L per glifosato), suggerendo che ci sia una maggiore minaccia per gli ecosistemi acquatici, dovuta alla contaminazione combinata dato l'effetto promuovente la formazione di fioriture cianobatteriche.

In un lavoro di Ma *et al.* del 2017, è stata esaminata la possibile sinergia tra MC, estradiolo e ractopamina. È noto che l'estradiolo (EST), un importante ormone sessuale femminile, abbia effetti benefici sulle donne a causa della sua elevata attività antiossidante. Tuttavia, l'esposizione prolungata all'EST aumenta il rischio di sviluppare il cancro al seno e all'utero (Luke *et al.*, 2001).

Il fegato è il sito principale del metabolismo degli EST, compresa la formazione e la disintossicazione degli estrogeni catecolici. Oltre all'effetto cancerogeno ben caratterizzato dell'EST, è stata accertata anche la sua citotossicità (Bechi *et al.*, 2013). L'EST, distribuito nelle acque reflue, superficiali, sotterranee e anche nell'acqua potabile, deriva principalmente dalla fertilizzazione dei terreni agricoli e dallo scarico delle acque reflue.

Gli studi hanno dimostrato che il contenuto di EST nelle acque superficiali può raggiungere 4 ng/L (0,0147 nM) (Kuch & Ballschmiter, 2001). La concentrazione di EST nelle acque sotterranee e superficiali vicino agli allevamenti di pollame è significativamente più alta, raggiungendo 6-66 ng/L (0,022-0,242 nM) nelle acque sotterranee e 50-2300 ng/L (0,184-8,443 nM) nelle acque superficiali (Peterson *et al.*, 2000, Finlay-Moore *et al.*, 2000).

La ractopamina (RAC), un efficace beta-agonista sintetizzato artificialmente, promuove la crescita animale accelerando l'accrescimento della massa muscolare scheletrica e diminuendo la deposizione di grasso corporeo (Brambilla *et al.*, 2000, Dong *et al.*, 2012). Sfortunatamente, questo composto è illegalmente applicato come agente di riparto dei nutrienti all'interno dell'industria zootecnica cinese per deviare i nutrienti dalla deposizione di grasso alla produzione muscolare (Re *et al.*, 1997).

Sono stati segnalati numerosi potenziali effetti di avvelenamento e rischi dovuti alla RAC, inclusi cardiopalma, tachicardia, ansia, smarrimento e tremori muscolari (Kuiper-Goodman *et al.*, 1999). Questo composto è un agente di ripartizione della fenetanolamina con proprietà agonista

beta-adrenergico e viene utilizzato per promuovere la magrezza negli animali da carne, in particolare nei suini.

La RAC è approvata negli Stati Uniti per l'uso nei suini ai fini di migliorare la magrezza dell'animale, ma è vietata nell'Unione Europea e in Cina perché i residui di RAC possono comportare rischi per la salute.

Tuttavia, molti allevamenti di suini utilizzano la RAC illegalmente, con conseguente residuo di RAC nei prodotti a base di carne di maiale e nelle urine. Il rilevamento di RAC residua nell'urina di maiale è stato riportato in modo coerente (Qu *et al.*, 2011, Wang *et al.*, 2010, Zhai *et al.*, 2011). Il residuo RAC nell'urina di maiale può infiltrarsi nell'ambiente idrico mediante lavaggio a pioggia, con conseguente inquinamento misto di MC-LR, EST e RAC. Come affermato sopra, gli effetti combinati di questi inquinanti dell'acqua sono sconosciuti.

Gli attuali metodi di valutazione del rischio si concentrano generalmente sull'esame di singole sostanze chimiche, che possono sottostimare il rischio associato all'azione delle miscele tossiche. La ricerca sugli effetti congiunti della MC-LR può fornire la base teorica per una rilevazione precoce di MC-LR e fornire uno standard di riferimento più accurato per determinare un limite massimo di MC-LR. A causa del loro ruolo chiave nell'inquinamento idrico intensivo, sono stati valutati i potenziali effetti collaterali di questi farmaci combinati (Mesnage *et al.*, 2013).

Le cellule HepG2 sono state selezionate per questa indagine a causa della loro origine umana e della loro conservazione di molte delle funzioni epatiche specializzate e delle attività enzimatiche di metabolizzazione dei farmaci presenti negli epatociti umani (Pinti *et al.*, 2003, Dehn *et al.*, 2004). Questa linea cellulare è ampiamente utilizzata negli studi di citotossicità perché ha capacità biosintetiche simili a quelle dei normali epatociti e capacità di risposta dei recettori della superficie cellulare simili alle cellule normali. Inoltre, la disintossicazione e il processo di attivazione dei composti sono studiati in modo ottimale nelle cellule del fegato.

La MC-LR è principalmente epatotossica, ma alcuni articoli hanno descritto un'attività nefrotossica in vivo nei ratti (Nobre *et al.*, 1999; Milutinovic *et al.*, 2003).

Nello studio è stata valutata la citotossicità nelle cellule HepG2 trattate con dosi singole o combinate di MC-LR, EST e RAC in base all'aumento di concentrazione (CA), all'azione indipendente (IA) e al metodo dell'indice di combinazione (CI) di Chou-Talalay. MC-LR ed EST applicati singolarmente hanno indotto la proliferazione cellulare HepG2 a bassi livelli di concentrazione (1×10^{-12} - 1×10^{-9} M) e una ridotta vitalità a dosi di esposizione più elevate (1×10^{-9} - 1×10^{-6} M). L'esposizione a miscele binarie o ternarie di MC-LR, EST e RAC ha mostrato effetti sinergici ad alte concentrazioni, indipendentemente dai modelli utilizzati.

Al contrario, è stato osservato antagonismo per la miscela di MC-LR ed EST a concentrazioni relativamente basse. È stato osservato un effetto sinergico sulla generazione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) per i farmaci combinati ad alte concentrazioni. Inoltre, il rapporto delle cellule apoptotiche risulta incrementato maggiormente dai farmaci combinati rispetto ai singoli farmaci, coerentemente con l'inibizione della vitalità cellulare.

L'aumento di ROS dopo il trattamento con i farmaci combinati può aumentare la citotossicità e successivamente portare all'apoptosi cellulare. Date le interazioni tra MC-LR, EST e RAC, gli standard normativi governativi per MC-LR dovrebbero considerare le interazioni tossicologiche tra MC-LR e altri inquinamenti ambientali.

La combinazione di paclitaxel (Taxol, Abraxane) e carboplatino (Paraplatino) è diventata importante nel trattamento antineoplastico del cancro dei polmoni negli ultimi due decenni.

Nel frattempo, anche l'uso di rimedi erboristici e/o integratori alimentari durante il trattamento del cancro è in crescita tra questi pazienti, contribuendo molte volte ad eventi fatali. Tra molte specie medicinali (o non medicinali) vendute con questo scopo: aloe, alghe, funghi come *Corylus* o Reishi (funghi), il cardo (*Sylibum marianum*) e la curcuma (*Curcuma longa*) sono i più popolari. Quest'ultima è tossica al di sopra di 8 g/die e inibisce il citocromo P450 (CYP) 1A2, 2C9 e gli

enzimi 3A4 (Al-Jenoobi *et al.*, 2015), che sono necessari per impedire nelle concentrazioni plasmatiche di paclitaxel il raggiungimento di livelli che possano compromettere la funzionalità epatica.

Il Cardo mariano è anche un importante inibitore del CYP 2C9 (Budzinski *et al.*, 2007; Etheridge *et al.*, 2007) perché compromette la metabolizzazione di questo farmaco. Allo stesso modo, integratori dietetici come Spirulina (cianobatterio) e Chlorella sono stati commercializzati a causa dei loro presunti effetti benefici nella “disintossicazione”, nella stimolazione della funzione immunitaria e nella lotta contro il cancro (Gilroy *et al.*, 2000; Cavaliere *et al.*, 2010). Tuttavia, i prodotti di ceppi di cianobatteri anche normalmente non produttori di tossine, possono contenere la MC-LR (Iwasa *et al.*, 2002; Valério *et al.*, 2016).

La MC-LR ha il potenziale per promuovere la crescita del tumore durante l’esposizione cronica a basso livello (Al-Jenoobi *et al.*, 2015; Solter *et al.*, 1998; Fujiki & Suganuma, 2009). La contaminazione da MC-LR nell’acqua potabile è stata associata ad un’elevata incidenza di cancro al fegato (Lawton *et al.*, 1994; Pinheiro *et al.*, 2013).

In uno studio di Costa *et al.* del 2018, è stato esaminato il caso di un uomo caucasico di 67 anni con cancro ai polmoni ricoverato al Pronto Soccorso con astenia, anoressia, ittero e coluria.

Il cancro del polmone del paziente era stato curato farmacologicamente con una combinazione di paclitaxel/carboplatino con frequenza bimestrale. Il paziente si stava anche automedicando con diversi prodotti naturali, tra cui clorella (520 mg/die), *Silybum marianum* (totale di 13,5 mg di silimarina/die), solfato di zinco (5,5 mg), selenio (50 µg) e 15 g/die di *Curcuma longa*.

Nel primo ciclo di chemioterapia non era stata osservata tossicità e il paziente stava assumendo altri farmaci come budesonide e sitagliptin. Gli eventi tossici sono iniziati solo dopo l’introduzione dei prodotti dietetici.

La clorella presentava una contaminazione con cianobatteri (*Oscillatoriales*): sono stati trovati 1,08 µg di MC-LR per grammo di biomassa. Il paziente consumava circa 0,01 µg di MC-LR/kg/giorno.

Questo *case report* descrive il primo caso noto di tossicità da paclitaxel probabilmente correlato all’interazione farmacocinetica con la curcuma e un integratore di clorella contaminato, con conseguente epatite tossica acuta e impatto sulla salute del paziente oncologico.

Nitriti

In uno studio del 2018 di Lin *et al.*, per valutare gli effetti tossici combinati di MC-LR e nitriti su patologie epatiche, perossidazione lipidica e risposte antiossidanti dei pesci, esemplari di pesce zebra maschi adulti (*Danio rerio*) sono stati esposti a soluzioni di diverse concentrazioni combinate di MC-LR (0, 3, 30 mg/L) e nitriti (0,2, 20 mg/L) per 30 giorni.

I risultati hanno mostrato che le lesioni patologiche epatiche progredivano in gravità e misura con l’aumento della concentrazione del fattore singolo (MC-LR o nitriti) e diventavano più gravi dopo la co-esposizione ai due fattori.

Allo stesso tempo, significativi aumenti della malondialdeide (MDA) hanno rivelato la presenza di stress ossidativo causato da MC-LR, nitriti o entrambi, indirettamente verificata da notevoli diminuzioni della capacità antiossidante totale (T-AOC) nonché della trascrizione e dell’attività di enzimi antiossidanti (CAT e GPx).

I mitocondri epatici risultavano danneggiati come sito d’azione comune di MC-LR e nitrito, suggerendo che lo stress ossidativo svolga un ruolo significativo nei meccanismi dell’epatotossicità di MC-LR e nitriti.

L’esaurimento del glutatone epatico (GSH) indica l’importanza del sistema GSH/glutathione-S-transferasi (GST) nella disintossicazione da queste due sostanze chimiche. Questi risultati

illustrano chiaramente che MC-LR e nitriti hanno effetti sinergici sull'istostruttura, sulla capacità antiossidante e sulla capacità di disintossicazione nel fegato del pesce zebra.

Pertanto, l'inquinamento combinato di MC-LR e nitriti nei laghi eutrofici può ridurre il meccanismo di difesa dei pesci e accelerarne il consumo di GSH, compromettendo la sopravvivenza del pesce durante gli episodi di prolungate fioriture di cianobatteri.

Detergenti: alchilbenzensolfonato

L'alchilbenzensolfonato (LAS), un tensioattivo anionico ampiamente utilizzato per applicazioni industriali e domestiche, e la MC-LR sono ampiamente distribuiti in ecosistemi di ambienti terrestri e acquatici, ma i loro effetti ecotossicologici combinati erano sconosciuti (Wang *et al.*, 2011). Dopo le indagini sugli effetti tossici di MC-LR, LAS e della loro miscela in *Lactuca sativa*, e dopo aver valutato il grado di accumulo di MC-LR nella lattuga con o senza LAS, Wang *et al.* (2011) hanno osservato cambiamenti nella germinazione dei semi e nella crescita delle radici, dove la crescita delle piantine era più sensibile che nella germinazione all'esposizione tossica.

Questi risultati hanno suggerito l'esistenza di un'interazione sinergica tra MC-LR e LAS.

In un altro lavoro di Wang *et al.* (2012) sono stati esaminati gli effetti di MC-LR, LAS e la loro miscela sulla crescita della lenticchia d'acqua (*Lemna minor*) e sulle risposte fisiologiche. È stato anche esaminato l'accumulo di MC-LR nella lenticchia d'acqua, con o senza LAS. La crescita e il contenuto di clorofilla *a* della lenticchia d'acqua è stata significativamente ridotta dopo 8 giorni di esposizione ad alte concentrazioni di MC-LR ($\geq 3 \mu\text{g/mL}$), di LAS ($\geq 20 \mu\text{g/mL}$) e della loro miscela ($\geq 3+10 \mu\text{g/mL}$).

Dopo 2 giorni di esposizione, l'attività della superossido dismutasi e il contenuto di glutazione nella lenticchia d'acqua sono aumentati con l'aumento delle concentrazioni di MC-LR, LAS e della loro miscela, con una differenza significativa osservabile dopo 8 giorni di esposizione. Quando le concentrazioni di MC-LR e LAS erano inferiori ($\leq 0,1+1 \mu\text{g/mL}$), l'interazione tra loro risultava sinergica, ma quando le concentrazioni erano più elevate, la sinergia era debole. L'accumulo di MC era molto più alto a 2 giorni rispetto a 8 giorni quando la lenticchia d'acqua era esposta a concentrazioni inferiori di MC-LR ($\leq 3 \mu\text{g/mL}$) o MC-LR e LAS ($\leq 3+10 \mu\text{g/mL}$).

Inoltre, il LAS incrementava significativamente l'accumulo di MC-LR nella lenticchia d'acqua, anche con concentrazioni di LAS fino a $0,3 \mu\text{g/mL}$ (concentrazione ambientale), indicando che nell'acqua contenente contemporaneamente MC-LR e LAS potrebbero verificarsi maggiori rischi ecologici.

Idrocarburi Policiclici Aromatici

Il mar Mediterraneo può anche essere considerato come cronicamente inquinato dal petrolio (Davenport, 1982) Palline galleggianti di catrame del diametro di 10 mm sono la caratteristica forma di contaminazione, rappresentante una particolare minaccia per le componenti neustoniche del plancton, presenti nello strato dei primi 25 cm sotto la superficie. La fauna e la flora attaccate alle palline di catrame rendono conto per il 20-30% della biomassa del neuston, rappresentando una significativa eutrofizzazione di questo ambiente (Davenport, 1982) Va sottolineato che le palline di catrame e gli aggregati di petrolio sono la manifestazione dominante della contaminazione da petrolio nelle acque oceaniche, riflettente la rete globale del traffico navale (Levy *et al.*, 1981).

Il petrolio è costituito da una complessa miscela di macromolecole tra cui gli IPA, composti tossici il cui apporto nell'ambiente è aumentato notevolmente nel XX secolo (Kopp *et al.*, 2014).

A causa della loro lipofilia, essi hanno il potenziale per accumularsi negli organismi (Hu *et al.*, 2010; Takeuchi *et al.*, 2009) con potenti proprietà mutagene, teratogene e cancerogene, nonché attività di distruzione endocrina (Santodonato *et al.*, 1997; Mnif *et al.*, 2011).

Gli IPA nei pesci vengono rapidamente metabolizzati in composti intermedi, che si legano al DNA del fegato o formano coniugati per il trasferimento alla bile (Collier *et al.*, 1991; Livingstone *et al.*, 1998).

La coesistenza di MC e IPA nelle acque dolci eutrofiche è un fenomeno comune dovuto alla grave eutrofizzazione e all'inquinamento antropogenico.

Ad esempio, livelli significativi di questi sono stati rilevati nei laghi, come i laghi Taihu e Chaohu in Cina (Su *et al.*, 2015; Yang *et al.*, 2006; Yuan *et al.*, 2019).

Inoltre, uno studio di Zhang *et al.* (2018) ha dimostrato che la contaminazione da IPA potrebbe promuovere la produzione di MC nelle fioriture di cianobatteri, aumentando così le opportunità della loro coesistenza.

Tuttavia, nessuno studio ha finora esaminato gli effetti combinati di MC e IPA sul biota acquatico.

Nello studio di Wan *et al.* del 2019, il fenantrene (Phe) è stato selezionato come modello IPA a causa del suo alto tasso di rilevamento e dell'elevata concentrazione negli ambienti acquatici (Li *et al.*, 2017).

La specie ampiamente distribuita di *Lemna gibba* è stata scelta come pianta modello per studiare gli effetti tossici combinati di MC-LR e Phe sulle piante acquatiche.

In questo studio *L. gibba* è stata esposta a una gamma di concentrazioni di MC-LR rilevanti per l'ambiente (5, 50, 250, 500 µg/L) e di Phe (0,1, 1, 5, 10 µg/L), sia individualmente che in miscele di MC-LR + Phe (5 + 0,1, 50 + 1, 250 + 5, 500 + 10 µg/L).

Successivamente, in *L. gibba* sono stati analizzati biomarcatori di tossicità come crescita, clorofilla *a* e attività enzimatica antiossidante (catalasi, superossido dismutasi e perossidasi).

La crescita e il sistema antiossidante di *L. gibba* non sono stati significativamente inibiti dal solo Phe, mentre concentrazioni più elevate di MC-LR da sola (≥ 50 µg/L) hanno inibito significativamente la crescita e indotto lo stress ossidativo. Sulla base della formula di Abbott (che normalmente valuta l'efficacia di un prodotto insetticida) i loro effetti di interazione erano dipendenti dalla concentrazione. Sono stati osservati effetti antagonisti per esposizione a combinazioni di concentrazioni inferiori di MC-LR e Phe ($\leq 50 + 1$ µg/L), mentre effetti additivi o sinergici sono stati indotti a concentrazioni più elevate di entrambi i composti ($\geq 250 + 5$ µg/L).

Inoltre, concentrazioni più elevate di Phe (≥ 5 µg/L) hanno aumentato l'accumulo di MC-LR in *L. gibba*.

Questi risultati suggeriscono che gli effetti tossici di MC-LR e fenantrene vengono esacerbati quando essi coesistono nei corpi idrici a concentrazioni relativamente elevate.

I risultati di un recentissimo lavoro di Wan *et al.* (2021) consolidano queste conclusioni: in questo studio sono stati esaminati gli effetti tossici singoli e misti delle miscele di MC-LR e Phe in *Daphnia magna* a seguito di esposizioni acute e croniche. I test acuti hanno mostrato che le concentrazioni efficaci mediane (48 h) per MC-LR, Phe e le loro miscele erano rispettivamente di 13,46, 0,57 e 8,84 mg/L.

I risultati della previsione di tossicità della miscela hanno evidenziato che il modello di azione indipendente era più applicabile del modello di addizione di concentrazione. Inoltre, il metodo dell'indice di combinazione ha suggerito che la tossicità della miscela dipendeva dalla concentrazione. Il sinergismo era suscitato a basse concentrazioni di esposizione a MC-LR e Phe ($\leq 4,04 + 0,17$ mg/L), mentre gli effetti antagonisti o additivi erano indotti a concentrazioni più

elevate. Il meccanismo coinvolto di antagonismo era presumibilmente attribuibile agli effetti protettivi dei geni di disintossicazione attivati da alte concentrazioni di MC-LR nelle miscele.

Inoltre, i risultati cronici hanno anche mostrato che l'esposizione a una miscela MC-LR e Phe a basse concentrazioni ($\leq 50 + 2 \mu\text{g/L}$) ha provocato maggiori effetti tossici sulla storia della vita di *D. magna* rispetto a una delle due sostanze chimiche che agiscono da sole. La significativa inibizione sui geni di disintossicazione e l'aumento dell'accumulo di MC-LR potrebbero essere spiegati come effetti tossici sinergici su *D. magna*. Questi risultati hanno evidenziato il rischio ecologico esacerbato di MC-LR e Phe a concentrazioni ambientali ($\leq 50 + 2 \mu\text{g/L}$) e hanno fornito nuove informazioni sui potenziali meccanismi tossici di MC-LR e Phe negli animali acquatici.

Uno studio del 2011 di Bartova *et al.* si è concentrato sulla valutazione degli effetti di miscele binarie di contaminanti antropici (fluorantene (FLU) e IPA); 2,2',4,4',5,5'-esaclorobifenile (PCB 153) ed estratti di biomassa di due ceppi di cianobatteri (*Aphanizomenon gracile* e *Cylindrospermopsis raciborskii*) produttori tossine (MC-LR e CYN). Questi effetti della miscela sono stati valutati in cellule staminali di fegato di ratto WB-F344 utilizzando la valutazione della comunicazione intercellulare giunzionale gap (GJIC), in cui la sua inibizione è un importante marker di promozione del tumore non genotossico (Trosko, 2007).

MC-LR è stata identificata come promotore tumorale (Dietrich, 2005) e anche CYN ha rivelato capacità cancerogene (Falconer & Humpage, 2006). Nello studio di Bartova non sono state ricercate le tossine cianobatteriche secondarie, ed è stato interessante notare che nessuno dei campioni di cianobatteri testati conteneva MC-LR e CYN, ipotizzando la presenza di altri composti bioattivi e tossici prodotti dai cianobatteri.

Il risultato più notevole di questo studio è l'effetto di contaminanti antropogenici in miscele binarie con estratti di cianobatteri, dove sono stati osservati forti effetti sinergici su GJIC in tutte le combinazioni testate e in tutti i tempi di esposizione. È interessante notare che gli effetti sinergici sono stati riportati per miscele di IPA e metalli (Feng *et al.*, 2003) e IPA e PCB (Wassenberg & Di Giulio, 2004), ma gli effetti delle miscele di tossine da cianobatteri (o cianotossine) e altri contaminanti ambientali sono stati finora solo raramente indagati.

L'ampia presenza di IPA nei laghi richiede una migliore comprensione dei cianobatteri soggetti a contaminazione da IPA. In uno studio di Zhang *et al.*, 2018 il ceppo di *M. aeruginosa* PCC7806 è stato selezionato per studiare gli effetti del naftalene e del pirene sulle reazioni fisiologiche e biochimiche dei cianobatteri, compreso il sistema di difesa antiossidante (superossido dismutasi, catalasi), il contenuto di microcistina intracellulare (MC), il contenuto di ficobiliproteine (ficocianina, alloficocianina) e il tasso di crescita specifico.

Il naftalene e il pirene hanno alterato la crescita del ceppo di *M. aeruginosa*, ridotto il contenuto di ficocianina e alloficocianina, e stimolato le attività degli enzimi antiossidanti senza perossidazione lipidica. Sorprendentemente, il contenuto intracellulare di MC è stato significativamente aumentato del 68,1% dopo l'esposizione di *M. aeruginosa* a 0,45 mg/L di naftalene, ed è aumentato del 51,5% e del 77,9% dopo l'esposizione di *M. aeruginosa* al pirene (rispettivamente 0,45 mg/L e 1,35 mg/L, $P < 0,05$).

Inoltre sono state osservate correlazioni significative tra queste reazioni fisiologiche, dato che una serie di reazioni fisiologiche e biochimiche in *M. aeruginosa* hanno lavorato insieme contro la contaminazione da IPA.

Considerando che le MC sono le tossine cianobatteriche più studiate, questi risultati hanno chiarito che la promozione della produzione di MC dovuta dalla contaminazione da IPA non può essere trascurata quando si fa riferimento a valutazioni del rischio delle acque eutrofiche.

Virus, funghi tossici, batteri, protozoi

È già noto che l'effetto tossico di una sostanza può essere modificato attraverso l'esposizione simultanea ad altri agenti, e l'esposizione combinata a più tossine spesso ha un risultato diverso da quello che ci si aspetterebbe semplicemente aggiungendo gli effetti dei singoli componenti (Silins & Högberg, 2011). Questo vale anche per le tossine cianobatteriche, come mostrato dal lavoro di Palikova *et al.* (2012) sull'esposizione combinata della carpa (*Cyprinus carpio* L.) alla biomassa cianobatterica e all'agente patogeno della macchia bianca (*white spot disease*), che ha avuto un effetto additivo sul sistema immunitario dei pesci.

Mentre i singoli agenti sembravano stimolare una risposta immunitaria, la combinazione di entrambi furono causa di immunosoppressione (cioè una diminuzione della conta leucocitaria e dell'intensità dell'attività fagocitica insieme a una diminuzione non significativa del livello delle immunoglobuline totali). D'altra parte, l'esposizione combinata ai cianobatteri e al virus SVC (*Spring Viraemia of Carp*) ha portato alla stimolazione della risposta immunitaria specifica nella carpa, apparentemente dovuta a temperature dell'acqua ottimali. Questo processo probabilmente gioca un ruolo importante nell'accumulo di tossine nell'epatopancreas, così come nella loro eliminazione (Soukupová *et al.*, 2014).

Durante lo studio dell'esposizione combinata a biomassa cianobatterica, piombo e virus Newcastle nella Quaglia giapponese (*Coturnix coturnix japonica*), Pikula *et al.* (2010) non hanno osservato mortalità e segni clinici di tossicità negli individui esposti alla sola biomassa cianobatterica, ma hanno osservato mortalità a seguito di esposizione combinata, con effetti acuti osservati circa 10 giorni dopo l'esposizione.

Il significato per la salute umana dell'esposizione alla tossina fungina aflatoossina B1 (attraverso la dieta), oltre alla MC attraverso l'acqua potabile, è stato riconosciuto quasi 30 anni fa in Cina (Yu, 1989, 1995; Ueno *et al.*, 1996).

Un'elevata incidenza di cancro primario al fegato tra le popolazioni locali che utilizzavano acqua potabile di superficie contenente cianobatteri produttori di MC è stata associata ad un'ulteriore esposizione cronica ad aflatoossina B1, fattore di rischio per il carcinoma epatocellulare, attraverso il consumo di cibo, ad es. il mais ammuffito.

Ulteriori fattori di rischio sono rappresentati dal virus dell'epatite B e dall'alcol (Zheng *et al.*, 2017).

Pur non caratterizzata come un cancerogeno primario, l'azione di promozione tumorale della MC è stata espressa attraverso l'esposizione cronica della popolazione alla cianotossina e all'aflatoossina B1 (cancerogeno primario) e/o al virus dell'epatite B.

Rimane meno certo come la tempistica di esposizione a fioriture di cianobatteri contenenti MC e aflatoossina-B1 (co-esposizione), o l'esposizione sequenziale, influenzino il manifestarsi della patologia nella popolazione umana.

Prove che utilizzano cellule epatiche umane *in vitro* e ratti hanno indicato che mentre ha avuto conferma l'azione di promozione tumorale della MC, l'azione antagonista può verificarsi quando la cianotossina a basse dosi è co-applicata insieme alla tossina fungina (Wang *et al.*, 2020).

La co-occorrenza di cianotossine con ficotossine microalgali ha ricevuto poca attenzione. Le fioriture e i *bloom* costieri di diverse specie di microalghe marine tossigene sono stati da tempo riconosciuti per il loro ruolo nella mortalità di massa di pesci, uccelli marini e mammiferi marini e nelle intossicazioni umane, da lievi a fatali, attraverso il consumo di molluschi (Falconer, 1983; Rasmussen *et al.*, 2016; Vilarino *et al.*, 2018; Akbar *et al.*, 2020; Bruno *et al.* 2021).

Una zona della California, la Baia di San Francisco, ha mostrato la presenza di più classi di tossine, spesso rilevate nei molluschi (Peacock *et al.*, 2018). Da un'analisi delle cozze, MC, acido domoico, tossine diarroiche dei molluschi DSP e tossine paralitiche dei molluschi PSP erano presenti nel 37% dei campioni.

Tuttavia, alcune classi di cianotossine non sono esclusivamente prodotti di cianobatteri (Codd *et al.*, 2019).

È noto da tempo che le saxitossine siano prodotte dai dinoflagellati marini, comprese specie di *Alexandrium*, *Gymnodinium* e *Pyrodinium* (Akbar *et al.*, 2020) e da diversi ceppi di cianobatteri, tra cui *Aphanizomenon* spp., *Dolichospermum circinale* (ex *Anabaena circinalis*), *Cylindrospermopsis raciborskii*, *Raphidiopsis brookii*, *Lyngbya wollei* (Ballot *et al.*, 2017) e *Scytonema crispum* (Smith *et al.*, 2012; Cullen *et al.*, 2018).

I diaminoacidi neurotossici, β -N-metilammino-l-alanina (BMAA), N-(2-amminoetil) glicina (AEG), e acido 2,4-diamminobutirrico (2,4-DAB), analizzati con LC-MS/MS (*Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry*) per confermare la specificità analitica, sembrano anche avere origini multiple, inclusi diversi cianobatteri, diatomee marine e d'acqua dolce, e un dinoflagellato delle acque costiere salmastre (O'Neal *et al.*, 1968; Cox *et al.*, 2005; Metcalf *et al.*, 2008; Faasen *et al.*, 2012; Jiang *et al.*, 2014, 2014; Violi *et al.*, 2019; Metcalf *et al.*, 2020), e queste tossine possono essere presenti anche insieme a MC e brevetossine (Schneider *et al.*, 2020). Le origini più ampie di queste neurotossine sono indicate anche dalla presenza di BMAA nei peptidi presenti nei batteri chemioeterotrofi, compresi quelli diffusi a livello ambientale come *Paenibacillus* spp. (Nunn *et al.*, 2017, 2019).

Una stretta associazione di cianobatteri, comprese le specie tossigene, si verifica tipicamente con altri microbi negli ambienti acquatici e terrestri (Canter-Lund *et al.*, 1995; Whitton 2012). La stretta vicinanza dei cianobatteri e i loro partner mutualistici non fototrofici possono consentire lo scambio bidirezionale di metaboliti e nutrienti e forniscono un substrato fisico protettivo per l'attaccamento batterico e il trasferimento genico. I polisaccaridi extracellulari dei cianobatteri e i materiali della guaina glicoproteica possono fornire substrato per l'adesione batterica (Whitton 2012). Oltre all'associazione con una vasta gamma di batteri non patogeni, ad esempio marini, estuari e cianobatteri d'acqua dolce, possono formare strette associazioni con batteri patogeni umani (Tu *et al.*, 2019).

Quando si verificano grandi fioriture di cianobatteri e le persone sono esposte a tali fioriture, vengono spesso segnalati disturbi di salute e sintomi non specifici (Stewart *et al.*, 2006). Tali sintomi possono includere febbre, polmonite e mal di testa (rivisto in Stewart *et al.*, 2006).

Nel 1884, Robert Koch, lo scopritore del bacillo del colera, suggerì da studi sul campo che la "flora acquatica" potrebbe fungere da serbatoio ambientale del colera (Koch *et al.*, 1884).

Infatti, ricerche sul possibile serbatoio di sopravvivenza del tossico *Vibrio cholerae* 01 in uno stagno a Dhaka, in Bangladesh, utilizzato per la balneazione, per lavarsi e per bere, evidenziarono la sopravvivenza stagionale dell'agente patogeno nella mucillagine extracellulare del cianobatterio *Anabaena variabilis* (Islam *et al.*, 1994).

Mentre la specificità di questa associazione non è estesa alle microalghe euglenoidi, si estende alle masse mucillaginose di altri cianobatteri, comprese le colonie di *Microcystis* (Islam *et al.*, 2020) e i filamenti di *Oscillatoria* che producono MC (Ahmed *et al.*, 2007). Senza l'applicazione di misure più efficaci di gestione del rischio da cianobatteri, è probabile che si intensifichi il ruolo di questi nel fornire serbatoi interepidemi di *V. cholerae*, dato che l'aumento della pressione antropica e il cambiamento climatico continuano a comportare una crescita stagionale delle popolazioni di cianobatteri in termini di durata e diffusione geografica (Huisman *et al.*, 2005).

Sebbene inizialmente si pensasse che il protozoo patogeno umano *Cyclospora* trasportato dall'acqua fosse un cianobatterio, non è così: il protozoo è in grado di causare diarrea, malessere e dolori addominali, in modo simile ai protozoi *Cryptosporidium parvum* e *Giardia lamblia* (Marshall *et al.*, 1997).

È stata osservata una maggiore abbondanza di potenziali cianobatteri produttori di MC (*Aphanocapsa* e *Microcystis* spp.) insieme a *Cryptosporidium* e *Giardia* spp. in un bacino che fornisce acqua potabile alla metropoli di Area di Belo Horizonte, Brasile sudorientale (Lopes *et*

al., 2017). È da notare che le condizioni del corpo idrico che favoriscono la persistenza di *Cryptosporidium e Giardia* spp., compreso l'arricchimento dei nutrienti e l'elevato tempo di ritenzione, possono anche favorire la crescita dei cianobatteri (Whitton, 2012), aumentando il potenziale di co-occorrenza e co-esposizione a protozoi patogeni e cianotossine.

Miscele di cianotossine

La produzione e la presenza di potenti cianotossine neurotossiche come la β -N-metilammino-L-alanina (BMAA), l'acido 2,4-diamminobutirrico dicloridrato (DABA) e l'ATX-a sono particolarmente critiche e hanno implicazioni ambientali per la salute pubblica e degli animali. La biomagnificazione, sebbene non ben compresa nei sistemi acquatici, è potenzialmente rilevante per gli effetti sulla salute umana e animale.

Poiché poco si sa della loro presenza in acqua dolce, è stata esaminata in uno studio di Al Sammak *et al.* (2014) la presenza e il potenziale di bioaccumulo di miscele di cianotossine in diversi bacini idrici del Nebraska, esaminando 387 campioni biologici (acqua, pesci e piante acquatiche).

BMAA (numero CAS 15920-93-1) è un aminoacido non proteico con formula molecolare ($C_4H_{10}N_2O_2$).

È stato suggerito che l'esposizione cellulare al BMAA possa portare ad un danno neurologico al cervello e al sistema nervoso centrale degli esseri umani e degli animali, contribuendo potenzialmente allo sviluppo di diverse malattie neurodegenerative (Polsky *et al.*, 1972).

DABA è un aminoacido non proteico e un isomero di BMAA. DABA è chimicamente noto come acido 2,4-diamminobutirrico, con formula molecolare $C_4H_{10}N_2O$. Si pensa che DABA abbia lo stesso carattere tossicologico di BMAA, ma la molecola non è stata ampiamente studiata (Banack *et al.*, 2011).

L'ATX-a è un composto alcaloide, potente bloccante neuromuscolare postsinaptico e depolarizzante (Devlin *et al.*, 1977). I segni clinici di esposizione all'ATX-a e della neurotossicità includono fascicolazione muscolare, squilibrio e insufficienza respiratoria dovuta alla paralisi, che porta alla morte (Wood *et al.*, 2007; US EPA, 2006; Van Apeldoorn *et al.*, 2007). Si è scoperto che l'ATX-a è prodotta da cianobatteri isolati dal lago Biwa in Giappone, insieme ad omoanatosina-a (Namikoshi *et al.*, 2003). L'ATX-a è stata rilevata nelle acque del Wisconsin e della Florida e nelle fioriture algali con altre cianotossine, come clindrospermopsina e MC-LR (Wood *et al.*, 2007; US EPA, 2006; Van Apeldoorn *et al.*, 2007, Namikoshi *et al.*, 2003).

BMAA e DABA hanno meccanismi d'azione diversi rispetto all'ATX-a. L'ATX-a è una cianotossina con neurotossicità acuta, prodotta da almeno quattro generi di cianobatteri ed è stata segnalata da Nord America, Europa, Africa, Asia e Nuova Zelanda (Fawell *et al.*, 1999; Draisci *et al.*, 2001). La BMAA è prodotta da quasi tutti i cianobatteri, come i generi *Anabaena* e *Nostoc* che possono vivere simbioticamente nelle radici delle piante.

Il meccanismo di tossicità suggerito da BMAA e DABA è però distruzione dei motoneuroni nel cervello, che porta a malattie neurodegenerative come il Parkinson, l'Alzheimer e la SLA (morbo di Lou Gehrig) (Bradley *et al.*, 2009; Banack *et al.*, 2003; Cox *et al.*, 2005; Mash *et al.*, 2008).

METODI DI RILEVAZIONE COMPLESSIVA

È possibile che più analiti possano essere presenti simultaneamente nelle acque ambientali, rappresentando un pericolo per la salute umana. Molti metodi sono stati sviluppati per rilevare queste sostanze in modo che sia possibile monitorare l'inquinamento acquatico. Sebbene la cromatografia liquida-spettrometria di massa (*Liquid Chromatography-Mass Spectrometry*, LC-MS) e plasma accoppiato induttivamente (*Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry*, ICP-MS) possano rilevare molti analoghi di questi composti o analiti chimicamente simili, non è stato sviluppato nessun metodo strumentale per la determinazione simultanea di Pb(II), MC-LR, CAP, T, e CTN perché le loro proprietà sono marcatamente diverse.

I metodi strumentali, come LC-MS e ICP-MS sono stati utilizzati per rilevare uno o due di essi (Mattern *et al.*, 1991; Li *et al.*, 2006; Neffling *et al.*, 2009; Sheridan *et al.*, 2008; Canta, 2008). Tuttavia questi strumenti sono costosi, dispendiosi in termini di tempo e denaro e richiedenti operatori qualificati. Nello studio di Xing *et al* del 2015 viene proposto un sistema multicomponente a flusso laterale basato su reazione anticorpo-antigene per il rilevamento rapido e simultaneo di tracce di contaminanti nell'acqua, compresi metalli pesanti, tossina MC-LR, antibiotici, ormoni e pesticidi. Il dispositivo di flusso fornisce un metodo efficace e rapido per il rilevamento *in loco* di contaminanti multipli all'interno di campioni d'acqua, senza che siano necessari trattamenti o dispositivi particolari.

In uno studio di Yen *et al.* del 2011, è stato sviluppato un metodo LC-MS con SPE (*Solid-Phase Extraction*) per concentrare e rilevare nove cianotossine contemporaneamente, inclusi sei congeneri di MC, NOD, ATX-a e CYN, in acque pure e naturali. Un gruppo SPE a doppia cartuccia è stato testato per i parametri operativi dell'estrazione di cianotossine.

Uno standard surrogato (SS), 1,9-diaminononano, è stato aggiunto a tutti i campioni prima dell'estrazione SPE e uno standard interno (IS), 2,3,5-trimetilfenil metil carbammato, è stato aggiunto prima dell'analisi LC/MS.

Il limite di rilevamento del metodo (*Method Detection Limit*, MDL) era 2-100 ng/L per nove cianotossine in acqua pura ed è stato aumentato di un fattore da tre a dieci in una matrice acquosa più complessa. I recuperi basati su SS sono compresi tra l'83 e il 104%, mentre quelli basati su IS sono stati dell'80-120%. Il metodo sviluppato è stato impiegato con successo nell'analisi di 33 campioni d'acqua raccolti da laghi eutrofici, impianti di trattamento delle acque e rubinetti di distribuzione. MC, NOD e CYN sono stati rilevate nell'acqua del serbatoio, con concentrazioni fino a 36 µg/L.

Inoltre, per la prima volta nell'acqua del rubinetto di Taiwan, la CYN è stata rilevata a concentrazioni fino a 8,6 µg/L. I dati del controllo di qualità per i campioni su campo mostrano che lo schema analitico sviluppato è appropriato per il monitoraggio delle cianotossine.

Nello studio di Zervou *et al.* del 2017, è stato sviluppato un metodo analitico veloce, semplice e sensibile per la determinazione simultanea di tossine algali e cianobatteriche multiclasse nell'acqua. I composti target erano: CYN, ATX-a, NOD, 12 MC ([D-Asp3]MC-RR, MC-RR, MC-YR, MC-HtyR, [D-Asp3]MC-LR, MC-LR, MC-HilR, MC-WR, MC-LA, MC-LY, MC-LW e MC-LF), acido okadaico e acido domoico. Gli analiti sono stati determinati mediante LC-MS/MS. È stato applicato un doppio gruppo cartuccia a estrazione in fase solida (SPE) per l'estrazione dei composti target dall'acqua.

I parametri SPE ottimizzati includevano il materiale della cartuccia, il pH del campione iniziale, la sequenza delle cartucce nell'insieme SPE nonché la composizione e il volume del solvente di eluizione. Il metodo è stato convalidato, fornendo recuperi medi accettabili e riproducibilità per la maggior parte degli analiti. I limiti di rilevamento sono risultati al livello

ng/L. Il metodo è stato applicato con successo in campioni di acqua lacustre provenienti dalla Grecia, dove è stata rilevata per la prima volta un'ampia gamma di MC, a concentrazioni comprese tra 0,034 e 63 µg/L.

Pochi studi hanno affrontato i metodi necessari per un'accurata determinazione delle cianotossine in campioni ambientali e nessuno studio pubblicato è stato in grado di rilevare queste cianotossine insieme in un unico campione.

Le cianotossine si trovano in un'ampia gamma di campioni ambientali, inclusi campioni di acqua, pesci e piante acquatiche; Al Sammak *et al.* (2013), utilizzando la SPE polimerica a scambio cationico accoppiata con cromatografia liquida e rilevamento della fluorescenza (*High-Performance Liquid Chromatography with Fluorescence Detection*, HPLC/FD) (HPLC/FD) e spettrometria di massa tandem con trappola ionica per cromatografia liquida (LC-MS/MS), è riuscito a quantificare per la prima volta le tossine BMAA, DABA e ATX-a simultaneamente in una varietà di tipi di campioni ambientali. Il metodo di estrazione per campioni biologici può distinguere le cianotossine legate e libere. I limiti di rilevamento per l'acqua variano da 5 a 7 µg/L utilizzando HPLC/FD, mentre i limiti di rilevamento per LC/MS sono compresi nell'intervallo 0,8-3,2 µg/L.

Sulla base di questi metodi, livelli misurabili di questi composti neurotossici sono stati rilevati in circa il 25% dei campioni in Nebraska, con rilevamenti di BMAA in circa il 18,1%, di DABA nel 17,1% e di ATX-a nell'11,9% (Al-Sammak *et al.*, 2014).

IMPLICAZIONI PER LE LINEE GUIDA SULLA SICUREZZA DELL'ACQUA, LA LEGISLAZIONE E IL TRATTAMENTO DELLE ACQUE

La necessità di fornire acque ricreative e balneabili e acqua potabile sicura offre molteplici sfide dovute al potenziale di combinazioni di composti tossici, con possibili sinergie ed effetti additivi, che si verificano a concentrazioni ritenute non sicure per la salute umana (Hitzfeld *et al.*, 2000; Delgado *et al.*, 2012). Deve essere verificata la capacità dei valori guida (*Guideline Values*, GV) per la sicurezza dell'acqua, e il fatto che la legislazione fornisca i margini di sicurezza in caso di potenziali esposizioni multiple in modo da prevenire tossicità avverse derivanti dall'esposizione a più tossine, alle cianotossine più patogeni microbici e alle cianotossine insieme a rischi per la salute più recentemente riconosciuti, tra cui le microplastiche.

In molti casi vengono utilizzate le stesse tecnologie di trattamento dell'acqua potabile per la rimozione e/o la distruzione delle cianotossine e di altre sostanze tossiche.

Di conseguenza, al fine di prevenire o ridurre la tossicità durante eventi in cui si verifica una co-occorrenza, l'efficacia di tali tecnologie di trattamento dell'acqua multiuso deve essere verificata e aumentata ove necessario, rispetto a ciascuna delle classi di cianotossine e di sostanze tossiche aggiuntive nell'acqua. Inoltre, lo sviluppo e l'implementazione di tecnologie avanzate di trattamento delle acque dovrebbe tenere conto del potenziale di esposizione nel mondo reale a un'ampia gamma di sostanze tossiche e di scenari, ad esempio dovuti a eventi naturali (Hitzfeld *et al.*, 2000), o ad aggiunte deliberate o create dall'uomo (Metcalf *et al.*, 2009). Tali eventi possono potenzialmente verificarsi da soli o in combinazione e durante i periodi di utilizzo di acqua che possono includere fioriture di cianobatteri nelle acque di sorgente. Si dovrebbe riconoscere il potenziale di esposizioni multiple e i piani di emergenza dovrebbero considerare questo problema; inoltre, spesso le contingenze possono includere la commutazione delle acque di sorgente e se in queste acque esistono situazioni diverse ma potenzialmente pericolose, potrebbero essere richieste tecnologie di trattamento alternative o migliori, o ad esempio, la fornitura temporanea di acque in bottiglia.

La comprensione dei rischi per la salute presentati dalle cianotossine è progredita considerevolmente (Metcalf *et al.*, 2012; Buratti *et al.*, 2017), ma la gestione del rischio derivante dalle MC e dai cianobatteri produttori di MC è stata il focus della derivazione delle linee guida per la protezione della salute (Chorus *et al.* 1999). Valori guida oltre a quelli per le MC, sono stati proposti anche per la CYN (Hitzfeld *et al.* 2000; Senogles *et al.*, 2000).

Sebbene GV per microplastiche non esistano, la WHO ha derivato GV per sei monomeri che possono lisciviare dalla plastica, variando da 0,3 a 300 µg/L (WHO 2019). Alcuni metalli e pesticidi hanno anche GV per l'acqua potabile e in questi casi essi ricadono anche generalmente nelle fasce basse dei valori (µg/L, WHO 2017).

BIBLIOGRAFIA

- Ahmed MS, Raknussaman M, Akther H, Ahmed S. The role of cyanobacteria blooms in cholera epidemic in Bangladesh. *J. Appl. Sci.* 2007;7:1785-89.
- Akbar MA, Yusof NYM, Tahi, NI, Ahmad A, Usup G, Sahrani FK, Bunawan H. Biosynthesis of saxitoxin in marine dinoflagellates: An omics perspective. *Mar. Drugs* 2020;18:103.
- Akporido SO, Onianwa PC. Heavy metals and total petroleum hydrocarbon concentrations in surface water of Esi River, western Niger Delta. *Research J of Environmental Sciences* 2015 9(3):88-100.
- Al-Jenoobi FI, Al-Thukair AA, Alam MA. Effect of *Curcuma longa* on CYP2D6- and CYP3A4-mediated metabolism of dextromethorphan in human liver microsomes and healthy human subjects *Eur. J. Drug Metab. Pharmacokinet.* 2015;40;1: 61-66.
- Alkio M, Tabuchi TM, Wang X, Colón-Carmona A. Stress responses to polycyclic aromatic hydrocarbons in *Arabidopsis* include growth inhibition and hypersensitive response-like symptoms. *J. Exp. Bot.* 2005;56(421):2983-2994.
- Almeda R, Cosgrove S, Buskey EJ. Oil spills and dispersants can cause the initiation of potentially harmful dinoflagellate blooms (“red tides”). *Environmental Science and Technology* 2018;52: 5718-24.
- Al-Sammak MA, Hoagland KD, Cassada D, Snow DD. Co-occurrence of the cyanotoxins BMAA, DABA and anatoxin-a in Nebraska reservoirs, fish, and aquatic plants. *Toxins* (Basel). 2014;28;6(2):488-508.
- Al-Sammak MA, Hoagland KD, Snow DD, Cassada D. Methods for simultaneous detection of the cyanotoxins BMAA, DABA, and anatoxin-a in environmental samples. *Toxicon* 2013;76:316-25.
- Azevedo-Linhares M, Souza ATC, Lenz CA, Leite NF, Brito IA, Folle NMT, Garcia JE, Filipak Neto F, Oliveira Ribeiro CA. Microcystin and pyriproxyfen are toxic to early stages of development in *Rhania quelen*: An experimental and modelling study. *Ecotoxicol Environ Saf.* 2018; 30;166:311-9.
- Baars A, Bakker M, Baumann R, Boon P, Freijer J, Hoogenboom L, Hoogerbrugge R, Van Klaveren J, Liem A, Traag W. Dioxins, dioxin-like PCBs and non-dioxin-like PCBs in foodstuffs: occurrence and dietary intake in The Netherlands. *Toxicol. Lett.* 2004;151(1):51-61.
- Baeza-Squiban A, Marano F, Ronot X, Adolphe M, Puisieux-Dao S. Effects of deltamethrin and its commercial formulation DECIS on different cell types in vitro: Cytotoxicity, cellular binding, and intracellular localization. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 1987;28(1):103-13.
- Ballot A, Bernard C, Fastner J. Saxitoxin and analogues. In: *Handbook of cyanobacterial monitoring and cyanotoxin analysis*. Chichester, UK: Wiley; 2017. p. 149-54.
- Banack SA, Cox PA. Biomagnification of cycad neurotoxins in flying foxes: Implications for ALS-PDC in Guam. *Neurology* 2003;61:387-9.
- Banack SA, Metcalf JS, Spáčil Z, Downing TG, Downing S, Long A, Nunn PB, Cox PA. Distinguishing the cyanobacterial neurotoxins β -N-methylamino-L-alanine (BMAA) from other diamino acids. *Toxicon* 2011;57:730-8.
- Banci L, Bertini I, Ciofi-Baffoni S, Hadjiloi T, Martinelli M, Palumaa P. Mitochondrial copper(I) transfer from Cox17 to Sco1 is coupled to electron transfer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2008;105(19):6803-8.
- Baptista MS, Vasconcelos MT. Cyanobacteria metal interactions: Requirements, Toxicity and ecological implications. *Crit. Rev. Microbiol.* 2006;32:127-37.
- Bártová K, Babica P, Bláha L. Binary mixtures of anthropogenic pollutant (pah or pcb) with cyanobacterial biomass and their in vitro tumor promoting potencies. *Acta Environmentalologica Universitatis Comenianae (Bratislava)* 2011;19:22-6.

- Bechi N, Sorda G, Spagnoletti A, Bhattacharjee J, Vieira Ferro EA, de Freitas Barbosa B, Frosini M, Valoti M, Sgaragli G, Paulesu L, Ietta F. Toxicity assessment on trophoblast cells for some environment polluting chemicals and 17beta-estradiol. *Toxicol. Vitro* 2013;27:995-1000.
- Bettinetti R, Quadroni S, Crosa G, Harper D, Dickie J, Kyalo M, Mavuti K, Galassi S. A preliminary evaluation of the DDT contamination of sediments in Lakes Natron and Bogoria (Eastern Rift Valley, Africa). *AMBIO* 2011;40:341-50.
- Bhattacharya P, Welch AH, Stollenwerk KG, Mc Laughlin MJ, Bundschuh J, Panaullah G Arsenic in the environment: Biology and Chemistry. *Sci Total Env.* 2007;379:109-20.
- Blaha L, Kapplova P, Vondracek J, Upham B, Machala M. Inhibition of Gap Juncyonal intercellular communication by environmentally occurring polycyclic aromatic hydrocarbons. *Toxicological Science* 2002; 65:43-51.
- Bradley WG, Mash DC. Beyond Guam: The cyanobacteria/BMAA hypothesis of the cause of ALS and other neurodegenerative diseases. *Amyotroph. Lateral Scler.* 2009;10:7-20.
- Brambilla G, Cenci T, Franconi F, Galarini R, Macri A, Rondoni F, Strozzi M, Loizzo A. Clinical and pharmacological profile in a clenbuterol epidemic poisoning of contaminated beef meat in Italy. *Toxicol. Lett.* 2000;114:47-53.
- Bruno M, De Pace R, Messineo V. *Contaminazione da cianotossinenei vegetali eduli: rischi sanitari, metodi di rilevazione, depurazione.* Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2021 (Rapporti ISTISAN 21/21).
- Bruno M, Messineo V, De Pace R, Gallo P. *Cianobatteri: linee guida per la gestione della contaminazione da biotossine in popolazioni ittiche di interesse alimentare.* Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2020 (Rapporti ISTISAN 20/25 Rev).
- Budzinski JW, Trudeau VL, Drouin CE, Panahi M, Arnason JT, Foster BC. Modulation of human cytochrome P450 3A4 (CYP3A4) and P-glycoprotein (P-gp) in Caco-2 cell monolayers by selected commercial-source milk thistle and goldenseal products. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 2007;85(9):966-78.
- Buratti FM, Manganelli M, Vichi S, Stefanelli M, Scardala S, Testai E, Funari E. Cyanotoxins: Producing organisms, occurrence, toxicity, mechanism of action and human health toxicological risk evaluation. *Arch. Toxicol.* 2017;91:1049-130.
- Busby WF, Goldman ME, Newberne PM, Wogan GN. Tumorigenicity of fluoraanthrene in a newborn lung adenoma bioassay. *Carcinogenesis* 1984;5:1311-6.
- Canter-Lund H, Lund JWG. *Freshwater algae: their microscopic world explored.* Bristol, UK: Biopress Limited; 1995.
- 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.
- Carmichael WW (Ed.) *The water environment: algal toxins and health.* New York, NY: Plenum Press; 1981.
- Cavaliere C, Rea P, Lynch M, Blumenthal M. Herbal supplement sales rise in all channels in 2009. *HerbalGram.* 2010; 86:62-5.
- Cerbin S, Kraak MHS, de Voogt, P, Visser PM, van Donk E. Combined and single effects of pesticide carbaryl and toxic *Microcystis aeruginosa* on the life history of *Daphnia pulex*. *Hydrobiologia* 2010;643:129-38.
- Chen J, Song L, Dai J, Gan N, Liu Z. Effects of microcystins on the growth and the activity of superoxide dismutase and peroxidase of rape (*Brassica napus* L.) and rice (*Oryza sativa* L.). *Toxicon* 2004;43(4):393-400.

- Chia MA, Kramer BJ, Jankowiak JG, do Carmo Bittencourt-Oliveira M, Gobler CJ. The individual and combined effects of the cyanotoxins, anatoxin-a and microcystin-LR, on the growth, toxin production and nitrogen fixation of prokaryotic and eukaryotic algae. *Toxins* 2019;11-43.
- Chorus I, Bartram J. *Toxic cyanobacteria in water: a guide to their public health consequences, monitoring and management*. London, UK: E.&F.N. Spon; 1999.
- Codd GA, Metcalf JS, Beattie KA. Retention of *Microcystis aeruginosa* and microcystin by salad lettuce (*Lactuca sativa*) after spray irrigation with water containing cyanobacteria. *Toxicon* 1999;37(8):1181-5.
- Codd GA, Morton H, Baker PD. George Francis, a pioneer in the investigation of the quality of South Australia's drinking water sources (1878-1883). *Trans. R. Soc. S. Aust.* 2015;139: 164-70.
- Codd GA, Nunn P.B. Cyanotoxin production beyond the cyanobacteria. *Toxicon* 2019;168:93-4.
- Collier T, Varanasi U. Hepatic activities of xenobiotic metabolizing enzymes and biliary levels of xenobiotics in English sole (*Parophrys vetulus*) exposed to environmental contaminants. *Arch. Environ.* 1991;20:462-73.
- Costa ML, Rodrigues JA, Azevedo J, Vasconcelos V, Eiras E, Campos MG. Hepatotoxicity induced by paclitaxel interaction with turmeric in association with a microcystin from a contaminated dietary supplement. *Toxicon*. 2018;150:207-11
- Cox P, Banack S, Murch S, Rasmussen U, Tien G, Bidigare R, Metcalf J, Morrison L, Codd G; 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.
- Cullen A, D'Agostino PM, Mazmouz R, Pickford R, Wood SA, Nielan BA. Insertions within the saxitoxin biosynthetic gene cluster result in differential toxin profiles. *ACS Chem. Biol.* 2018;13:3107-14.
- Davenport J. Oil and Planctonik ecosystems. *Phil. Trans. R. Soc.Lond.* 1982 B:369-84.
- De Stefano LG, Gattas F, Vinocur A, Cristos D, Rojas D, Cataldo D, Pizarro H. Comparative impact of two glyphosate-based formulations in interaction with *Limnoperna fortunei* on freshwater phytoplankton. *Ecol. Indicat.* 2018;85:575-84.
- Dehn P, White C, Connors D, Shipkey G, Cumbo T. Characterization of the human hepatocellular carcinoma (HEPG2) cell line as an in vitro model for cadmium toxicity studies. *Vitro Cell. Dev. Biol. Animal.* 2004;40:172-82.
- Delgado LF, Charles P, Glucina K, Morlay C. The removal of endocrine disrupting compounds, pharmaceutically activated compounds and cyanobacterial toxins during drinking water preparation using activated carbon—A review. *Sci. Total Environ.* 2012; 435-6, 509-25.
- Devlin JP, Edwards OE, Gorham PR, Hunter NR, Pike RK, Stavric B. Anatoxin-a, a toxic alkaloid from *Anabaena flos-aquae* NRC-44h. *Can. J. Chem.* 1977;55:1367-71.
- Di Pofi G, Favero G, di Gregorio FN, Ferretti E, Viaggiu E, Lucentini L. Multi-residue ultra performance liquid chromatography-high resolution mass spectrometry method for the analysis of 21 cyanotoxins in surface water for human consumption. *Talanta* 2020; 211:120738.
- Dietrich D. Risk cyanobacterial toxins: Occurrence, ecology, detection, toxicology, and health effects assessment. *Toxicology and Applied Pharmacology* 2005;203:191.
- Dong JX, Li ZF, Lei HT, Sun YM, Ducancel F, Xu ZL, Boulain JC, Yang JY, Shen YD, Wang H. Development of a single-chain variable fragment-alkaline phosphatase fusion protein and a sensitive direct competitive chemiluminescent enzyme immunoassay for detection of ractopamine in pork. *Anal. Chim. Acta* 2012;736:85-91.
- Draisci R, Ferretti E, Palleschi L, Marchiafava C. Identification of anatoxins in blue-green algae food supplements using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Food Addit.Contam.* 2001;18:525-31.

- Duke SO, Powles SB. Glyphosate: a once-in-a-century herbicide. *Pest. Manag. Sci.* 2008;64:4:319-25.
- Etheridge AS, Black SR, Patel PR, So J, Mathews JM. An in vitro evaluation of cytochrome P450 inhibition and P-glycoprotein interaction with goldenseal, *Ginkgo biloba*, grape seed, milk thistle, and ginseng extracts and their constituents. *Planta Med.* 2007;73(8):731-74.
- Faassen EJ, Gillissen F, Lüring M. A comparative study of three analytical methods for the determination of the neurotoxin BMAA in cyanobacteria. *PLoS ONE* 2012;7:36667.
- Facey JA, Apte SC, Mitrovic SM. A review of the effect of trace metals on freshwater cyanobacterial growth and toxin production. *Toxins* 2019;11:643.
- Falconer IR, Beresford AM, Runnegar MT. Evidence of liver damage by toxin from a bloom of the blue-green alga *Microcystis aeruginosa*. *Med. J. Aust.* 1983;1:511-4.
- Falconer IR, Humpage AR. Cyanobacterial (blue-green algal) toxins in water supplies: Cylindrospermopsins. *Environ. Toxicol.* 2006;21:299-304.
- Fawell JK, Mitchell RE, Hill RE, Everett DJ. The toxicity of cyanobacterial toxins, topical issues in applied microbiology and biotechnology. *Hum. Exp. Toxicol.* 1999;18:145-71.
- Feng LJ, Sun XD, Zhu FP, Feng Y, Duan, JL, Xiao F, Li XY, Shi Y, Wang Q, Sun JW. Nanoplastics promote microcystin synthesis and release from cyanobacterial *Microcystis aeruginosa*. *Environ. Sci. Technol.* 2020;54:3386-94.
- Feng ZH, Hu WW, Rom WN, Costa M, Tang MS. Chromium(VI) exposure enhances polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA binding at the p53 gene in human lung cells. *Carcinogenesis* 2003;24:771-8.
- Feron VJ, Groten JP, Van Bladeren PJ. Exposure of humans to complex chemical mixtures: hazard identification and risk assessment. *Arch Toxicol Suppl.* 1998;20:363-73.
- Finlay Moore O, Hartel PC, Cabrera ML. 17 β -estradiol and testosterone in soil and runoff from grasslands amended with broiler litter. *Environ. Qual.* 2000;29:1604-11.
- Fiore MF, Trevors JT. Cell composition and metal tolerance in cyanobacteria. *BioMetals* 2017;7:83-103.
- Fiore SMF, De Lima ST, Carmichael WW, McKinnie SMK, Checkan JR, Moore BS. Guanitoxin, renaming a cyanobacterial organophosphate toxin. *Harmful Algae* 2020;92:101937.
- Fitzgeorge RB, Clark SA, Keevil CW. Routes of intoxication. In: *Detection methods for cyanobacterial toxins*. Cambridge, UK: Royal Society of Chemistry; 1994. p. 69-74.
- Francis G. Poisonous Australian lake. *Nature* 1878;18:11-2.
- Francy DS, Brady AM, Ecker CD, Graham JL, Stelzer EA, Struffolino P. Estimating microcystin levels at recreational sites in western Lake Erie and Ohio. *Harmful Algae* 2016;58:23-34.
- Fujiki H, Suganuma M. Carcinogenic aspects of protein phosphatase 1 and 2A inhibitors. In: Fusetani N, Kem W (Ed.). *Marine toxins as research tools*. Berlin: Springer-Verlag; 2009. p. 221-54.
- Gill JPK, Sethi N, Mohan A, Datta S, Girdhar M. Glyphosate toxicity for animals. *Environ. Chem. Lett.* 2017;16:401-26.
- Gilroy DJ, Kauffman KW, Hall RA. Assessing potential health risks from microcystin toxins in blue-green algae dietary supplements. *Environ. Health Perspect.* 2000;108:435-43.
- Gimenéz Campillo C, Pastor Belda M, Campillo N, Arroyo Manzanares N, Hernández Córdoba M, Viñas P. Determination of cyanotoxins and phycotoxins in seawater and algae-based supplements using ionic liquids and liquid chromatography with time-of-flight mass spectrometry. *Toxins* 2019;11:610.
- Graham D, Kisch H, Lawton LA, Robertson PKJ. The degradation of microcystin-LR using doped visible light absorbing photocatalysts. *Chemosphere* 2010;78, (9):1182-5.
- Gu P, Qi L, Zhang W, Zheng Z, Luo X. Effects of different metal ions (Ca, Cu, Pb, Cd) on formation of cyanobacterial blooms. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 2020;189:109976.

- Harada KI, Ogawa K, Kimura Y, Murata H, Suzuki M. Microcystins from *Anabaena flos-aquae* NRC 525-17. *Chem. Res. Toxicol.* 1991;4:535-540.
- Harland FMJ, Wood SA, Moltchanova E, Williams WM, Gaw S. Phormidium autumnale growth and anatoxin-a production under iron and copper stress. *Toxins* 2013;5:2504-2521.
- Harris TD, Smith VH. Do persistent organic pollutants stimulate cyanobacterial blooms? *Inland Waters* 2016;6:124-130.
- Hawkins PR, Runnegar MTC, Jackson ARB, Falconer IR. Severe hepatotoxicity caused by the tropical cyanobacterium (blue-green alga) *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska) Seenaya and Subba Raju isolated from a domestic water supply. *Appl. Environ. Microbiol.* 1985;50:11292-5.
- Hedberg YS, Hedberg JF, Herting G, Goidanich S, Odnevall WI. Critical review: copper runoff from outdoor copper surfaces at atmospheric conditions. *Environmental Science Technology* 2014;48:3:1372-81.
- Hercog C, Štern A, Maisanaba S, Filipič M, Bojana Ž. Plastics in cyanobacterial blooms—genotoxic effects of binary mixtures of cylindrospermopsin and bisphenols in HepG2 cells. *Toxins* 2020;12:219.
- Heresztyn T, Nicholson BC. Nodularin concentrations in Lake Alexandrina and Albert, South Australia, during a bloom of the cyanobacterium (blue-green alga) *Nodularia spumigena* and degradation of the toxin. *Environ. Toxicol. Water Qual.* 1997;12:273-82.
- Heys KA, Shore RF, Pereira MG, Jones KC, Martin FL. Risk assessment of environmental mixture effects. *RSC Adv.* 2016;6:47844-57.
- Hinojosa MG, Prieto AI, Gutiérrez-Praena D, Moreno FJ, Caméan AM, Jos A. In vitro assessment of the combination of cylindrospermopsin and the organophosphate chlorpyrifos on the human neuroblastoma SH-SY5Y cell line. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 2020;191:110222.
- Hitzfeld BC, Höger S, Dietrich DR. Cyanobacterial toxins: Removal during water treatment, and human risk assessment. *Environ. Health Perspect.* 2000;108:113-22.
- Hoostal MJ, Bidart-Bouzat MG, Bouzat JL. Local adaptation of microbial communities to heavy metal stress in polluted sediments of Lake Erie. *FEMS Microbiol. Ecol.* 2008;65:156-68.
- Hu GC, Dai JY, MA BX, Luo XJ, Cao H, Wang JS, Li FC, Xu MQ. Concentrations and accumulation features of organochlorine pesticides on the Baiyangdian Lake freshwater food web of North China. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 2010;58:700-10.
- Huimin W, Shao W, Elvis G Xu, Jin L, Xi L, Zhi W. Synergistic toxicity of microcystin-LR and Cu to zebrafish (*Danio rerio*). *Science of The Total Environment* 2020;713:136393.
- Humble AV, Gadd GM, Codd GA. Binding of copper and zinc to three cyanobacterial microcystins quantified by differential pulse polarography. *Water Res.* 1997;31:1679-86.
- Hyenstrand P, Metcalf JS, Beattie KA, Codd GA. Effects of adsorption to plastics and solvent conditions in the analysis of the cyanobacterial toxin microcystin-LR by high performance liquid chromatography. *Water Res.* 2001;35:3508-11.
- Hyenstrand P, Metcalf JS, Beattie KA, Codd GA. Losses of the cyanobacterial toxin microcystin-LR from aqueous solution by adsorption during laboratory manipulations. *Toxicon* 2001;39:589-94.
- Islam MS, Drasar BS, Sack RB. Probable role of blue-green algae in maintaining endemicity and seasonality of cholera in Bangladesh: A hypothesis. *J. Diarrhoeal Dis. Res.* 1994;12:245-56.
- Islam MS, Miah MA, Hasan MK, Sack RB, Albert MJ. Detection of non-culturable *Vibrio cholerae* O1 associated with a cyanobacterium from an aquatic environment in Bangladesh. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 1994;88:298-9.
- Iwasa M, Yamamoto M, Tanaka Y, Kaito M, Adachi Y. Spirulina-associated hepatotoxicity. *Am. J. Gastroenterol.* 2002;97:3212-13.

- Jaffe R. Fate of hydrophobic organic pollutants in the aquatic environment: a review. *Environ. Pollut.* 1991;69:237-2.
- JECFA (Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives). *Polychlorinated dibenzodioxins, polychlorinated dibenzofurans, and coplanar polychlorinated biphenyls. Safety evaluation of certain food additives and contaminants. Report of the 57th Meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives and Contaminants.* Geneva: World Health Organization; 2002. (WHO Food Additives Series 48)
- JECFA (Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives). *Compendium of Food Additive Specifications: 73rd Meeting 2010.* Rome: FAO; 2010. (FAO JECFA Monographs 10).
- Jia J, Li H, Qu Y, Chen W, Song L. Phytotoxicity, bioaccumulation and potential risks of plant irrigations using cyanobloom-loading freshwater. *Science of The Total Environment* 2018;624.
- Jiang L, Eriksson J, Lage S, Jonasson S, Shams S, Mehine M, Ilag LL, Rasmussen U. Diatoms: A novel source for the neurotoxin BMAA in aquatic environments. *PLoS ONE* 2014;9:e84578.
- Jiang L, Ilag LL. Detection of endogenous BMAA in dinoflagellate (*Heterocapsa triquetra*) hints at evolutionary conservation and environmental concern. *Pubraw Sci.* 2014; 2:1-8.
- Jiang Y, Liu Y, Zhang J, Antibiotic contaminants reduced the treatment efficiency of UV-C on *Microcystis aeruginosa* through hormesis. *Environ. Pollut.* 2020b;261:114193.
- Jochimsen EM, Carmichael WW, An JS, Cardo DM, Cookson ST, Holmes CE, Antunes MB, de Melo Filh, DA, Lyra TM, Barreto VS. Liver failure and death after exposure to microcystins at a hemodialysis center in Brazil. *N. Engl. J. Med.* 1998;338:873-8.
- Koch R. An address on cholera and its bacillus. *Br. Med. J.* 1884;2:453.
- Kolpin D, Furlong E, Meyer M, Thurman E, Zaugg S, Barber L, Buxton H. Pharmaceuticals, hormones, and other organic wastewater contaminants in US streams, 1999–2000: a national reconnaissance. *Environ. Sci. Technol.* 2002;36(6):1202-11.
- Kopec AK, Burgoon LD, Ibrahim-Aibo D, Burg AR, Lee AW, Tashiro C, Potter D, Sharratt B, Harkema JR, Rowlands JC, Budinsky RA, Zacharewski TR. Automated dose-response analysis and comparative toxicogenomic evaluation of the hepatic effects elicited by TCDD, TCDF, and PCB 126 in C57BL/6 mice. *Toxicol Sci.* 2010;118:286-97.
- Kopp R, Mares J, Soukupova Z, Navratil S, Palikova M. Influence of arsenic and cyanobacteria coexposure on plasmatic parameters of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* W.). *Neuroendocrinol. Lett.* 2014;35:2:57-63.
- Kopp R, Palíková M, Mareš J, Navrátil S, Kubíček Z, Ziková A. Haematological indices are modulated in juvenile carp (*Cyprinus carpio* L.) exposed to microcystins produced by cyanobacterial water bloom. *J Fish Dis.* 2011;34:103-14.
- Krewski D, Thorslund T, Withey J. Carcinogenic risk assessment of complex mixtures. *Toxicol. Industrial Health* 1989;5:5:851-67.
- Krienitz L, Ballo, A, Kotut K, Wiegand C, Pütz S, Metcalf JS, Codd GA, Pflugmacher S. Contribution of hot spring cyanobacteria to the mysterious deaths of Lesser Flamingos at Lake Bogoria, Kenya. *FEMS Microbiol. Ecol.* 2003;43:141-8.
- Krienitz L, Ballot A, Caspar P, Codd GA, Kotut K, Metcalf JS, Morrison LF, Pflugmacher S, Wiegand C. Contribution of toxic cyanobacteria to massive deaths of Lesser Flamingos at saline-alkaline lakes. *Proc. Int. Assoc. Theor. Appl. Limnol.* 2005;29:783-6.
- Kuch HM, Ballschmiter K. Determination of endocrine disrupting phenolic compounds and estrogens in surface and drinking water by HRGC-(NCI)-MS in the picogram per liter range. *Environ. Sci. Technol.* 2001;35:3201-6.
- Kuiper Goodman T, Falconer IR, Fitzgerald J, Chorus I, Bartram J (Ed.). *Human health aspects.* London: E & FN Spon; 1999. p. 113-53.

- Kumar B, Sinha A. Microcystis toxic blooms in fish culture ponds and their biological and chemical control. *Int. J. Sci. Technol. Res.* 2014;3:398-410.
- Kurmayer R, Sivonen K, Wilmotte A, Salmaso N (Ed.). *Molecular tools for the detection and quantitation of toxigenic cyanobacteria*. Chichester, UK: John Wiley and Sons; 2017.
- Landsberg JH, Hendrickson J, Tabuchi M, Kiryu Y, Williams BJ, Tomlinson MC. A large-scale sustained fish kill in the St John's River, Florida: A complex consequence of cyanobacterial blooms. *Harmful Algae* 2020;92:101771.
- Lavoie EJ, Cai ZW, Meschter CL, Weyand EH. Tumorigenic Activity of fluoranthene, 2-methylfluoranthene and 3-methylfluoranthene in newborn Cd-1 mice. *Carcinogenesis* 1994;15:2131-5.
- Lawton LA, Edwards C, Codd GA. Extraction and high-performance liquid chromatographic method for the determination of microcystins in raw and treated waters. *Analyst* 1994;119:1525-30.
- Leino L, Tall T, Helander M, Saloniemi I, Saikkonen K, Ruuskanen S, Puigbo P. Classification of the glyphosate target enzyme (5-enolpyruvylshikimate- 3-phosphate synthase) for assessing sensitivity of organisms to the herbicide. *J. Hazard Mater.* 2020;124556.
- Leiser R, Wu GM, Neu TR, Wendt Potthoff K. Biofouling, metal sorption and aggregation are related to sinking of microplastics in a stratified reservoir. *Water Res.* 2020;176:115748.
- Lentz DL, Hamilton TL, Dunning NP, Scarborough VL, Luxton TP, Vonderheide A, Tepe EJ, Perfetta CJ, Brunemann J, Grazioso L. Molecular genetic and geochemical assays reveal severe contamination of drinking water reservoirs at the ancient Maya city of Tikal. *Sci. Rep.* 2020;10:10316.
- Levy EM, Ehrhardt M, Kohnke D, Sobotchenko E, Suzuoki T, Tokuhira A. *Global oil pollution, results of MAPMOPP, the IGOSS Pilot Project of Marine Pollution (Petroleum) Monitoring*. Paris: Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO; 1981.
- Li B, Ding SM, Fan CX, Bai X, Yin H. Estimation of diffusion fluxes on trace heavy metals at sediment-water interface in Fubao Bay of Dianchi Lake. *Environ. Chem.* 2008;27:800-4.
- Li J, et al. Phenanthrene-responsive microRNAs and their targets in wheat roots. *Chemosphere* 2017;186:588-598.
- Li L, Hu B, Xia L, Jiang Z. Determination of trace Cd and Pb in environmental and biological samples by ETV-ICP-MS after single-drop microextraction. *Talanta* 2006;70:468-73.
- Li Q, Gu P, Zhang C, Luo X, Zhang H, Zhang J, Zheng Z. Combined toxic effects of anatoxin-a and microcystin-LR on submerged macrophytes and biofilms. *J. Hazard. Mater.* 2020;389:122053.
- Liang S, Liu Z, Crawford-Brown D, Wang Y, Xu M. Decoupling Analysis and socioeconomic drivers of environmental pressure in China. *Environ.Sci.Technol.* 2013;(2)48:1103-13.
- Lin W, Hou J, Guo H, Li L, Wang L, Zhang D, Li D, Tang R. The synergistic effects of waterborne microcystin-LR and nitrite on hepatic pathological damage, lipid peroxidation and antioxidant responses of male zebrafish. *Environ Pollut.* 2018;235:197-206.
- Lindsay J, Metcalf JS, Codd GA. Protection against the toxicity of microcystin-LR and cylindrospermopsin in *Artemia salina*, and *Daphnia* spp. by pretreatment with cyanobacterial lipopolysaccharide (LPS). *Toxicon* 2006;48:995-1001.
- Liu X, Wang Z, Wang XL, Yang C, Song X, Lv X. Ecological risk assessment of selected heavy metals in the waters of Chinese lakes based on species sensitivity distribution. *J. Lake Sci.* 2018;30:1206-17.
- Liu Y, Chen S, Zhang J, Li X, Gao B. Stimulation effects of ciprofloxacin and sulphamethoxazole in *Microcystis aeruginosa* and isobaric tag for relative and absolute quantitation-based screening of antibiotic targets. *Mol. Ecol.* 2017;26:2:689-701.
- Livingstone DR. The fate of organic xenobiotics in aquatic ecosystems: quantitative and qualitative differences in bio-transformation by invertebrates and fish. *Comp. Biochem. Physiol.* 1998;120:43-9.

- Lopes AMMB, Gomes LNL, de Cerqueira MF, Filho CRM, Von Sperling E, De Pádua VL. [Dynamic of pathogenic protozoa and cyanobacteria in a reservoir used for water supply in southeastern Brazil]. *Engenharia Sanitaria e Ambiental* 2017;22:25-43.
- Lozano VL, Vinocur A, Sabio y García CA, Allende L, Cristos DS, Rojas D, Wolansky M, Pizarro H. Effects of glyphosate and 2,4-D mixture on freshwater phytoplankton and periphyton communities: a microcosms approach. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 2018;148:1010-9.
- Luke W, Jeff B, Di F, Briem PJO. Molecular cytotoxic mechanisms of estradiol involve estradiol quinoid moieties. *Free Radic. Biol. Med.* 2001;10:631-2.
- Ma M, Fuwei P, Jiasheng W, Jian J, Xiulan S, New insights into cytotoxicity induced by microcystin-LR, estradiol, and ractopamine with mathematical models: Individual and combined effects. *Chemosphere* 2017;168:223-33.
- Machala M, Blaha L, Vondracek J, Trosko J, Scott J, Upham B. Inhibition of gap junctional intercellular communication by noncoplanar polychlorinated biphenyls: inhibitory potencies and screening for potential mode of action. *Toxicological Science* 2003;76:102-11.
- Malécot M, Guével B, Pineau C, Holbech BF, Bormans M, Wiegand C. Specific proteome response of *Unio pictorum* mussel to a mixture of glyphosate and microcystin-LR. *J. Proteome Res.* 2013;12:5281-92.
- Manton WI. Total contribution of airborne lead to blood lead. *Br. J. Ind. Med.* 1985;42:168-172.
- Marshall MM, Naumovitz D, Ortega Y, Sterling CR. Waterborne protozoan pathogens. *Clin. Microbiol. Rev.* 1997;10:67-85.
- Mash DC. Cyanobacterial toxins in neurodegeneration. *Lifelong Learn. Neurol.* 2008;14:138-49.
- Mattern GC, Liu CH, Louis JB, Rosen JD. GC/MS and LC/MS determination of 20 pesticides for which dietary oncogenic risk has been estimated. *J Agric Food Chem* 1991;39:700-4.
- Meneely JP, Hašlová J, Krška R, Elliott CT. Assessing the combined toxicity of the natural toxins, aflatoxin B1, fumonisin B1 and microcystin-LR by high content analysis. *Food Chem. Toxicol.* 2018;121:527-40.
- Meriluoto J, Metcalf JS, Codd GA. Selection of analytical methodology for cyanotoxin analysis. In: Meriluoto J, Spoof L, Codd GA (Ed.). *Handbook of cyanobacterial monitoring and cyanotoxin analysis*. Chichester, UK: Wiley; 2017. p. 308-312.
- Meriluoto J, Spoof L, Codd GA (Ed.). *Handbook of cyanobacterial monitoring and cyanotoxin analysis*. Chichester, UK: Wiley; 2017.
- Merlo F, Marasch, F, Piparo D, Profumo A, Speltini A. Simultaneous pre-concentration and HPLC-MS/MS quantification of phycotoxins and cyanotoxins in inland and coastal waters. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 2020;17:4782.
- Mesnage R, Clair E, Gress S, Then C, Szekacs A, Seralini GE. Cytotoxicity on human cells of Cry1Ab and Cry1Ac Bt insecticidal toxins alone or with a glyphosate-based herbicide. *J. Appl. Toxicol.* 2013;33:695-9.
- Metcalf JS, Banack SA, Lindsay J, Morrison LF, Cox PA, Codd GA. Co-occurrence of β -N-methylamino-L-alanine a neurotoxic amino acid with other cyanobacterial toxins in British waterbodies, 1990-2004. *Environ. Microbiol.* 2008;10:702-8.
- Metcalf JS, Banack SA, Wessel RA, Lester M, Pim JG, Cassani JR, Cox PA. Toxin analysis of freshwater cyanobacterial and marine harmful algal blooms on the west coast of Florida and implications for estuarine environments. *Neurotox. Res.* 2020.
- Metcalf JS, Beattie KA, Ressler J, Gerbersdorf S, Pflugmacher S, Codd GA. Cross-reactivity and performance assessment of four microcystin immunoassays with detoxication products of the cyanotoxin, microcystin-LR. *J. Water Supply Res. Technol. AQUA* 2002;51:145-51.

- Metcalf JS, Bruno M. Anatoxin-a(S). In: Meriluoto J, Spoof L, Codd GA (Ed.). *Handbook of cyanobacterial monitoring and cyanotoxin analysis*. Chichester, UK: Wiley; 2017. p. 155-159.
- Metcalf JS, Codd GA. Co-Occurrence of cyanobacteria and cyanotoxins with other environmental health hazards: impacts and implications. *Toxins* 2020;12:629.
- 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.
- Metcalf JS, Codd GA. The status and potential of cyanobacteria and their toxins as agents of bioterrorism. In: Gault PM, Marler HJ (Ed.). *Handbook on cyanobacteria: biochemistry, biotechnology and applications*. New York, NY: Nova Science Publishers; 2009. p. 259-81.
- Metcalf JS, Richer R, Cox PA, Codd GA. Cyanotoxins in desert environments may present a risk to human health. *Sci. Total Environ.* 2012;421-2:118-23.
- Metcalf JS, Souza NR. Cyanobacteria and their toxins. *Sep. Sci. Technol.* 2019;11:125-48.
- Milutinovic A, Zivin M, Zorc-Pleskovic R, Sedmak B, Suput D. Nephrotoxic effects of chronic administration of microcystins -LR and -YR. *Toxicon* 2003;42:281-288.
- Mnif W, Hassine AI.H, Bouaziz A, Bartegi A, Thomas O, Roig B. Effect of endocrine disruptor pesticides: a review. *Int. J. Environ. Res. Publ. Health* 2011;8:2265-303.
- Monferrán MV, Agudo JA, Pignata ML, Wunderlin DA. Copper-induced response of physiological parameters and antioxidant enzymes in the aquatic macrophyte *Potamogeton pusillus*. *Environ. Pollut.* 2009;157(8):2570-6.
- Monosson E. Chemical mixtures: considering the evolution of toxicology and chemical assessment. *Environ. Health Perspect.* 2005;113:383-90.
- Monteiro S, Santos R, Bláha L, Codd GA. Lipopolysaccharide endotoxins. In: Meriluoto J, Spoof L, Codd GA (Ed.). *Handbook of cyanobacterial monitoring and cyanotoxin analysis*. Chichester, UK: Wiley; 2017. p. 165-72.
- Moore CJ. Synthetic polymers in the marine environment: A rapidly increasing long-term threat. *Environ. Res.* 2008;108:131-9.
- Myers JP, Antoniou MN, Blumberg B, Carroll L, Colborn T, Everett LG, Hansen M, Landrigan PJ, Lanphear BP, Mesnage R, Vandenberg LN, Vom Saal FS, Welshons WV, Benbrook CM. Concerns over use of glyphosate-based herbicides and risks associated with exposures: a consensus statement. *Environ. Health* 2016;15:19.
- 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 non-toxic 4-hydroxyhomoanatoxin-a by the cyanobacterium *Raphidiopsis mediterranea* Skuja. *Toxicon* 2003;42:533-8.
- Neffling MR, Spoof L, Meriluoto J. Rapid LC-MS detection of cyanobacterial hepatotoxin microcystins and nodularins: comparison of columns. *Anal. Chim. Acta* 2009;653:234-41.
- Nikolaou *et al.* Occurrence patterns of pharmaceuticals in water and wastewater environments. *Annal. Bioanal. Chem.* 2007;387(4):1225-34.
- Nobre ACL; Jorge MCM, Menezes DB, Fonteles MC, Monteiro HSA. Effects of microcystin-LR in isolated perfused rat kidney. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 1999;32:985-8.
- Nunn PB, Codd GA. Environmental distribution of the neurotoxin L-BMAA in *Paenibacillus* species. *Toxicol. Res.* 2019;8:781-3.
- Nunn PB, Codd GA. Metabolic solutions to the biosynthesis of some diaminomono-carboxylic acids in nature: Formation in cyanobacteria of the neurotoxins 3-N-methyl-2,3-diaminopropanoic acid (BMAA) and 2,4-diaminobutanoic acid (2,4-DAB). *Phytochemistry* 2017;144:2530270.

- Nunn PB, O'Brien P, Pettit LD, Pyburn S. Complexes of zinc, copper and nickel with the non-protein amino acid L- α -amino- β -methylaminopropionic acid: A naturally occurring neurotoxin. *J. Inorg. Biochem.* 1989;37:175-83.
- O'Neal RM, Chen CH, Reynolds CS, Meghal SK, Koeppe RE. The 'neurotoxicity' of L-2,4-diaminobutyric acid. *Biochem. J.* 1968;106:699-706.
- Ostgaard K. The oil, the water and the phytoplankton. *Advances in Limnology* 1994;42:167-93.
- Page SW. Chloramphenicol: hazards of use and the current regulatory environment. *Australian Vet. J.* 1991;68:1-2.
- Palíková M, Kopp R, Mareš J, Navrátil S, Kubíček Z, Chmelař L, *et al.* Selected haematological and biochemical indices of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) reared in the environment with cyanobacterial water bloom. *Acta Vet Brno.* 2010;79:S63-S71.
- Palikova M, Navratil S, Papezikova I, Ambroz P, Vesely T, Pokorova D. Combined exposure of carps (*Cyprinus carpio* L.) to cyanobacterial biomass and white spot disease. *Neuroendocrinol Lett.* 2012;33(3):77-83.
- Palikova M, Papezikova I, Kopp R, Mares J, Markova Z, Navratil S, Adamovsky O, Kohoutek J, Navratil L, Blaha L. Effect of arsenic and cyanobacterial co-exposure on pathological, haematological and immunological parameters of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Neuro Endocrinol Lett.* 2015;36(1):57-63.
- Peacock MB, Gobble CM, Senn DB, Cloern JE, Kudela RM. Blurred lines: Multiple freshwater and marine algal toxins at the land-sea interface of San Francisco Bay, California. *Harmful Algae* 2018;73:138-47.
- Pennycott T, Young FM, Metcalf JS, Codd GA. Necrotic enteritis in mute swans associated with cyanobacterial toxins. *Vet. Rec.* 2004;154:575-6.
- Pereira TC, Campos MM, Bogo MR. Copper toxicology, oxidative stress and inflammation using zebrafish as experimental model. *Journal of Applied Toxicology* 2016;36(7):876-85.
- Peterson EW, Davisand RK, Orndorff HA. 17 β -estradiol as an indicator of animal waste contamination in mantled karst aquifers. *Environ. Qual.* 2000;29:826-34.
- Pflugmacher S, Aulhorn M, Grimm B. Influence of a cyanobacterial crude extract containing microcystin-LR on the physiology and antioxidative defence systems of different spinach variants. *New Phytol.* 2007;175(3):482-9.
- Pikula J, Bandouchova H, Hilscherova K, Paskova V, Sedlackova J, Adamovsky O, *et al.* Combined exposure to cyanobacterial biomass, lead and the Newcastle virus enhances avian toxicity. *Sci Total Environ.* 2010;408:4984-92.
- Pinheiro C, Azevedo J, Campos A, Vasconcelos V, Loureiro S. The interactive effects of microcystin-LR and cylindrospermopsin on the growth rate of the freshwater alga *Chlorella Vulgaris*. *Ecotoxicology* 2016;25:745-58.
- Pinheiro C, Azevedo J, Campos A. Absence of negative allelopathic effects of cylindrospermopsin and microcystin-LR on selected marine and freshwater phytoplankton species. *Hydrobiologia* 2013;705:27-42.
- Pinti M, Troiano L, Nasi M, Ferraresi R, Dobrucki J, Cossarizza A. Hepatoma HepG2 cells as a model for in vitro studies in mitochondrial toxicity of antiviral drugs: which correlation with the patient? *J. Biol. Regul. Homeost. Agents* 2003;17:166-71.
- Polsky FI, Nunn PB, Bell EA. Distribution and toxicity of alpha-amino-betamethylaminopropionic acid. *Fed. Proc.* 1972;31:1473-5.
- Pouria S, de Andrade A, Barbosa J, Cavalcanti RL, Barreto VT, Ward CJ, Preiser W, Poon GK, Neild GH, Codd GA. Fatal microcystin intoxication in haemodialysis unit in Caruaru, Brazil. *Lancet* 1998;352:21-6.

- Qu CH, Li XL, Zhang L, Xi CX, Wang GM, Li NB, Luo HQ. Simultaneous determination of cimaterol, salbutamol, terbutaline and ractopamine in feed by SPE coupled to UPLC. *Chromatographia* 2011;73:243-9.
- Querol X, Alastuey A, Moreno T, Viana MM, Castillo S, Pey J, Rodríguez S, Artiñano B, Salvador P, Sánchez M. Spatial and temporal variation in airborne particulate matter (PM10 and PM2.5) across Spain 1999-2005. *Atmos. Environ.* 2008;42:3964-79.
- Ramakrishnan B, Megharaj M, Venkateswarlu K, Naidu R, Sethunathan N. The impacts of environmental pollutants on microalgae and cyanobacteria. *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* 2010;40:699-821.
- Rasmussen SA, Andersen AJC, Andersen NG, Nielsen KF, Hansen PJ, Larsen TO. Chemical diversity, origin, and analysis of phycotoxins. *J. Nat. Prod.* 2016;79:662-73.
- Re G, Badino P, Novelli A, Girardi C. Effects of clenbuterol as a repartitioning agent on beta-adrenoceptor concentrations in heart, bronchi and brain of veal calves. *Veterinary J.* 1997;153:63-70.
- Reinikainen M, Meriluoto JAO, Spoof L, Harada KI. The toxicities of a polyunsaturated fatty acid and a microcystin to *Daphnia Magna*. *Environ. Toxicol.* 2001;16:444-8.
- Richardson SD, Ternes TA. Water analysis: emerging contaminants and current issues. *Anal. Chem.* 2014;86(6):2813-48.
- Robillot C, Vinh JE, Puiseux-Dao S, Hennion MC. Hepatotoxin production kinetics of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* PCC 7820, as determined by HPLC-mass spectrometry and protein phosphatase bioassay. *Environ. Sci. Technol.* 2000;34:3372-8.
- Roy-Lachapelle A, Duy SV, Munoz G, Dinh QT, Bahl E, Simon DF, Sauvé S. Analysis of multiclass cyanotoxins (microcystins, anabaenopeptins, cylindrospermopsin and anatoxins) in lake water using on-line SPE liquid chromatography high-resolution Orbitrap mass spectrometry. *Anal. Methods* 2019;11:5289.
- Rush T, Liu X, Lobner D. Synergistic toxicity of the environmental neurotoxins methylmercury and β -N-methylamino-l-alanine. *Neuroreport* 2012;23:216-9.
- Ruttens A, Blanpain AC, De Temmerman L, Waegeneers N. Arsenic speciation in food in Belgium: Part 1: Fish, molluscs and crustaceans. *J Geochem Explor.* 2012;121:55-61.
- Rymuszka A, Sieroslawska A. Cytotoxic and immunotoxic effects of the mixture containing cyanotoxins on carp cells following in vitro exposure. *Cent. Eur. J. Immunol.* 2013;38:159-63.
- Saito K, Sei Y, Miki S, Yamaguchi K. Detection of microcystin-metal complexes by using cryospray ionization-Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry. *Toxicol* 2008;51(8):1496-8.
- Santodonato J. Review of the estrogenic and antiestrogenic activity of polycyclic aromatic hydrocarbons: relationship to carcinogenicity. *Chemosphere* 1997;34:835-48.
- Schneider T, Simpson C, Desai P, Tucker M, Lobner D. Neurotoxicity of isomers of the environmental toxin L-BMAA. *Toxicol* 2020;184:175-9.
- Senogles P, Shaw G, Smith M, Norris R, Chiswell R, Mueller J, Sadler R, Eaglesham G. Degradation of the cyanobacterial toxin cylindrospermopsin, from *Cylindrospermopsis raciborskii*, by chlorination. *Toxicol* 2000;8:1203-13.
- Shan K, Shang M, Zhou B, Li L, Wang X, Yang H, Song L. Application of Bayesian network including microcystis morphospecies for microcystin risk assessment in three cyanobacterial bloom-plagued lakes, China. *Harmful Algae* 2019;83:14-24.
- Sheridan R, Policastro B, Thomas S, Rice D. Analysis and occurrence of 14 sulfonamide antibacterials and chloramphenicol in honey by solid-phase extraction followed by LC/MS/MS analysis. *J. Agric. Food Chem.* 2008;56(10):3509-16.
- Silins I, Högberg J. Combined toxic exposures and human health: biomarkers of exposure and effect. *Int J. Environ. Res. Pub. Health.* 2011;8:629-47.

- Singh AK, Singh PP, Tripathi V, Verma, H, Singh SK, Srivastarva MK, Kumar A. Distribution of cyanobacteria and their interactions with pesticides in paddy field: A comprehensive review. *J. Environ. Manag.* 2018;224:361-75.
- Smedbol E, Lucotte M, Labrecque M, Lepage L, Juneau P. Phytoplankton growth and PSII efficiency sensitivity to a glyphosate-based herbicide (Factor 540 (R)). *Aquat. Toxicol.* 2017;192:265-273.
- Smith FMJ, Wood SA, Wilks T, Kelly D, Broady PA, Williamson W, Gaw S. Survey of *Scytonema* (Cyanobacteria) and associated saxitoxins in the littoral zone of recreational lakes in Canterbury, New Zealand. *Phycologia* 2012;51:542-51.
- Solter PF, Wollenberg GK, Huang X, Chu FS, Runnegar. MT. Prolonged sublethal exposure to the protein phosphatase inhibitor microcystin-LR results in multiple dose-dependent hepatotoxic effects. *Toxicol. Sci.* 1998;44:87-96.
- Song L, Chen W, Peng L, Wan N, Gan N, Zhang X. Distribution and bioaccumulation of microcystins in water columns: a systematic investigation into the environmental fate and the risks associated with microcystins in Meiliang bay, Lake Taihu. *Water Res.* 2007;41(13):2853-64.
- Soukupová Z, Veselý T, Pokorová D, Mareš J, Kopp R, Kohoutek J, et al. Influence of cyanobacteria and spring viraemia of carp co-exposition on common carp (*Cyprinus carpio* L.) Interdisciplinary *Toxicol.* 2014;7(1):76-7.
- Spoof L, Catherine A. Appendix 3: Tables of microcystins and nodularins. In: Meriluoto J, Spoof L, Codd GA (Ed.). *Handbook of cyanobacterial monitoring and cyanotoxin analysis*. Chichester, UK: Wiley; 2017. p. 526-37.
- Srivastava A, Singh S, Ahn CY, Oh HM, Asthana RK. Monitoring approaches for a toxic cyanobacterial bloom. *Environ Sci Technol.* 2013;47:8999-9013.
- Staley ZR, Harwood VJ, Rohr JR. A synthesis of the effects of pesticides on microbial persistence in aquatic ecosystems. *Crit. Rev. Toxicol.* 2015;45:813-36.
- 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* 2006;5:6.
- Stolker AAM, Brinkman UATH. Analytical strategies for residue analysis of veterinary drugs and growth-promoting agents in food-producing animals—a review. *J. Chromatogr. A* 2005;1067:15-53.
- Su X, Xue Q, Steinman AD, Zhao Y, Xie L. Spatiotemporal dynamics of microcystin variants and relationships with environmental parameters in Lake Taihu, China. *Toxins.* 2015; 7(8):3224-44.
- Subedi B, Du B, Chambliss CK, Koschorreck J, Rüdell H, Quack M, Brooks BW, Usenko S. Occurrence of pharmaceuticals and personal care products in German fish tissue: a national study. *Environ. Sci. Technol.* 2012;(46)16:9047-54.
- Suk WA, Olden K, Yang RS. Chemical mixtures research: significance and future perspectives. *Environ. Health Perspect.* 2002;110(6):891.
- Svirčev Z, Drobac D, Tokodi N, Mijović B, Codd GA, Meriluoto J. Toxicology of microcystins with reference to cases of human intoxications and epidemiological investigations of exposure to cyanobacteria and cyanotoxins. *Arch. Toxicol.* 2017;91:621-50.
- Svirčev Z, Lalić D, Bojadžija Savić G, Tokodi N, Drobac Backović D, Chen L, Meriluoto J, Codd GA. Global geographical and historical overview of cyanotoxins distribution and cyanobacterial poisonings. *Arch. Toxicol.* 2019;93:2429-81.
- Swanson MS, Hammer BK. *Legionella pneumophila* pathogenesis: a fateful journey from amoebae to macrophages. *Annu. Rev. Microbiol.* 2000;54:567-613.
- Takeuchi I, Miyoshi N, Mizukawa K, Takada H, Ikemoto T, Omori K, Tsuchiya K. Biomagnification profiles of polycyclic aromatic hydrocarbons, alkylphenols and polychlorinated biphenyls in Tokyo

- Bay elucidated by ¹³C and ¹⁵N isotope ratios as guides to trophic web structure. *Mar. Pollut. Bull.* 2009;58:663-71.
- Trosko JE. Gap junctional intercellular communication as a biological “Rosetta stone” in understanding, in a systems biological manner, stem cell behavior, mechanisms of epigenetic toxicology, chemoprevention and chemotherapy. *Journal of Membrane Biology* 2007;218:93-100.
- Tu J, Chen L, Gao S, Zhang J, Bi C, Lu N, Lu Z. Obtaining genome sequences of mutualistic bacteria in single *Microcystis* colonies. *Int. J. Mol. Sci.* 2019;20:5047.
- Turner AD, Waack J, Lewis A, Edwards C, Lawton L. Development and single-laboratory validation of a UHPLC-MS/MS method for quantitation of microcystins and nodularin in natural water, cyanobacteria, shellfish and algal supplement tablet powders. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2018;1074-1075:111-123.
- Turner PC, Gammie AJ, Hollinrake K, Codd GA. Pneumonia associated with contact with cyanobacteria. *Br. Med. J.* 1990;300:1440-1.
- US EPA. *Drinking water health advisory for the cyanobacterial microcystin toxins*. Washington, DC: U.S. Environmental Protection Agency; 2015.
- US EPA-National Center for Environmental Assessment. *Toxicological reviews of cyanobacterial toxins: anatoxin-a*. Cincinnati, OH: US Environmental Protection Agency; 2006. (NCEA-C-1743).
- US EPA-National Center for Environmental Assessment Office of Research and Development. *Integrated Risk Information System (IRIS) on Cadmium*. U.S. Environmental Protection Agency; 1999.
- US EPA-National Center for Environmental Assessment Office of Research and Development. *Toxicological reviews of cyanobacterial toxins: microcystins LR, RR, YR and LA*. Cincinnati, OH: US Environmental Protection Agency; 2006.
- Ueno Y, Nagata S, Tsutsumi T, Hasegawa A, Watanabe M, Park HD, Chen GC, Chen G, Yu SZ. Detection of microcystins, a blue-green algal hepatotoxin, in drinking water sampled in Haimen and Fusui, endemic areas of primary liver cancer in China, by highly sensitive immunoassay. *Carcinogenesis* 1996;17:1317-21.
- Utkilen H, Gjølme N. Iron-stimulated toxin production in *Microcystis aeruginosa*. *Appl. Environ. Microbiol.* 1995;61:797-800.
- Valério E, Campos A, Osório H, Vasconcelos V. Proteomic and Real-Time PCR analyses of *Saccharomyces cerevisiae* VL3 exposed to microcystin-LR reveals a set of protein alterations transversal to several eukaryotic models. *Toxicon* 2016;112:22-8.
- Van Apeldoorn ME, van Egmond HP, Speijers GJ, Bakker GJ. Review: toxins of cyanobacteria. *Mol. Nutr. Food Res.* 2007;51:7-60.
- Vilariño N, Louzao MC, Abal P, Cagide E, Carrera C, Vieytes MR, Botana LM. Human poisoning from marine toxins: Unknowns for optimal consumer protection. *Toxins* 2018;10:324.
- Violi JP, Facey JA, Mitrovic SM, Colville A, Rodgers KJ. Production of β -methylamino-L-alanine (BMAA) and its isomers in freshwater diatoms. *Toxins* 2019;11:1109-38.
- Wan X, Cheng C, Gu Y, Shu X, Xie L, Zhao Y. Acute and chronic toxicity of microcystin-LR and phenanthrene alone or in combination to the cladoceran (*Daphnia magna*). *Ecotoxicology and Environmental Safety* 2021;220:112405.
- Wan X, Steinman AD, Shu X, Cao Q, Yao L, Xie L. Combined toxic effects of microcystin-LR and phenanthrene on growth and antioxidant system of duckweed (*Lemna gibba* L.). *Ecotoxicology and Environmental Safety* 2019;18:109668.
- Wang DQ, Yu YX, Zhang XY, Zhang SH, Pang YP, Zhang XL, Yu ZQ, Wu MH, Fu JM. Polycyclic aromatic hydrocarbons and organochlorine pesticides in fish from Taihu Lake: their levels, sources, and biomagnification. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 2012;82:63-70.

- Wang L, He L, Zeng H, Fu W, Wang J, Tan Y, Zheng C, Qiu Z, Luo J, Lv C. Low dose microcystin-LR antagonises aflatoxin B1 induced hepatocarcinogenesis through decreased cytochrome P450 1A2 expression and aflatoxin B1-DNA adduct generation. *Chemosphere* 2020;248:126036.
- Wang W, Zhang Y, Wang J, Shi, Ye J. Determination of beta agonists in pig feed, pig urine and pig liver using capillary electrophoresis with electrochemical detection. *Meat Sci.* 2010;85:302-5.
- Wang X, Liu W, Zhu D, Yang L, Liu M, Yin S, *et al.* Comparative genomics of *Riemerella anatipestifer* reveals genetic diversity. *BMC Genomics* 2014;15:479.
- Wang Z, Xiao B, Song L, Wang C, Zhang J. Responses and toxin bioaccumulation in duckweed (*Lemna minor*) under microcystin-LR, linear alkybenzene sulfonate and their joint stress. *J Hazard Mater.* 2012; 30:229-230.
- Wang Z, Xiao B, Song L, Wu X, Zhang Y, Wang C. Effects of microcystin-LR, linear alkylbenzene sulfonate and their mixture on lettuce (*Lactuca sativa L.*) seeds and seedlings. *Ecotoxicology* 2011;20:803-14.
- Wang Z, Zhang J, Li E, Zhang L, Wang X, Song L. Combined toxic effects and mechanisms of microcystin-LR and copper on *Vallisneria natans* (Lous.) Hara seedlings. *J. Hazard. Mater.* 2017;328:108-16.
- Ward CJ, Codd GA. Comparative toxicity of four microcystins of different hydrophobicities to the protozoan, *Tetrahymena Pyriformis*. *J. Appl. Microbiol.* 1999;86:874-82.
- Wassenberg DM, Di Giulio RT. Synergistic embryotoxicity of polycyclic aromatic hydrocarbon aryl hydrocarbon receptor Agonists with cytochrome P4501A inhibitors in *Fundulus heteroclitus*. *Environmental Health Perspectives* 2004;112:1658-64.
- Wei H, Wang S, Xu EG, Liu J, Li X, Wang Z. Synergistic toxicity of microcystin-LR and Cu to zebrafish (*Danio rerio*). *Sci. Total Environ.* 2020;713:736393.
- Whitton BA (Ed.). *Ecology of cyanobacteria II: their diversity in space and time*. Dordrecht: Springer; 2012.
- WHO. *Cyanobacterial toxins: microcystins. Background document for development of WHO Guidelines for drinking-water quality and guidelines for safe recreational water environment*. Geneva: World Health Organization; 2020. (WHO/HEP/ECH/WSH/2020.6)
- WHO. *Guidelines for drinking water quality, 4th ed.* Geneva: World Health Organization; 2017.
- WHO. *Microplastics in drinking water*. Geneva: World Health Organization; 2019.
- Wimmer KM, Strangman W, Wright JLC. 7-deoxy-desulfo-cylindrospermopsin and 7-dexoy-desulfo-12-acetylcylindrospermopsin: Two new cylindrospermopsin analogs isolated from a Thai strain of *Cylindrospermopsis raciborskii*. *Harmful Algae* 2014;37:203-6.
- Wood SA, Rasmussen JP, Holland PT, Campbell R, Crowe ALM. First report of the cyanotoxin anatoxin-a from *Aphanizomenon issatschenkoi* (cyanobacteria). *J. Phycol.* 2007;43:356-65.
- Woodward AR, Percival HF, Rauschenberger RH, Gross TS, Rice KG, Conrow R. Abnormal alligators and organochlorine pesticides in Lake Apopka, Florida. In: Elliott JE, Bishop CA, Morrissey CA (Ed.). *Wildlife ecotoxicology forensics approached*. New York, NY: Springer; 2011. p.153-87.
- Wu L, Qiu Z, Zhou Y, Du Y, Liu C, Ye J, Hu X. Physiological effects of the herbicide glyphosate on the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. *Aquat. Toxicol.* 2016;178:72-9.
- Wu R, Qian SS, Hao F, Cheng H, Zhu D, Zhang J. Modeling contaminant concentration distributions in China's centralized source waters. *Environ. Sci. Technol.* 2011;45(14):6041-8.
- Xing C, Liu L, Song S, Feng M, Kuang H, Xu C. Ultrasensitive immunochromatographic assay for the simultaneous detection of five chemicals in drinking water. *Biosens Bioelectron.* 2015;15;66:445-53.
- Xu S, Liu Y, Zhang J, Gao B, Proteomic mechanisms for the combined stimulatory effects of glyphosate and antibiotic contaminants on *Microcystis aeruginosa*. *Chemosphere* 2021;267:129244.

- Yang H, Xie P, Xu J, *et al.* Seasonal variation of microcystin concentration in Lake Chaohu, a shallow subtropical lake in the People's Republic of China. *Bull Environ Contam Toxicol* 2006;77:367-74.
- Yang Y, Song W, Lin H, Wang W, Du L, Xing W. Antibiotics and antibiotic resistance genes in global lakes: a review and meta-analysis. *Environ. Int.* 2018;116:60-73.
- Yao L, Hui L, Yang Z, Chen X, Xiao A. Freshwater microplastics pollution: detecting and visualizing emerging trends based on Citespace II. *Chemosphere* 2020;245:125627.
- Yen HK, Lin TF, Liao PC. Simultaneous detection of nine cyanotoxins in drinking water using dual solid-phase extraction and liquid chromatography-mass spectrometry. *Toxicol.* 2011;58(2):209-18.
- Yin J, Liu Q, Wang L. The distribution and risk assessment of heavy metals in water, sediments, and fish of Chaohu Lake, China. *Environ. Earth Sci.* 2018;77(3):97.
- Yokota K, Waterfield H, Hastings C, Davidson E, Kwietniewski E, Wells B. Finding the missing piece of the aquatic pollution puzzle: Interaction between primary producers and microplastics. *Limnol. Oceanogr. Lett.* 2017;2:91-104.
- Yruela I. Copper in plants. *Braz. J. Plant Physiol.* 2005;17(1):145-56.
- Yu SZ. Drinking water and primary liver cancer. In: Tang ZY, Wu MC, Xia SS (Ed.). *Primary liver cancer*. New York, NY: China Academic Publishers; 1989. p. 30-7.
- Yu SZ. Primary prevention of hepatocellular carcinoma. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 1995;10:674-682.
- Yuan M, *et al.* A review on occurrence and risk of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in lakes of China. *Sci. Total Environ.* 2019;651:2497-506.
- Zervou SK, Christophoridis C, Kaloudis T, Triantis TM, Hiskia A. New SPE-LC-MS/MS method for simultaneous determination of multi-class cyanobacterial and algal toxins. *Journal of Hazardous Materials* 2017;323; A:56-66.
- Zhai F, Huang Y, Li C, Wang X, Lai K. Rapid determination of ractopamine in swine urine using surface-enhanced Raman spectroscopy. *J. Agric. Food Chem.* 2011;59:10023-7.
- Zhang J, Wang Z, Song Z, Xie Z, Li L, Song L. Bioaccumulation of microcystins in two freshwater gastropods from a cyanobacteria-bloom plateau Lake, Lake Dianchi. *Environ. Pollut.* 2012;164(1):227-34.
- Zhang M, Wang X, Tao J, Li S, Hao S, Zhu X, Hong Y. PAHs would alter cyanobacterial blooms by affecting the microcystin production and physiological characteristics of *Microcystis aeruginosa*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 2018;157:134-42.
- Zhang Q, Qu Q, Lu T, Ke M, Zhu Y, Zhang M, Zhang Z, Du B, Pan X, Sun L. The combined toxicity effect of nanoplastics and glyphosate on *Microcystis aeruginosa* growth. *Environ. Pollut.* 2018;243:1106-12.
- Zhang W, Huang L, Wang WX. Arsenic bioaccumulation in a marine juvenile fish *Terapon jarbua*. *Aquat Toxicol.* 2011;105:582-8.
- Zhang Z, Wang JJ. Heavy metal distribution and water quality characterization of water bodies in Louisiana's Lake Pontchartrain Basin, USA. *J. Environ. Monit. Assess.* 2016;188(11):628.
- Zheng C, Zeng H, Lin H, Wang J, Feng Z, Chen JA, Luo J, Luo Y, Huang Y, Wang L. Serum microcystin levels positively linked with risk of hepatocellular carcinoma: A case-control study in southwest China. *Hepatology* 2017;66:1519-28.

*Serie Rapporti ISTISAN
numero di giugno 2022*

*Stampato in proprio
Servizio Comunicazione Scientifica – Istituto Superiore di Sanità*

Roma, giugno 2022