

ISTITUTO SUPERIORE DI SANITÀ

Workshop
**Aspetti sanitari della problematica
dei cianobatteri nelle acque superficiali italiane**

Istituto Superiore di Sanità
Roma, 16-17 dicembre 1999

Atti a cura di
Enzo Funari
Laboratorio di Igiene Ambientale

ISSN 1123-3117
Rapporti ISTISAN
00/30

Istituto Superiore di Sanità

Workshop. Aspetti sanitari della problematica dei cianobatteri nelle acque superficiali italiane. Istituto Superiore di Sanità. Roma, 16-17 dicembre 1999.

Atti a cura di Enzo Funari

2000, iii, 151 p. Rapporti ISTISAN 00/30

I cianobatteri sono uno dei principali *phyla* di batteri. Presenti nelle acque superficiali dolci di tutto il mondo, possono formare fioriture e schiume superficiali. Possono produrre diverse categorie di tossine, tra le quali le epatotossine e le neurotossine. Sono stati riportati numerosi casi di avvelenamento mortale in molte specie animali, selvatiche e domestiche, a seguito del consumo di acque superficiali interessate da fioriture di cianobatteri. Nell'uomo sono stati riportati casi di intossicazione acuta anche grave, seppure non letale, in seguito all'uso potabile di acqua contaminata e ad attività ricreative in corpi idrici interessati da fioriture di cianobatteri. Sono stati anche descritti casi di intossicazione accidentale per via parenterale, il più grave dei quali è stato riportato in Brasile, dove sono deceduti molti pazienti sottoposti a dialisi con acqua risultata contaminata da cianotossine. Fioriture di cianobatteri sono state segnalate in diversi corpi idrici superficiali italiani. Questo problema è stato affrontato nel Workshop "Aspetti sanitari della problematica dei cianobatteri nelle acque superficiali italiane" tenuto il 16 e 17 dicembre 1999, presso l'Istituto Superiore di Sanità. Il presente rapporto ne riporta i contributi scientifici.

Parole chiave: Cianotossine, Cilindrospermopsina, Endotossine lipopolisaccaridiche, Epatotossine, Neurotossine, Microcistine

Istituto Superiore di Sanità

Workshop. Human health implications associated with cyanobacteria in Italian surface waters. Istituto Superiore di Sanità. Rome, December 16-17, 1999.

Proceedings edited by Enzo Funari

2000, iii, 151 p. Rapporti ISTISAN 00/30 (in Italian)

Cyanobacteria represent one of the main *phyla* of bacteria. They occur in internal surface waters where they can form blooms and scums. Cyanobacteria can produce many categories of toxins, among which epatoxins and neurotoxins. Numerous cases of lethal poisonings have been reported in many wild and domestic animals, due to the consumption of surface waters affected by cyanobacterial blooms. Severe human acute poisonings, but no lethal, have been observed after drinking surface water affected by cyanobacteria blooms or bathing in these waters. Some accidental poisonings through the parenteral route have been described. The most serious was reported in Brasil where many patients died after haemodialysis by water contaminated with cyanotoxins. Cyanobacterial blooms have been observed in many Italian surface waterbodies. This problem was focused in the Workshop "Human health implications associated with cyanobacteria in Italian surface waters" held on December 16-17, 1999 at the Italian National Institute of Health. This Report contains the proceedings of the Workshop.

Key words: Cyanotoxins, Cilindrospermopsins, Lipopolysaccharides endotoxins, Microcystins, Neurotoxins

INDICE

	Pag.
<i>Introduzione</i>	iii
<i>Ecofisiologia e tassonomia dei cianobatteri</i> Luisa Tomaselli	1
<i>Approcci attuali alla tassonomia, alla biodiversità e all'ecologia molecolare dei cianobatteri</i> Stefano Ventura e Maria Angela Mugnai	9
<i>Influenza dei fattori ambientali sulle fioriture di cianobatteri</i> Giuseppe Morabito	19
<i>Profilo tossicologico delle tossine prodotte dai cianobatteri</i> Michele Morari	27
<i>Valutazione del rischio sanitario associato alle fioriture di cianobatteri</i> Paola Ade, Enzo Funari	33
<i>Tecniche di analisi chimica per le principali tossine cianobatteriche</i> Francesco Pomati, Carlo Rossetti	52
<i>Applicazione di test biologici per la determinazione dell'effetto associato alle tossine cianobatteriche</i> Francesco Pomati, Carlo Rossetti	59
<i>Sonde molecolari: applicazioni attuali e prospettive</i> Anna Maria Sanangelantoni, Giuseppe Forlani, Alberto Campani, Luciana Vezzani	67
<i>Proposte per la gestione del rischio da cianobatteri tossici nelle acque interne italiane</i> Maurizio Cavalieri	75
<i>Uso delle tecniche di telerilevamento</i> Giorgio Catena	91
<i>Fioriture a cianobatteri nei laghi siciliani</i> Rossella Barone e Luigi Naselli Flores	93
<i>La struttura algale e lo stato trofico dei laghi della Sardegna</i> Nicola Sechi	101

INTRODUZIONE

La problematica delle fioriture di cianobatteri che interessa diversi corpi idrici superficiali della Sardegna, della Sicilia e della Lombardia, è caratterizzata da parecchie incertezze in particolare in riferimento alle loro proprietà tossicologiche. Ad esempio, di molte cianotossine non si conoscono gli effetti di esposizioni a lungo termine a basse dosi. Inoltre, le cianotossine finora identificate potrebbero rappresentare soltanto una parte non quantificabile di quelle esistenti.

L'OMS ha affrontato questa problematica in relazione alla qualità delle acque potabili e di balneazione. Tuttavia anche le indicazioni dell'OMS risentono, necessariamente, del deficit conoscitivo.

Attualmente, nella normativa comunitaria e nazionale non sono presenti limiti di concentrazione delle cianotossine nelle acque usate per scopo potabile e/o ricreativo. In assenza di chiari riferimenti normativi, le strutture territoriali preposte al controllo della qualità igienico-sanitaria di corpi idrici interessati da fioriture di cianobatteri si trovano davanti a grandi difficoltà.

Presso l'Istituto Superiore di Sanità, in collaborazione con il Dipartimento Prevenzione del Ministero della Sanità, è stato istituito un Gruppo di lavoro, costituito da esperti della materia, con il fine di stabilire metodologie di gestione e criteri obiettivi per la tutela della salute umana in relazione ai fenomeni delle fioriture di cianobatteri in acque superficiali in particolare usate per scopo potabile. In considerazione della complessità e della natura multidisciplinare della problematica affrontata, il Gruppo di lavoro si avvale di esperti dell'Istituto dei Laboratori di Alimenti, Igiene Ambientale e Medicina Veterinaria.

<i>I cianobatteri nei laghi trentini</i>	111
Giovanna Flaim, Virgilio Pinamonti	
<i>I cianobatteri fitoplanctonici dei laghi profondi dell'Italia settentrionale</i>	117
Garibaldi Letizia	
<i>Situazione trofica dei laghi italiani e influenza sulle fioriture da cianobatteri</i>	136
Gianni Tartari, Diego Copetti, Giorgio Abenate	

ECOFISIOLOGIA E TASSONOMIA DEI CIANOBATTERI

Luisa Tomaselli

Centro di Studio dei Microrganismi Autotrofi – CNR, Firenze

I cianobatteri o alghe verdi-azzurre costituiscono uno dei principali gruppi di procarioti. Tradizionalmente trattati come alghe, data la capacità di svolgere una fotosintesi ossigenica simile a quella delle piante, sono, in base ai dati delle sequenze nucleotidiche del rRNA 16S e del 5S, dei veri e propri batteri e costituiscono una unità filogenetica ben delimitata nell'ambito del gruppo degli eubatteri Gram-negativi [1].

Questi procarioti fototrofi presentano una vasta variabilità morfologica, comprendendo forme unicellulari, coloniali e filamentose, cui si accompagna una notevole differenza nelle dimensioni delle cellule (il diametro cellulare può essere minore di 1 μm o superare i 100 μm). In passato sono stati descritti oltre 2000 specie e circa 140 generi ed anche attualmente vengono descritti nuovi generi e specie soprattutto di regioni tropicali o di biotopi estremi [2-4].

Nelle seguenti figure sono illustrate alcune tipologie cianobatteriche.

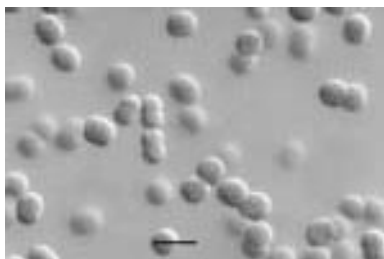


Figura 1 - *Cyanothece* sp.
Barra = 10 μm

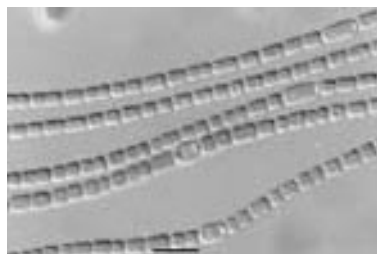


Figura 2 - *Anabaena cylindrica*
Barra = 10 μm



Figura 3 - *Arthrospira maxima*.
Barra = 10 μm

I cianobatteri sono presenti in quasi tutti gli ecosistemi fino ad ora esaminati. La capacità di fissazione dell'azoto atmosferico che caratterizza molti taxa cianobatterici, unitamente a quella fotosintetica, sottolinea il ruolo di questi organismi quali colonizzatori primari ed il loro successo in ambienti poveri di azoto combinato. La produzione di sostanze ad elevata attività biologica, sempre più documentata, è responsabile dell'azione di stimolo o di inibizione esercitata da questi fototrofi sulla crescita di altri organismi o di altri cianobatteri. Molti generi cianobatterici costituiscono i produttori primari di ambienti aerobi dove, insieme alle alghe eucariote, formano vari tipi di popolamenti planctonici. Proprio i cianobatteri del fitoplancton ed in particolare quelli delle acque dolci, sono stati oggetto del Workshop "Aspetti sanitari della problematica dei cianobatteri nelle acque superficiali italiane" tenutosi lo scorso dicembre a Roma presso l'Istituto Superiore di Sanità.

Ecofisiologia

I cianobatteri sono organismi ubiquitari e cosmopoliti, presenti in acque a differente grado di salinità e temperatura, nel suolo, sulle rocce e su vari substrati. In genere preferiscono ambienti neutri o leggermente alcalini, sebbene alcuni di essi siano stati segnalati anche in stagni acidi con valori di pH intorno a 4. Nel complesso questi organismi presentano notevole tolleranza a condizioni estreme di temperatura, intensità luminosa, siccità e nutrienti, ma soprattutto possiedono idonee risposte fisiologiche ai cambiamenti ambientali, che determinano la loro grande capacità di adattamento alle varie condizioni. La maggior diffusione si ha negli ambienti acquatici dove sono presenti come planctonici o bentonici. Negli ambienti marini i cianobatteri occupano la zona litorale ricoprendo come incrostazioni nerastre la porzione di scoglio situata al limite superiore dell'alta marea. La maggior parte di questi cianobatteri è azotofissatrice come *Calothrix*, *Nodularia*, *Rivularia*. Una caratteristica che contraddistingue i cianobatteri marini di acque più profonde è la capacità di adattamento cromatico che determina una efficiente utilizzazione di luce di breve lunghezza d'onda, come luce verde o blu, più penetrante, grazie ad una forte sintesi di ficoeritrina. Nelle acque oceaniche, i cianobatteri unicellulari di piccole dimensioni ($< 2 \mu\text{m}$) e ricchi di ficoeritrina, come *Synechococcus* e *Synechocystis*, sono i principali costituenti del picoplancton e danno il maggior contributo alla produttività primaria. Nel fitoplancton sono presenti anche cianobatteri filamentosi di maggior dimensioni, fra i quali *Trichodesmium*, in grado di fissare l'azoto atmosferico, è il più diffuso. Oltre a vivere liberi un certo numero di cianobatteri cresce in associazione con altri organismi, come ficobionti di licheni (*Nostoc*, *Gloeocapsa*), epatiche, felci, cicadali ed angiosperme. In queste associazioni i cianobatteri fissano l'azoto atmosferico, come avviene nella simbiosi più nota e studiata fra *Nostoc* e la felce acquatica *Azolla*.

L'abbondanza di cianobatteri nel plancton delle acque dolci è in gran parte una conseguenza dell'attività dell'uomo: eutrofizzazione di bacini idrici da parte di acque reflue di varia origine o di effluenti agricoli, nonché fertilizzazione diretta di bacini

destinati alla produzione ittica. Questo forte aumento dei cianobatteri provoca notevoli problemi a livello di approvvigionamento idrico interferendo con i processi di trattamento, conferendo odori e sapori ma soprattutto provocando morie di pesci, in conseguenza di fenomeni di anossia delle acque dovuti al consumo di ossigeno per respirazione o decomposizione di cellule morte, od addirittura di uccelli ed animali in seguito a produzione di tossine.

Il numero di tossine identificate, prodotte dai cianobatteri, oggi è in continuo aumento, come pure la consapevolezza che la produzione di tossine è una caratteristica comune a molti *blooms* cianobatterici. Il rischio per la salute umana dovuto alla presenza di tossine cianobatteriche nelle acque naturali e potabili è notevole e documentato oltretutto da episodi di avvelenamento, da studi di tossicità condotti su animali e dalla conoscenza delle modalità di azione delle cianotossine purificate. L'episodio più grave di avvelenamento, avvenuto in Brasile nel 1996, che ha causato la morte di almeno 55 persone sottoposte a trattamento di emodialisi, è stato attribuito alla presenza di microcistine ritrovate nel siero delle vittime [5].

I tipi morfologici presenti nelle acque dolci appartengono principalmente agli ordini Chroococcales, Oscillatoriales e Nostocales. I generi cianobatterici maggiormente diffusi sono *Microcystis*, *Oscillatoria* ed *Anabaena*. In genere nei bacini poco profondi e non stratificati sono frequenti specie di *Oscillatoria* caratterizzate da tricomi sottili (*O. redekei*, *O. limnetica*), mentre specie più grandi (*O. agardhii*, *O. rubescens*) sono tipicamente presenti in laghi eutrofici.

Fondamentalmente la distribuzione temporale dei cianobatteri è comune nei vari bacini, seguendo stagionalmente nel loro sviluppo quello delle alghe verdi, che è preceduto a sua volta da quello delle diatomee. Anche dove sono presenti durante tutto l'arco stagionale, i cianobatteri raggiungono l'entità di *blooms* solo in tarda estate o all'inizio dell'autunno. Tuttavia, sia in ambienti eutrofici temperati che tropicali, si può assistere ad una costante e massiva fioritura di popolamenti cianobatterici, spesso dominati da *Microcystis*, *Oscillatoria*, *Aphanizomenon*, *Anabaena* o *Arthrospira*.

L'accumulo di popolamenti cianobatterici sulla superficie dell'acqua, favorito da condizioni di calma, dai movimenti di *upwelling* delle correnti nonché dal forte galleggiamento di tali organismi, rappresenta spesso una forma di distribuzione spaziale del tutto transitoria che può essere facilmente e rapidamente dispersa dal vento e che è soggetta a condizioni di illuminazione sfavorevoli che determinano fotoossidazione e lisi cellulare con la conseguente scomparsa del *bloom*. Uno dei modi per controllare la crescita di *blooms* nocivi nei bacini di approvvigionamento idrico è rappresentato dalla rimozione del fosforo; proprio l'abbondanza di questo elemento è maggiormente implicata nello sviluppo massivo dei cianobatteri.

I cianobatteri sono anche importanti colonizzatori di acque termali dove possono crescere fino a temperature di circa 70°C. Esempi sono costituiti da forme unicellulari di *Synechococcus*, e da forme filamentose eterocistate (*Mastigocladus*) e non (*Oscillatoria*).

Per quanto riguarda gli ambienti terrestri, dove i cianobatteri svolgono un importante ruolo come colonizzatori contribuendo alla globale fertilità del suolo ed alla formazione dell'humus, le forme più diffuse sono rappresentate da quelle ad organizzazione

filamentosa come *Microcoleus*, *Plectonema*, *Nostoc*, *Scytonema*. Sulle superfici rocciose invece prevalgono le forme coccoidi come *Gloeocapsa*, *Chroococcus* e varie Pleurocapsales, fra cui *Chroococciopsis*.

Il principale modo di nutrizione dei cianobatteri è quello fotoautotrofo, mediante un apparato fotosintetico che attua una fotosintesi ossigenica simile a quella delle piante; esso contiene clorofilla *a* come principale pigmento fotosintetico e ficobiliproteine come pigmenti ausiliari per la cattura della luce. Inoltre, in ambienti dove è presente idrogeno solforato a concentrazioni relativamente elevate (3 mM), alcuni cianobatteri sono capaci di passare dalla fotosintesi ossigenica ad una fotosintesi anossigenica di tipo batterico. Queste proprietà permettono ai cianobatteri di colonizzare e spesso di dominare una vasta varietà di ambienti illuminati. Possono infatti essere presenti in nicchie ecologiche scarsamente illuminate, vedi cave e grotte, come pure in zone esposte alla piena e diretta luce solare. Possono infatti tollerare intensità luminose assai elevate, pari a circa 1700 μmol di fotoni $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$, o richiedere intensità estremamente basse, dell'ordine di 1-2 μmol di fotoni $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ [6]. Gli ambiti ottimali di crescita per la maggior parte dei cianobatteri sono compresi fra 50 e 200 μmol di fotoni $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$, mentre la massima crescita si ha intorno a 50-60 μmol di fotoni $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Questo avviene grazie alla notevole capacità di adattamento alla luce, posseduta dai cianobatteri, che sono in grado di rispondere a variazioni della quantità e della qualità del flusso luminoso, mediante modifiche dell'apparato fotosintetico consistenti sia in cambiamenti dell'area superficiale delle membrane tilacoidali e delle dimensioni e composizione dei loro ficobilisomi, sia nell'adattamento cromatico complementare. Quest'ultimo meccanismo permette ai cianobatteri che sintetizzano ficoeritrina di modificarne la sintesi e quindi di variare il contenuto delle ficobiliproteine a seconda della lunghezza d'onda della luce incidente. Si verifica infatti in questi pigmenti preposti alla cattura della luce una sintesi preferenziale di quelli che hanno uno spettro di assorbimento complementare alla lunghezza d'onda della luce incidente. In altre parole in presenza di luce rossa si ha stimolazione della sintesi di ficocanina e viceversa di ficoeritrina in presenza di luce verde.

I cianobatteri possiedono anche altri meccanismi con i quali rispondere alla luce. In presenza di intensità luminose particolarmente elevate e tali da inibirne la crescita, molti di loro sono in grado di sintetizzare pigmenti di natura lipofila, come ad esempio specifici carotenoidi, capaci di assorbire le radiazioni nocive, o sostanze di natura proteica capaci di limitare gli effetti nocivi delle radiazioni ultraviolette. I cianobatteri possiedono inoltre strutture in grado di schermare e disperdere la luce, quali guaine spesse e calcificate o vacuoli gassosi [7]. In particolare, i vacuoli sono una caratteristica dei cianobatteri planctonici che popolano gli ambienti acquatici. Questi sono formati da vescicole gassose, particolari strutture intracellulari che aggregandosi formano i vacuoli gassosi. Queste strutture oltre a schermare e proteggere la cellula dalle elevate intensità luminose, ne permettono il galleggiamento e fanno sì che l'organismo possa regolare la propria posizione nella colonna d'acqua. Proprio uno dei meccanismi utilizzati per questa regolazione, quale il collassamento delle vescicole gassose per effetto dell'innalzamento della pressione cellulare di turgore, è ritenuto implicato nella repentina scomparsa delle fioriture cianobatteriche caratteristiche di acque eutrofiche.

Un altro meccanismo che, oltre alle vescicole gassose, regola il galleggiamento dei cianobatteri planctonici, è costituito dalla capacità di variazione della densità cellulare grazie alla sintesi od al consumo di carboidrati [8].

I cianobatteri sono inoltre dotati di mobilità. I movimenti per scivolamento, *gliding motility*, e quello di fototassi permettono loro di posizionarsi dove le condizioni di illuminazione sono ottimali [9]. La formazione di ormogoni gas-vacuolati durante fasi del ciclo di sviluppo da parte di alcuni generi ad habitus generalmente non planctonico (*Nostoc*, *Calothrix*) rappresenta un altro meccanismo che non solo consente il galleggiamento dell'organismo, ma soprattutto contribuisce alla dispersione della specie nell'ambiente.

Come ricordato, i cianobatteri sono in prevalenza fotoautotrofi, sebbene in laboratorio alcuni siano risultati capaci di crescita eterotrofica e molti di crescita fotoeterotrofica su composti organici semplici. Meno diffusa risulta essere la capacità di crescita chemioeterotrofica al buio, mentre quella mixotrofica è alquanto ampia.

Classificazione

Il sistema di classificazione tassonomica dei cianobatteri è, come per ogni altro gruppo biologico, convenzionale dato che i differenti organismi presenti in natura non sono inseriti in unità tassonomiche strettamente delimitate. I cianobatteri, in quanto organismi fototrofi procarioti, sono stati studiati insieme alle alghe eucariote, e, come per queste, il sistema di classificazione tradizionale è basato principalmente su caratteri morfologici e citologici piuttosto che su quelli ecofisiologici. Il più importante sistema di classificazione tradizionale, la cui unità base è la specie, è quello di Geitler [10, 11]. I criteri tassonomici indicati da Geitler, ulteriormente sviluppati da Komárek e Anagnostidis [12] e più recentemente rivisti da questi autori nella prima parte del volume sulla flora di acqua dolce dell'Europa centrale "Cyanoprokaryota 1. Teil: Chroococcales" [13], sono ancora validi. Infatti, la complessità morfologica dei cianobatteri, assai più ampia di quella degli altri rappresentanti procarioti, ha fatto sì che gli attributi morfologici continuino ad essere la base delle chiavi di riconoscimento, sebbene talvolta presentino alcune limitazioni.

Accanto a questo sistema tradizionale, ad opera di Stanier e del suo gruppo (1978), si è sviluppato il cosiddetto sistema batteriologico, basato su caratteri morfologici, fisiologici, citologici e biochimici di ceppi axenici [14]. L'unità base di questo sistema di classificazione è il ceppo axenico o la coltura clonale axenica. Questo sistema di classificazione, che utilizza le regole di nomenclatura del codice batteriologico ed è riportato nel 3° volume del "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology" [15] si ferma a livello di genere. La pubblicazione dell'edizione aggiornata di questo manuale, ormai prossima, conterrà anche i dati ottenuti dallo studio filogenetico dei ceppi, che in questo ultimo decennio è esploso con determinanti ricadute. Ciò è dovuto alla crescente applicazione delle tecniche di biologia molecolare finalizzata all'inquadramento tassonomico ed allo studio di un numero sempre più ampio di ceppi axenici [16].

Il sistema di classificazione riportato nel Bergey [15], largamente accettato dai cianobatteriologi, inquadra i cianobatteri nell'ambito dei batteri fotosintetici ossigenici, insieme all'ordine dei *Prochlorales*. Questo ordine comprende un gruppo ben distinto di organismi dotati sia di clorofilla a che b, ma privo di pigmenti ficobilinici.

Il sistema batteriologico di classificazione utilizza chiavi diagnostiche relativamente semplici, basate sui seguenti caratteri: tipo di divisione cellulare e piano della successiva divisione; formazione di beociti; formazione e struttura degli ormogoni; presenza e tipo di guaina o glicocalice; forma e dimensioni cellulari e presenza di restringimenti fra cellule adiacenti dei tricomi; struttura dei tricomi (elicoidali o dritti, non ramificati, con false o con vere ramificazioni, affusolati o non); presenza e localizzazione delle eterocisti e degli acineti; presenza e localizzazione dei vacuoli gassosi. I criteri diagnostici oltre a queste principali caratteristiche morfologiche si basano anche su caratteristiche fisiologiche, chimiche e genetiche fra cui: mobilità e fototassi; composizione in basi del DNA; capacità di crescita in chemioeterotrofia o in fotoeterotrofia e specificità di substrato; richiesta di vitamine; capacità di fissazione dell'azoto atmosferico in aerobiosi o in anaerobiosi; tipi di pigmenti ficobilinici; tolleranza alle elevate temperature e/o salinità o richiesta di sali; sensibilità alla lisi da parte di specifici cianofagi.

Le chiavi diagnostiche e le descrizioni utilizzate per la suddivisione del gruppo Cianobatteri in cinque sezioni o ordini si basano sui lavori di Rippka et al. [14, 17] e Rippka [18], come riportato nel Bergey's Manual of Systematic Bacteriology [15]. Il numero di generi considerati è molto ridotto rispetto a quelli presenti nel sistema botanico di classificazione e le descrizioni di alcuni generi e "gruppi" sono ancora provvisorie. Quantunque siano attualmente disponibili in coltura pura centinaia di differenti stipiti cianobatterici, in gran parte caratterizzati, è ancora necessario un notevole lavoro di ricerca per giungere ad un soddisfacente sistema di classificazione. Lo schema utilizzato per l'inquadramento dei cianobatteri in cinque sezioni o ordini viene qui di seguito brevemente illustrato:

Sezione 1 Ordine Chroococcales

Cianobatteri unicellulari che si dividono per scissione binaria simmetricamente o asimmetricamente in uno, due o tre piani.

Esempi: *Chamaesiphon*, *Gloeothece*, *Synechococcus*, *Synechocystis*.

Sezione 2 Ordine Pleurocapsales

Cianobatteri che si riproducono per scissione multipla, con formazione di cellule figlie più piccole, o per scissione multipla e binaria.

Esempi: *Dermocarpa*, *Myxosarcina*, gruppo Pleurocapsa.

Sezione 3 Ordine Oscillatoriales

Cianobatteri filamentosi con tricomi composti da cellule non differenziate in eterocisti e acineti. Le cellule si dividono per scissione binaria in un piano dando origine a tricomi uniseriati non ramificati, possono essere presenti false ramificazioni.

Esempi: *Arthrospira*, *Lyngbya*, *Oscillatoria*, *Spirulina*, *Trichodesmium*.

Sezione 4 Ordine Nostocales

Cianobatteri filamentosi con tricomi composti da cellule vegetative intercalate con eterocisti e talvolta con acineti. Le cellule si dividono per scissione binaria in un piano dando origine a tricomi uniseriati non ramificati, possono essere presenti false ramificazioni.

Esempi: *Anabaena*, *Nostoc*, *Nodularia*, *Scytonema*.

Sezione 5 Ordine Stigonematales

Cianobatteri filamentosi con tricomi composti da cellule vegetative che si dividono per scissione binaria anche in più piani originando tricomi multiseriati e/o ramificati.

Esempi: *Fischerella*, *Mastigocoleus*, *Stigonema*.

Bibliografia

1. STACKEBRANDT E. & WOESE C.R. 1984. The phylogeny of prokaryotes. *Microbiol. Sci.* 1 (5): 117-22.
2. AZEVEDO M.T. & KOVAIK L. 1996. *Rhabdogloea brasiliica* sp. nov. (Chroococcales, Synechococcaceae): morphological and morphometric variability under cross-gradient cultures. *Arch. Hydrobiol./Algolog. Stud.* 83: 83-92.
3. AZEVEDO M.T. & SANT'ANNA C.L. 1994a. *Cyanostylon gelatinosus*, a new species (Chroococcaceae, Cyanophyceae) from Sao Paulo State, Brazil. *Arch. Hydrobiol./Algolog. Stud.* 75: 75-78.
4. AZEVEDO M.T. & SANT'ANNA C.L. 1994b. *Hormothece geitleriana*: A new edaphic chroococcal Cyanophyceae from Sao Paulo State, Brazil. *Arch. Hydrobiol./Algolog. Stud.* 75: 79-83.
5. CODD G.A., WARD C.J., BEATTIE K.A. & BELL S.G. Widening perceptions of the occurrence and significance of cyanobacterial toxins. In *The Phototrophic Prokaryotes*. G.A. Peschek, W. Loeffelhardt & G. Schmetterer (Eds), Kluwer Acad./ Plenum Publ., New York, 1999, 623-632.
6. TANDEAU DE MARSAC N. & HOURMARD J. 1993. Adaptation of cyanobacteria to environmental stimuli: new steps towards molecular mechanisms. *FEMS Microbiol. Rev.* 104: 119-190.
7. VAN LIERE E. & WALSBY A.E. Interactions of cyanobacteria with light. In *The Biology of the Cyanobacteria*. N.G. Carr & B.A. Whitton (Eds), Blackwell Sci. Publ., Oxford, 1982, 237-262.
8. WALSBY A.E. 1987. Mechanisms of buoyancy regulation by planktonic cyanobacteria with gas vesicles. In *The Cyanobacteria*. P. Fay & C. Van Baalen (Eds), Elsevier Science, Amsterdam, 1987, 377-392.
9. CASTENHOLZ R.W. Motility and taxes. In *The Biology of the Cyanobacteria*. N.G. Carr & B.A. Whitton (Eds), Blackwell Sci. Publ., Oxford, 1982, 413-439.

10. GEITLER L. Cyanophyceae. In Süßwasserflora Deutschlands, Österreichs und der Schweiz. A. Pascher (Ed), Vol. 12, Fischer-Verlag, Jena, 1925, 342-356.
11. GEITLER L. Cyanophyceae. In Kryptogamenflora Deutschland, Österreichs und der Schweiz. Rabenhorst's (Ed), Vol. 14, Akad. Verlag, Leipzig, 1932, 916- 931.
12. KOMAREK J. & ANAGNOSTIDIS K. 1986. Modern approach to the classification system of cyanophytes. 3. Oscillatoriales. *Arch. Hydrobiol./Algolog. Stud* 50/53: 327-329.
13. KOMAREK J. & ANAGNOSTIDIS K. Cyanoprokaryota I. Chroococcales. In Süßwasserflora von Mitteleuropa. H. Ettl, G. Gärtner, H. Heynig, D. Mollenhauer, (Eds), G. Fischer, Jena, 1999, 548 p.
14. RIPPKA R., DERUELLES J., WATERBURY J.B., HERDMAN M. & STANIER R.Y., 1979. Generic assignments, strain histories and properties of pure culture of cyanobacteria. *J. Gen. Microbiol.* 111: 1-61.
15. CASTENHOLZ R.W. & WATERBURY J.B. Group 1. Cyanobacteria. In Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, J.T. Staley, M.P. Bryant, N. Pfennig, J.G. Holt, (Eds), Vol. 3. Williams & Wilkins, Baltimore, 1989, 1710-1799.
16. VITI C., VENTURA S., LOTTI F., CAPOLINO E., TOMASELLI L. & GIOVANNETTI L. 1997. Genomic diversity and typing of cyanobacterial strains belonging to the genus *Arthrospira* by very sensitive total DNA restriction profile analysis. *Res. Microbiol.* 148: 605-611.
17. RIPPKA R., WATERBURY J.B. & STANIER R.Y.. Isolation and purification of Cyanobacteria: some general principles. In *The Prokaryotes* M.P. Starr, H. Stolp, H.G. Trüper, A Balows & H.G. Schlegel (Eds), Vol 1, Springer Verlag, Berlin, 1981, 212-220.
18. RIPPKA R., 1988. Isolation and purification of cyanobacteria. *Meth. Enzymol.* 167: 3-27.

APPROCCI ATTUALI ALLA TASSONOMIA, ALLA BIODIVERSITÀ E ALL'ECOLOGIA MOLECOLARE DEI CIANOBATTERI

Stefano Ventura e Maria Angela Mugnai

Centro di Studio dei Microrganismi Autotrofi, CNR, Firenze

Introduzione

Lo studio dei cianobatteri, della loro tassonomia, diversità e della loro distribuzione nell'ambiente non è certamente un mero esercizio accademico. La pericolosità di molti di questi organismi per la salute dell'uomo e gli effetti delle loro interazioni con l'ambiente naturale e le strutture artificiali giustificano un'attenzione concreta, puntuale, tutt'altro che incantata al problema della loro identificazione e del loro monitoraggio. Fortunatamente, esistono anche forti motivazioni positive a questi studi, perché molti ceppi cianobatterici sono produttori di molecole di enorme interesse biotecnologico come sostanze bioattive ad azione citotossica o antibiotica, pigmenti, acidi grassi poliinsaturi. Sia per il controllo che per lo sfruttamento biotecnologico di questi microrganismi fotosintetici si rendono quindi necessari la definizione di un sistema tassonomico stabile, ben strutturato e praticamente utilizzabile, la elaborazione di sistemi in grado di esplorare agilmente la biodiversità cianobatterica al livello dei singoli ceppi e lo sviluppo di metodologie rapide e sensibili per descrivere e rilevare le dinamiche di popolazioni naturali. Tutto ciò può oggi essere fatto utilizzando metodologie molecolari basate sulle caratteristiche degli acidi nucleici, a patto però di mantenere, per questi approcci, un costante confronto ed una sinergia con ciò che da sempre dei cianobatteri viene visivamente, o meglio microscopicamente, percepito, e cioè le loro molteplici morfologie e gli approcci identificativi su di esse basati.

Questo contributo presenta e discute le possibilità oggi fornite dagli approcci molecolari ai problemi identificativi e di rilevamento dei cianobatteri e ne indica anche alcuni sviluppi futuri che si spera possano rendere meno aleatorio il controllo di questi microrganismi.

Tassonomia dei cianobatteri

L'approccio classico alla tassonomia dei cianobatteri è un approccio di tipo botanico perché i cianobatteri, conosciuti come cianoficee, cianofite e alghe verdi-azzurre, sono stati considerati esclusivamente come microalghe fino a pochi decenni orsono. Solo a partire dagli anni settanta [1] è stata invece data rilevanza al fatto che questi organismi dotati di fotosintesi ossigenica sono veri procarioti. Anche il nome cianobatteri, che esprime la natura procariotica di questi organismi, è di recente introduzione. Studi filogenetici basati sull'analisi dei cataloghi degli oligonucleotidi dell'rRNA 16S [2] e

sull'analisi delle sequenze della stessa molecola [3] hanno ben dimostrato che i cianobatteri costituiscono una branca monofiletica situata all'interno della radiazione evolutiva dei batteri. Inquadrare questi microrganismi nel sistema tassonomico batterico, applicando le regole e le procedure del Codice Batteriologico è quindi pienamente giustificato dalla loro natura di procarioti, ma è anche l'unico mezzo per dare origine ad un sistema tassonomico naturale, cioè ad un sistema di classificazione che rispecchi il più possibile la storia evolutiva. Anche se da un punto di vista pragmatico e strettamente operativo qualunque sistema di classificazione che permetta l'identificazione sicura e rapida di un organismo svolge egregiamente il suo compito principale, tuttavia un sistema naturale dovrebbe essere meno esposto all'arbitrio dei singoli ricercatori, più universalmente condivisibile e, infine, anche più stabile.

Il sistema botanico ha generato, in un lasso di tempo di circa due secoli, un numero impressionante di specie e generi, per le quali esistono al più disegni diagnostici e fotografie di campioni prelevati dall'ambiente naturale. Le categorie tassonomiche botaniche si basano quindi essenzialmente su descrizioni morfologiche ed ecologiche di popolazioni naturali. Grande importanza viene da sempre data al ciclo ed alle modalità di divisione cellulare, mentre solo ultimamente viene affermata l'esigenza di integrare queste descrizioni con altri tipi di dati, acquisiti anche attraverso il metodo sperimentale.

Uno schema tassonomico che segua le regole del Codice Batteriologico non è ancora stato definito per i cianobatteri, ma alla fine degli anni settanta fu formulata una proposta [1, 4], che nelle intenzioni degli estensori avrebbe dovuto portare ad una riconciliazione fra i due approcci botanico e batteriologico, con la elaborazione di una tassonomia unica. Questa proposta prevede che, nelle more dell'elaborazione di uno schema unitario, le nuove specie descritte secondo uno dei due codici, Botanico o Batteriologico, siano considerate validamente descritte anche secondo l'altro codice. Negli anni seguenti gli atteggiamenti di botanici e batteriologi nei riguardi del problema della tassonomia dei cianobatteri sono stati radicalmente differenti. Mentre i batteriologi, stante la mancanza di un sistema tassonomico definito, hanno preferito soprassedere alla definizione di nuove specie, concentrandosi sulla ricerca necessaria alla strutturazione del sistema stesso e sull'elaborazione di un quadro generale che trova la sua definizione più completa nel *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* [5], i botanici hanno continuato a descriverne, basando le descrizioni prevalentemente sulle sole osservazioni di campioni naturali [6]. Stando all'accordo di cui accennavamo sopra, queste ultime specie dovrebbero essere accettate anche sotto il Codice Batteriologico, ma a nostro avviso, sia l'accordo menzionato non è vincolante, sia le specie di cianobatteri descritte solo in base ad osservazioni morfologiche ed ecologiche non possono per alcuna ragione essere considerate come validamente descritte secondo il Codice Batteriologico, cioè come vere specie batteriche quali dovrebbero essere.

L'equivoco sullo stato tassonomico dei cianobatteri può essere risolto semplicemente osservando che questi organismi non possono essere trattati contemporaneamente come microalghe e come batteri. Dal momento che esistono inoppugnabili evidenze che essi, pur dotati di fotosintesi ossigenica, sono realmente batteri, è necessario puntare ad un sistema tassonomico che tali li consideri e che pertanto ricada sotto le regole del solo Codice Batteriologico. Un altro argomento è, semmai, quanto l'attuale codice sia

efficace nel permettere l'elaborazione di un sistema tassonomico valido per tutti i procarioti, ma questo non può essere discusso in questa sede.

L'approccio più attuale alla tassonomia dei cianobatteri [7], e più in generale di tutti i batteri, è il cosiddetto approccio polifasico [8, 9]. Nella tassonomia polifasica, le cui operazioni sono schematizzate nella Figura 1, la specie viene definita univocamente dalla somma di quanti più caratteri diversi, che devono spaziare dalla morfologia alla struttura cellulare, alla fisiologia, alla struttura del genoma, all'ecologia. Si tratta a ben vedere di un approccio fortemente sperimentale e che, come tale, richiede in maniera assoluta la disponibilità di colture pure degli organismi che si vogliono caratterizzare. Di ogni specie descritta deve essere conservato, e reso disponibile alla comunità scientifica, almeno un ceppo in coltura pura - ma che validità potrà mai avere una descrizione basata sull'analisi di un solo ceppo! - che viene definito come ceppo tipo della specie e al quale si farà riferimento per delineare e confrontare le vere caratteristiche della specie. In uno studio tassonomico polifasico il punto di partenza è dato dalla determinazione della collocazione filogenetica dei ceppi in esame. Ciò viene comunemente ottenuto dallo studio di una sequenza, spesso solo parziale, del gene dell'RNA ribosomiale 16S; tale sequenza viene allineata ad una banca dati di sequenze omologhe che, per i cianobatteri, è in rapida crescita ed assomma attualmente ad alcune centinaia di sequenze. Determinata la collocazione filogenetica, per condurre uno studio affidabile è necessario prendere in considerazione un numero piuttosto elevato di ceppi filogeneticamente correlati, per poter riconoscere gruppi omogenei ai più bassi livelli tassonomici (specie, genere) e per poter valutare il grado di diversità fra ceppi accettabile all'interno di ciascun gruppo. Una volta identificati in via preliminare gruppi di ceppi simili, possono essere definiti, su base genomica, raggruppamenti potenzialmente corrispondenti a nuove specie. Lo strumento da applicare a tal fine è la misura della somiglianza globale fra i genomi, ottenuta tramite ibridazione DNA-DNA.

Attualmente questo approccio, pur impreciso e tecnicamente impegnativo, costituisce una sorta di standard di riferimento per la determinazione delle specie batteriche [10]. Comunemente, si considera che possano costituire un'unica specie ceppi che mostrano valori di ibridazione DNA-DNA superiori al 70%. Raggruppamenti di questo tipo formano le cosiddette genospecie, o specie genomiche. La solidità di queste genospecie è opportuno che venga confermata anche da altri approcci che studiano la struttura del genoma, come ad esempio profili di restrizione o polimorfismi dello spaziatore intergenico ribosomiale (ITS). Perché queste possano essere definite formalmente come specie è però necessario che la stretta somiglianza fra i genomi sia accompagnata da un congruo livello di somiglianza fenotipica che deve essere indagata mirando ad una descrizione sistematica più completa possibile. Per i cianobatteri, organismi fotoautotrofi con un livello di differenziamento biochimico e funzionale estremamente limitato al confronto con altri gruppi batterici di simile ampiezza, ritornano ad assumere importanza fondamentale le caratteristiche morfologiche e ultrastrutturali, questa volta però ben integrate e relativizzate all'interno dell'approccio polifasico.

Bacterial taxonomy

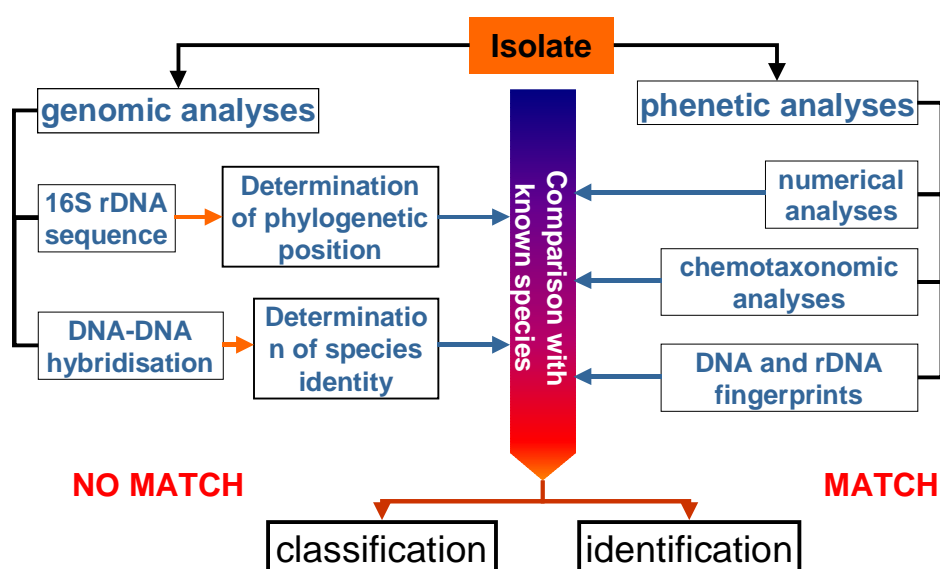


Figura 1. - Schema dell'approccio tassonomico polifasico per l'identificazione e la classificazione dei batteri, da applicare anche alla tassonomia dei cianobatteri. Modificato da una presentazione di E. Stackebrandt.

A parte la difficoltà culturale di accettarne l'integrazione nel sistema batterico, a nostro parere sussistono due ostacoli principali allo sviluppo di uno schema tassonomico compiuto dei cianobatteri. Il primo ostacolo risiede proprio nella grande plasticità morfologica e strutturale diffusa fra i cianobatteri, che rende assai problematico fissare, soprattutto per i ceppi coltivati, caratteristiche morfologiche e strutturali di riferimento che siano mantenute con costanza nel tempo. In generale, i cianobatteri in coltura mostrano nel tempo una forte deriva delle caratteristiche morfologiche e strutturali che, oltretutto, è anche fortemente condizionata dal mezzo di coltura e dalle condizioni di crescita. Anche la possibilità di far riferimento, per la descrizione morfologica e ultrastrutturale, alle caratteristiche mostrate dal campione naturale originale complica, anziché semplificare, la determinazione di questi caratteri. Infatti, se utilizzando il campione naturale o un isolato fresco è possibile evidenziare le caratteristiche possedute dal ceppo cianobatterico al momento dell'isolamento, non è sicuramente possibile sganciarne la determinazione dal contesto dell'habitat di origine, cosicché ceppi appartenenti alla stessa specie ma isolati da habitat separati potrebbero mostrare caratteri piuttosto differenti. L'uso esclusivo del campione originale preclude poi il soddisfacimento di uno dei requisiti fondamentali del metodo sperimentale applicato alla tassonomia: la possibilità per chiunque di ripetere misure e

determinazioni, delineando, dai dati ottenuti, proposte alternative per il quadro tassonomico. Il secondo ostacolo riguarda il valore di riferimento del 70% di ibridazione del DNA per le specie genomiche. Questo valore non è un dogma, ma è stato estrapolato in seguito all'accumularsi di dati di ibridazione ottenuti negli anni da molti laboratori e dal loro paragone con la caratterizzazione fenotipica di un gran numero di ceppi appartenenti a tutti i gruppi che costituiscono la radiazione dei batteri. All'interno della radiazione dei batteri, il phylum dei cianobatteri non è mai stato sistematicamente studiato riguardo a questo parametro e perciò risulta problematico dire se il valore del 70% sia adeguato e fissare un provvisorio limite di riferimento per orientare gli studi. In questo caso la soluzione, più semplice concettualmente, è però ostacolata dalla laboriosità dell'approccio sperimentale e dalla difficoltà di ottenere DNA di qualità adeguata da un numero elevato di ceppi axenici. Bisogna anche ricordare che la ricerca sui cianobatteri è sviluppata da relativamente pochi gruppi specializzati al mondo e che quindi dati impegnativi su grandi numeri di ceppi necessitano di tempi lunghi per essere accumulati.

Al contrario della tassonomia, gli studi di filogenesi basati sull'analisi delle sequenze dei geni dell'rRNA 16S sono abbastanza sviluppati per i cianobatteri. Anche se questo non è di aiuto per la vera e propria identificazione di ceppi, tuttavia l'avere a disposizione un albero filogenetico abbastanza dettagliato consente di focalizzare con più precisione il lavoro di descrizione e di revisione delle specie di cianobatteri.

Biodiversità dei cianobatteri

Cosa si intende per biodiversità dei cianobatteri e, più in generale, per biodiversità dei microrganismi [11]? Questa domanda è niente affatto banale perché il concetto stesso di biodiversità si è venuto a sviluppare riferito ad animali e a piante, organismi per i quali esistono, con buona approssimazione, barriere riproduttive che concorrono a delimitare le specie. Nell'approccio classico si possono distinguere diversi livelli ai quali valutare la biodiversità: la biodiversità ecologica quando si valuta l'abbondanza di specie presenti in un habitat ed il loro peso relativo, la biodiversità fenotipica o tassonomica che misura il numero e la varietà delle specie di un dato gruppo sistematico (ad esempio il numero di specie di insetti), ed infine la biodiversità subspecifica, all'interno della stessa specie, misurabile essenzialmente come diversità genetica.

Questo panorama, comunque piuttosto complesso anche per piante ed animali, non può essere riprodotto come tale per i microrganismi [12], ed in modo particolare per i cianobatteri, a causa della mancanza di un dettagliato sistema di riferimento tassonomico che definisca inequivocabilmente le specie ed in secondo luogo perché il puro esame morfologico non è in grado di valutare la biodiversità, soprattutto quella subspecifica. Ciò non significa che lo studio della biodiversità cianobatterica debba essere rimandato a tempi migliori, anzi, senza pretendere di mimare gli studi condotti con gli organismi superiori, esso può portare a importanti contributi in settori differenziati che, in fin dei conti, fanno sempre riferimento ai tre livelli di biodiversità prima schematizzati.

Al livello tassonomico lo studio della biodiversità cianobatterica può concorrere a formare un concetto di specie cianobatterica effettivamente basato sull'esame di un largo numero di ceppi e sulla valutazione quanto più possibile oggettiva e misurabile della loro diversità. Lo studio della biodiversità cianobatterica si può anche intrecciare strettamente con lo studio della ecologia di questi organismi, soprattutto per quanto riguarda la necessità di descrivere compiutamente la composizione e la struttura di una popolazione cianobatterica naturale. Infine, lo studio della biodiversità subspecifica dei cianobatteri schiude il campo al reperimento di nuovi ceppi dotati di particolari caratteristiche metaboliche, particolarmente attrattive in vista di uno sfruttamento biotecnologico.

Caratteristica comune a tutti questi approcci è la necessità di considerare grandi numeri di ceppi. L'opportunità di farlo è fornita dall'applicazione di metodologie molecolari di caratterizzazione e tipizzazione, basate sulle caratteristiche di un certo numero di geni, non molti per la verità. I geni più studiati per questi scopi sono sicuramente quelli dell'operone ribosomiale: rDNA 16S [13] e 23S e ITS o spaziatore intergenico trascritto; sono però stati presi in considerazione anche altri geni, quali geni della ficocianina, delle vescicole gassose, geni *nif*, geni di differenti tRNA. Un posto a parte è occupato dall'uso di sequenze non codificanti altamente ripetute [14, 15]. Gli approcci sperimentali utilizzabili sono la determinazione della sequenza genica, anche parziale, oppure la tipizzazione basata su profili di restrizione dei geni amplificati. Fino a pochi anni orsono la tipizzazione tramite profili di restrizione costituiva il sistema d'elezione per lo studio di un numero elevato di ceppi, pur presentando costi considerevoli all'aumentare del numero di endonucleasi di restrizione impiegate; i ceppi che risultavano di particolare interesse in base ai risultati dell'analisi di restrizione, venivano poi scelti per ottenere sequenze geniche. Attualmente, con la diffusione dei sequenziatori automatici e la nascita di molte imprese di servizi biotecnologici, il prezzo delle sequenze geniche sta rapidamente abbassandosi, mentre aumentano la rapidità e l'affidabilità del risultato; si può quindi scegliere, caso per caso, fra i due approcci in base alle necessità della ricerca. Qualora si stia studiando un numero particolarmente elevato di ceppi molto simili può essere opportuno un primo ciclo di analisi di restrizione, tramite il quale studiare un frammento di DNA piuttosto lungo, come per esempio un frammento comprendente il gene dell'rRNA 16S e l'ITS adiacente, per un totale di circa 2000-2200 paia di basi. Quando l'analisi della biodiversità è focalizzata sul livello tassonomico, cioè a valutare il numero e la divergenza di specie simili, è opportuno considerare l'ottenimento di sequenze complete dell'rDNA 16S, in modo da poter condurre confronti sensati con la banca dati esistente per questo gene e da ottenere così anche informazioni filogenetiche. Quando invece lo scopo principale dello studio è la tipizzazione di ceppi molto simili, anche in connessione con la possibilità di identificare e riconoscere ceppi dotati di particolari caratteristiche metaboliche, attrattive per applicazioni biotecnologiche, allora è opportuno prevedere l'uso di sistemi di analisi di restrizione su vari frammenti di DNA e possibilmente con l'impiego di un certo numero, anche 5-8, endonucleasi differenti. Il ritrovamento di differenti classi di sequenze altamente ripetute anche nei cianobatteri ha aperto la possibilità di usare queste regioni per ottenere profili elettroforetici da utilizzare per la tipizzazione dei

ceppi. In questo tipo di approccio vengono amplificate regioni di genoma adiacenti alle sequenze ripetute, ottenendo un profilo di bande elettroforetiche caratteristico del singolo ceppo, senza bisogno di utilizzare enzimi di restrizione. I frammenti amplificati sono però di contenuto sconosciuto e ciò limita l'applicabilità di questo approccio alla sola tipizzazione. Da alcuni anni, nel nostro laboratorio vengono condotti studi di tipizzazione di cianobatteri, che finora hanno interessato ceppi appartenenti ai generi *Arthrospira* [16], *Microcystis* e *Nostoc* e cianobatteri unicellulari [13] o filamentosi di ambienti ipersalini. I dati ottenuti dall'analisi dei geni ribosomiali, soprattutto per i cianobatteri unicellulari di ambienti ipersalini e per una novantina di ceppi di *Nostoc*, mostrano che la biodiversità dei cianobatteri, ai livelli della specie e subspecifico, è stata fino ad ora assolutamente sottostimata. Si prospettano quindi grandi sviluppi sia dal punto di vista tassonomico che biotecnologico, una volta che si sarà in grado di apprezzare compiutamente la biodiversità di questi organismi.

Ecologia molecolare

Se la tassonomia e lo studio della biodiversità dei cianobatteri non sono completamente sviluppati, l'ecologia molecolare di questi organismi è veramente ancora agli esordi. Eppure, come per tutti i microrganismi, proprio su questa disciplina si dovrà contare per risolvere le sfide attuali dell'ecologia microbica: la valutazione della composizione e della variabilità genetica delle popolazioni naturali, la misura quantitativa e qualitativa delle loro dinamiche e il riconoscimento e monitoraggio di organismi specifici nell'ambiente. Le difficoltà nell'affrontare questi punti sono direttamente generate dalle caratteristiche peculiari delle popolazioni microbiche che, schematicamente, consistono nelle dimensioni microscopiche degli individui che li rendono difficilmente rilevabili e li pongono in relazione con microhabitat di dimensioni submillimetriche, negli elevati tassi metabolici che si riflettono in elevate velocità di crescita, in rapidissime trasformazioni delle popolazioni e in drastici e repentini effetti sull'ambiente circostante, nelle dimensioni numeriche delle popolazioni naturali che ne rendono problematico il campionamento significativo. In questo periodo pionieristico, alcuni approcci che coniugano analisi molecolare e identificazione su base morfologica sembrano particolarmente attraenti; ne daremo perciò una succinta presentazione.

Il primo studio riguarda l'analisi di popolazioni naturali di cianobatteri filamentosi ed è stato messo a punto su popolazioni marine di *Nodularia* del Mar Baltico [17]. Singoli filamenti cianobatterici vengono direttamente prelevati, sotto il microscopio binoculare, con un ago sterile da goccioline di campione. Dopo essere stato lavato per mezzo di ripetuti passaggi in goccioline di soluzione fisiologica, ciascun filamento viene utilizzato per inoculare una reazione di PCR. Tramite due cicli che utilizzano due coppie di primer delle quali la seconda è interna alla prima (nested PCR), si amplifica un frammento di gene della ficocianina. La diversità genetica della popolazione viene studiata tramite la valutazione delle varianti alleliche ritrovate nei filamenti esaminati.

Un'altro interessante approccio è l'ibridazione in situ con sonde fluorescenti (FISH) [18, 19]. In questa metodica il campione viene fissato su un vetrino da microscopio e le pareti cellulari vengono permeabilizzate senza distruggerne la struttura e la morfologia caratteristica. Su questo campione fissato e permeabilizzato viene eseguita un'ibridazione con sonde oligonucleotidiche specifiche per l'rRNA ribosomiale 16S marcate con fluorocromi. Legandosi all'rRNA situato nei ribosomi, che in condizioni di forte attività metabolica sono presenti anche in parecchie migliaia di copie per cellula, le sonde fluorescenti generano un segnale che può essere osservato con un normale microscopio ottico a fluorescenza o, meglio, con un microscopio confocale a scansione laser, mettendo in evidenza non solo la presenza di ibridazione, ma anche la morfologia delle cellule bersaglio. Esiste anche la possibilità di amplificare il segnale per via chimica, se debole. La specificità dell'ibridazione in situ dipende dalla progettazione delle sonde oligonucleotidiche: si possono predisporre sonde in grado di ibridare con gruppi molto ampi, ad esempio con tutti i cianobatteri, come pure sonde ad elevata specificità, fino alla specie, ad esempio specifiche solo per *Microcystis*. Per disegnare in maniera affidabile sonde oligonucleotidiche a specificità nota e controllata è necessario avere a disposizione un database di sequenze di rRNA 16S cianobatterico più ampio possibile, ed anche un software in grado di elaborare l'allineamento contemporaneo di queste sequenze tenendo conto della struttura secondaria della molecola. L'ibridazione in situ, una volta che il database di sequenze sarà molto ampio, permette di accoppiare il riconoscimento o la ricerca della presenza su base molecolare al riconoscimento morfologico al microscopio; inoltre, recuperando nuove sequenze di rDNA 16S cianobatterico dall'ambiente naturale, è possibile costruire sonde specifiche per queste sequenze e utilizzare FISH per identificare la morfologia di questi cianobatteri "misteriosi".

L'ultimo approccio che qui viene presentato è ancora da sviluppare: si tratta infatti dell'argomento di un progetto finanziato dalla Commissione Europea al quale partecipa anche il nostro laboratorio. Il progetto, denominato "Design and testing of DNA microarrays to monitor microbial diversity with adequate biodiversity indexes, using cyanobacteria in freshwater as a model system", con acronimo MIDI-CHIP, prevede la progettazione di un "microchip a DNA", cioè di un supporto miniaturizzato contenente migliaia di sonde di ibridazione, in grado di determinare la composizione della popolazione cianobatterica di un campione naturale. Assieme al microchip verrà anche sviluppato un software in grado sia di interpretare i segnali ottenuti dalla matrice di sonde, sia di integrare questi dati con una larga serie di altri parametri di caratterizzazione delle popolazioni cianobatteriche, fra cui i classici parametri morfologici, al fine di calcolare indici ecologici che descrivano compiutamente le dinamiche di popolazione dei cianobatteri. In prospettiva, l'uso integrato di un simile sistema comprendente un microchip ed un software ecologico orientato ai cianobatteri, dovrebbe mettere istituzioni di ricerca e laboratori d'analisi, ognuno per i propri scopi, in grado di seguire e caratterizzare in tempo quasi reale le popolazioni cianobatteriche di ambienti naturali ed artificiali.

Ringraziamenti

Si ringrazia Maria Cristina Margheri per la approfondita discussione degli argomenti trattati e per la lettura critica del manoscritto. Il lavoro sperimentale degli autori è stato finanziato dai contratti CE/CNR: BASIC n° BIO4-CT96-0256 e MIDI-CHIP n° EVK2-CT-1999-00026.

Bibliografia

1. STANIER, R. Y., SISTROM, W. R., HANSEN, T. A., WHITTON, B. A., CASTENHOLZ, R. W., PFENNIG, N., GORLENKO, V. M., KONDRAT'eva, E. N., EIMHJELLEN, K. E., WHITTENBURY, R., GHERNA, R. L., and TRÜPER, H. G.. Proposal to place the nomenclature of the cyanobacteria (blue- green algae) under the rules of the International Code of Nomenclature of Bacteria. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1978, 28: 335-336.
2. DOOLITTLE, W. F. 1982. Molecular Evolution. In *The biology of cyanobacteria*. CARR, N. G. and WHITTON, B. A. (Eds.). Blackwell Scientific, Oxford, UK, p.307-331.
3. GIOVANNONI, S. J., TURNER, S., OLSEN, G. J., BARNS, S. M., LANE, D. J., and PACE, N. R.. Evolutionary relationships among cyanobacteria and green chloroplasts. *J. Bacteriol.* 1988, 170: 3584-3592.
4. STANIER, R. Y. and COHEN-BAZIRE, G. Phototrophic prokaryotes: the cyanobacteria. *Ann. Rev. Microbiol.* 1977, 31: 225-274.
5. CASTENHOLZ, R. W. and WATERBURY, J. B. 1989. Oxygenic Photosynthetic Bacteria (Sect. 19), Group I. Cyanobacteria. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (STALEY, J. T., BRYANT, M. P., PFENNIG, N., and HOLT, J. G., eds.). Williams and Wilkins Co, Baltimore, MD, p.1710-1728.
6. KOMÁREK, J. and ANAGNOSTIDIS, K. 1998. *Cyanoprokaryota. 1. Teil Chroococcales*. Gustav Fischer, Jena, Germany.
7. WILMOTTE, A. 1994. Molecular Evolution and Taxonomy of the Cyanobacteria. In *The Molecular Biology of Cyanobacteria* (BRYANT, D. A., ed.). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, p.1-25.
8. MURRAY, R. G. E., BRENNER, D. J., COLWELL, R. R., DE VOS, P., GOODFELLOW, M., GRIMONT, P. A. D., PFENNIG, N., STACKEBRANDT, E., and ZAVARZIN, G. A. Report of the ad hoc committee on approaches to taxonomy within the Proteobacteria. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1990, 40: 213-215.
9. VANDAMME, P., POT, B., GILLIS, M., DE VOS, P., KERSTERS, K., and SWINGS, J. Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. *Microbiol. Rev.* 1996, 60: 407-438.

10. WAYNE, L.G., BRENNER, D.J., COLWELL, R.R., GRIMONT, P.A.D., KANDLER, O., KRICHEVSKY, M.I., MOORE, L.H., MOORE, W.E.C., MURRAY, R.G.E., STACKEBRANDT, E., STARR, M.P., and TRÜPER, H.G. Report of the ad hoc committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1987, 37: 463-464.
11. HARPER, J. L. and HAWKSWORTH, D. L. 1995. Preface. In *Biodiversity. Measurement and estimation* (HAWKSWORTH, D. L., ed.). Chapman & Hall, London, UK, p.5-12.
12. O'DONNELL, A. G., GOODFELLOW, M., and HAWKSWORTH, D. L. 1995. Theoretical and Practical Aspects of the Quantification of Biodiversity Among Microorganisms. In *Biodiversity. Measurement and estimation* (HAWKSWORTH, D. L., ed.). Chapman & Hall, London, UK, p.65-73.
13. MARGHERI, M. C., BOSCO, M., GIOVANNETTI, L., and VENTURA, S. Assessment of the genetic diversity of halotolerant coccoid cyanobacteria using amplified 16S rDNA restriction analysis (ARDRA). *FEMS Microbiol. Lett.* 1999, 173: 9-16.
14. SMITH, J. K., PARRY, J. D., DAY, J. G., and SMITH, R. J.. A PCR technique based on the Hip1 interspersed repetitive sequence distinguishes cyanobacterial species and strains. *Microbiology* 1998, 144: 2791-2801.
15. RASMUSSEN, U. and SVENNING, M. M. Fingerprinting of cyanobacteria based on PCR with primers derived from short and long tandemly repeated repetitive sequences. *Appl. Environ. Microbiol.* 1998, 64: 265-272.
16. VITI, C., VENTURA, S., LOTTI, F., CAPOLINO, E., TOMASELLI, L., and GIOVANNETTI, L. Genotypic diversity and typing of cyanobacterial strains of the genus *Arthrospira* by very sensitive total DNA restriction profile analysis. *Res. Microbiol.* 1997, 148: 605-611.
17. HAYES, P. K. and BARKER, G. L. A. 1997. Genetic diversity within Baltic Sea populations of *Nodularia* (cyanobacteria). *J. Phycol.* 1997, 33: 919-923.
18. SCHÖNHUBER, W., ZARDA, B., EIX, S., RIPPKA, R., HERDMAN, M., LUDWIG, W., and AMANN, R. In situ identification of cyanobacteria with horseradish peroxidase-labeled, rRNA-targeted oligonucleotide probes. *Appl. Environ. Microbiol.* 1999, 65: 1259-1267.
19. SCHÖNHUBER, W., FUCHS, B., JURETSCHKO, S., and AMANN, R. Improved sensitivity of whole-cell hybridization by the combination of horseradish peroxidase-labeled oligonucleotides and tyramide signal amplification. *Appl. Environ. Microbiol.* 1997, 63: 3268-3273.

INFLUENZA DEI FATTORI AMBIENTALI SULLE FIORITURE DI CIANOBATTERI

Giuseppe Morabito

Istituto Italiano di Idrobiologia, CNR, Pallanza

Introduzione

La dominanza dei cianobatteri all'interno delle comunità fitoplanctoniche è una caratteristica osservabile in molti ambienti lacustri. I cianobatteri, infatti, rappresentano una componente normale del popolamento algale d'acqua dolce.

In particolari condizioni ambientali, il loro numero può diventare tuttavia eccessivo rispetto alla densità degli altri gruppi algali, dando origine a quei fenomeni che vanno sotto il nome di fioriture algali, durante le quali un popolamento monospecifico di cianobatteri può raggiungere densità dell'ordine di 100.000 o più cellule ml⁻¹.

Le ragioni che portano al verificarsi di una fioritura di cianobatteri non sono ancora state completamente chiarite, come sottolineano Blomqvist *et al.* [1]. La difficoltà di prevedere lo sviluppo di una certa popolazione algale non è tuttavia ristretta ai soli cianobatteri, ma riguarda pressoché tutti i gruppi algali, dato l'elevato numero dei fattori che controllano la crescita delle alghe in ambiente pelagico e la complessità delle loro interazioni reciproche.

La dominanza dei cianobatteri nei laghi ipereutrofi è stata spiegata secondo sei ipotesi principali [2]:

1. Temperature dell'acqua superiori a 20 °C.
2. Adattamento a basse intensità di radiazione luminosa.
3. Bassi rapporti N/P, soprattutto per spiegare la dominanza di cianobatteri azotofissatori.
4. Capacità di regolare la propria posizione verticale nella colonna d'acqua per sfruttare al meglio i gradienti di luce e nutrienti.
5. Resistenza alla predazione da parte dello zooplancton erbivoro.
6. Affinità elevata per la CO₂ e vantaggio competitivo in situazioni di pH elevato e CO₂ scarsa.

Più recentemente Petterson *et al.* [3] e Blomqvist *et al.* [1] hanno proposto due ulteriori ipotesi per spiegare la dominanza dei cianobatteri: rispettivamente, la prima si fonda sulla capacità di questi organismi di immagazzinare fosforo, acquisendo riserve sufficienti a sostenere la loro crescita, anche per periodi lunghi; la seconda prevede la dominanza dei cianobatteri in situazioni in cui l'azoto ammoniacale è la principale fonte di azoto inorganico.

E' molto probabile che in ambiente naturale sia l'insieme delle caratteristiche ecofisiologiche di questi organismi che li rende eccezionalmente competitivi quando si verificano certe combinazioni di fattori biotici ed abiotici a fronte delle quali le strategie di crescita dei cianobatteri si rivelano vincenti.

Strategie di crescita dei cianobatteri

Morfologia generale dei cianobatteri. - La possibilità delle alghe di crescere con successo nell'ambiente pelagico di un corpo d'acqua è legata alla capacità di sfruttare al meglio la disponibilità di luce e nutrienti disciolti, cercando anche, nel contempo, di sfuggire alla sedimentazione, alla predazione o al dilavamento idraulico. La lotta per la sopravvivenza ha portato alla selezione di organismi algali morfologicamente abbastanza differenti, con dimensioni lineari che variano tra circa 0 e 1000 μm e volumi cellulari compresi tra circa 1 e $10^9 \mu\text{m}^3$. A fronte di questa grande variabilità geometrica, si osserva una relativa costanza del rapporto superficie/volume nelle cellule algali, con valori che oscillano solamente entro due ordini di grandezza (vedi 4). Questa limitata variabilità del rapporto s/v è probabilmente un adattamento evolutivo alla vita planctonica: infatti, il valore del suddetto rapporto condiziona molti aspetti della fisiologia algale (per es. efficienza fotosintetica, assimilazione dei nutrienti, tassi di crescita).

Tra i cianobatteri troviamo alghe che, sostanzialmente, rientrano in due tipi morfologici fondamentali: l'organizzazione coloniale con cellule disposte a formare un filamento, dove i filamenti possono essere singoli (per es. *Planktothrix*, *Oscillatoria*, *Anabaena*) oppure aggregati (*Aphanizomenon*) e l'organizzazione coloniale in forma di cenobio (per es. *Microcystis*, *Aphanothece*, *Aphanocapsa*, *Merismopedia*). Entrambe le organizzazioni conferiscono dimensioni lineari e volumi piuttosto elevati (tenendo presente che la colonia va considerata, dal punto di vista funzionale, come un individuo singolo), anche se il rapporto superficie/volume è più favorevole nelle colonie filamentose. Per semplicità potremmo chiamare, nel prosieguo della trattazione, il primo tipo morfologico "tipo *Oscillatoria*" ed il secondo "tipo *Microcystis*".

Ai due tipi morfologici ora individuati corrispondono proprietà ecofisiologiche ben distinte, grazie alle quali uno o l'altro *taxon* di cianobatteri acquistano una posizione dominante in funzione delle diverse condizioni biotiche.

Adattamento all'ambiente fisico. - Tra i più importanti fattori di controllo della crescita algale in ambiente pelagico lacustre vi sono certamente quelli fisici, cioè quantità e qualità della radiazione luminosa subacquea e temperatura, non solo come valore assoluto, ma soprattutto in quanto fattore determinante nel definire la stratificazione termica e, quindi, la stabilità della colonna d'acqua.

Per quanto riguarda l'ipotesi che prevede una dominanza dei cianobatteri a temperature elevate dell'acqua non può essere generalizzata: *Microcystis*, per esempio si è dimostrata particolarmente sensibile alle basse temperature [5], mentre l'autoecologia

di *Plantothrix rubescens* nei laghi dell'Europa centrale ha invece portato ad includerla tra le specie stenoterme di acque fredde [6].

L'adattamento all'ambiente fisico si presenta, tuttavia, in termini più complessi e coinvolge l'intera fisiologia della cellula algale e le relazioni tra diversi fattori fisici.

Dalla letteratura (per es. 7) si deduce che i cianobatteri appartenenti al tipo *Oscillatoria* dovrebbero essere adattati a crescere in condizioni di basse radiazioni luminose, in virtù del loro corredo pigmentario ricco in carotenoidi, mentre le specie che solitamente danno vita a fioriture superficiali (tipo *Microcystis*), dovrebbero essere meglio adattate a radiazioni luminose elevate [8]. La differente morfologia dei due tipi e le peculiarità ecofisiologiche ad essa collegate giocano un ruolo chiave nell'adattamento alle radiazioni luminose: secondo Reynolds [4], infatti, la forma filamentosa conferisce una maggiore efficienza di sfruttamento della radiazione luminosa in virtù della maggiore quantità di luce che viene intercettata per unità di superficie, anche se le alghe con questa geometria risultano più sensibili alla fotoinibizione, contrariamente a quelle che costituiscono dei cenobi la cui forma è, più o meno approssimativamente, sferica. Dunque, il tipo *Oscillatoria* risulta avvantaggiato in acque torbide, con bassa radiazione, mentre il tipo *Microcystis* predilige le radiazioni elevate in prossimità della superficie, dove si sviluppa formando delle pellicole che attenuano fortemente la penetrazione della luce negli strati d'acqua sottostanti, incrementando ulteriormente il suo vantaggio competitivo [9].

In generale, i cianobatteri prediligono situazioni in cui la colonna d'acqua è piuttosto stabile e lo strato rimescolato è poco profondo [4], essendo scarsi competitori in acque molto turbolente, dove specie con tassi di crescita più elevati risultano avvantaggiate. Tuttavia la dominanza di un tipo morfologico o dell'altro può cambiare in funzione della relazione tra la profondità di mescolamento e quella di penetrazione della radiazione luminosa. Le diverse possibili combinazioni dei due fattori ed il loro effetto sullo sviluppo dei cianobatteri sono ben descritte da Reynolds [10]: in generale, entrambi i tipi morfologici sono in grado di crescere con successo in acque dove la radiazione luminosa penetra ad una profondità maggiore della profondità di mescolamento, mentre quando lo spessore della zona fotica è inferiore a quello dello strato rimescolato, cioè in una situazione in cui la radiazione luminosa è limitante, il tipo *Oscillatoria* è avvantaggiato rispetto al tipo *Microcystis*.

Per esempio, nei laghi olandesi [11], che hanno profondità variabili tra circa 1 m e poco più di 16 m, è stato osservato che *Oscillatoria* è largamente dominante nella classe di laghi con profondità comprese tra 0 e 2 m, mentre *Microcystis* prevale nei laghi più profondi (>16 m). Questa differenza si può spiegare col fatto che nei laghi meno profondi il mescolamento favorisce la sospensione di grandi quantità di materiale particellato, che rende torbide le acque, creando le condizioni ideali per la dominanza di *Oscillatoria*, mentre nei laghi più profondi il particellato sospeso risulta minore e, inoltre, è possibile che si crei anche una certa stratificazione termica, intervallata da episodi di mescolamento; situazione ideale per lo sviluppo di *Microcystis*, che, grazie alla possibilità di regolare la sua posizione verticale, si riporta rapidamente in prossimità della superficie, una volta ristabilita la stratificazione termica (vedi 4).

Cianobatteri e disponibilità di nutrienti. - Tra le ipotesi elencate in precedenza per spiegare la dominanza dei cianobatteri, alcune sono soddisfatte dalle loro capacità di adattamento alle variazioni dell'ambiente fisico. Tuttavia, anche i meccanismi fisiologici che regolano l'assimilazione dei nutrienti in questo gruppo algale giocano un ruolo importante nel conferire ai cianobatteri strategie di crescita vincenti in determinate situazioni. Anche in questo la morfologia cellulare è importante: esiste infatti una buona correlazione [4] tra il tasso di crescita delle alghe ed il rapporto superficie/volume. I cianobatteri non sono, generalmente, tra le alghe con i tassi di crescita più elevati, in particolare quelli appartenenti al tipo *Microcystis* hanno un tasso di crescita tra i più bassi misurati nel fitoplancton in coltura [4].

Per quanto riguarda il fosforo, principale nutriente limitante per la crescita algale in acque dolci, i cianobatteri mostrano, in generale, una elevata capacità di assimilazione per questo nutriente, il che, unito ai tassi di crescita non elevati, caratterizza questo gruppo algale come adattato ad immagazzinare nutrienti. I cianobatteri, tuttavia, non mostrano capacità di assimilazione superiore ad altri gruppi algali in condizioni di fosforo limitante [11]. Si è invece visto che, in situazioni in cui la disponibilità di fosforo è bassa, ma si verificano periodicamente flussi di breve durata ma con concentrazioni elevate di P, questi organismi sono competitivamente avvantaggiati, grazie alle loro possibilità di accumulo intracellulare di nutrienti ed ai tassi di crescita bassi. In questi casi anche una quantità piccola di nutrienti immagazzinati può garantire un lungo periodo di crescita, sebbene in presenza di concentrazioni limitanti nell'ambiente esterno. Uno studio condotto sui laghi olandesi [11] ha mostrato che i cianobatteri, analogamente ad altri gruppi algali, praticamente dominano in un ampio intervallo di concentrazioni di fosforo totale, mentre qualche differenza tra i *taxa* è emersa relativamente alle concentrazioni di fosforo solubile: in particolare si è osservata una larga dominanza del tipo *Oscillatoria* nei laghi dove il fosforo reattivo solubile era più basso ($0-10 \mu\text{g l}^{-1}$), mentre *Microcystis* è risultata prevalente a concentrazioni di SRP tra 200 e $500 \mu\text{g l}^{-1}$. Questa differenza era attribuibile ad una maggiore incorporazione di P nella biomassa algale nel primo caso rispetto al secondo.

Per quanto riguarda l'approvvigionamento di azoto, i cianobatteri hanno delle proprietà metaboliche peculiari, che in alcuni casi possono favorirne la dominanza. Oltre alla nota proprietà di fissare l'azoto atmosferico, che alcune specie possiedono e che le porta a diventare dominanti in sistemi fortemente eutrofizzati, dove, a causa della elevata disponibilità di fosforo, l'azoto diviene il fattore limitante, alcune osservazioni [1] hanno dimostrato come questo gruppo algale sia favorito in ambienti dove la principale fonte di azoto inorganico è rappresentata da azoto ammoniacale. Grazie a questa caratteristica, i cianobatteri competono vantaggiosamente con altre alghe sia in laghi oligotrofi a bassa alcalinità, in cui il processo di nitrificazione dell'azoto ammoniacale derivante dalla decomposizione di sostanza organica non è sufficientemente attivo e non esistono altri apporti di azoto inorganico, sia in laghi eutrofi in cui è esaurita la disponibilità di azoto inorganico, ma i processi di riciclo dell'azoto organico sono sufficienti a sostenere la produttività.

Tra le ipotesi che sono state avanzate per spiegare il successo dei cianobatteri vi è anche quella secondo cui un pH elevato e bassi valori di CO₂ favoriscono i cianobatteri. Secondo uno studio di Shapiro [12], queste condizioni chimiche non sono sufficienti per promuovere lo sviluppo iniziale dei cianobatteri, tuttavia, una volta che questi sono divenuti dominanti, sono in grado di utilizzare in modo molto efficiente la CO₂ anche a basse concentrazioni, inibendo così lo sviluppo di altre alghe. Questa conclusione, rivista da Hyenstrand *et al.* [13], si spiega probabilmente col fatto che i cianobatteri hanno dei meccanismi metabolici di concentrazione della CO₂, considerato che l'enzima RubisCO (ribulosio-1,5-difosfato-carbossilasi) dei cianobatteri non ha una affinità per la CO₂ superiore alle RubisCo di altri gruppi algali.

Altri fattori di controllo. - E' scontato che lo zooplancton possa influire negativamente sullo sviluppo algale attraverso la predazione (*grazing*), di cui risentono maggiormente le alghe di minori dimensioni, che di solito sono quelle con i più alti tassi di crescita e di assimilazione. La riduzione della biomassa algale causata dal *grazing* può indurre una minore richiesta di nutrienti, col risultato di aumentarne la disponibilità per le alghe meno edibili, altrimenti sfavorite dai loro bassi tassi di assimilazione. Quando si verifica una situazione di questo tipo i cianobatteri risultano generalmente avvantaggiati, data la loro resistenza alla predazione [14].

Il concetto di habitat template. - Una comunità fitoplanctonica è dunque controllata da numerosi fattori, le fluttuazioni dei quali ne modellano la struttura, creando, in ogni momento dell'anno, condizioni di vita favorevoli ad alcune specie e sfavorevoli ad altre. Per ogni specie esiste una combinazione ottimale di valori dei diversi fattori biotici ed abiotici all'interno della quale il suo tasso di crescita è massimo. Tale combinazione viene indicata come *habitat template*. Una sua rappresentazione efficace è quella riportata in Figura 1, riferita a *Chlorella* sp., dove le isolinee uniscono i punti che hanno lo stesso valore del tasso di crescita, in relazione ai valori assunti dalla radiazione luminosa (I^*), dalla profondità di mescolamento (h_m), dalla temperatura (θ), dal tasso di filtrazione dello zooplancton (f), dalla disponibilità di carbonio libero (CO₂) e di nutrienti (P). Un grafico di questo tipo può essere costruito per molte specie algali e gli *habitat templates* di diverse specie possono essere rappresentati in un unico schema, ottenendo le combinazioni dei fattori ambientali che portano alla prevalenza o all'esclusione di certe alghe, oppure alla loro convivenza.

Nel caso dei cianobatteri è stato possibile costruire degli *habitat templates* per *Microcystis* e *Planktothrix* (Figura 2), grazie ai quali è possibile sintetizzare il complesso delle condizioni che determinano la dominanza di un tipo ecofisiologico o dell'altro. Come si può notare nella Figura 2, le differenze maggiori riguardano l'intensità della radiazione luminosa, la stabilità termica, l'optimum di temperatura, mentre appaiono molto simili le relazioni con i nutrienti (P e CO₂) e la resistenza alla predazione.

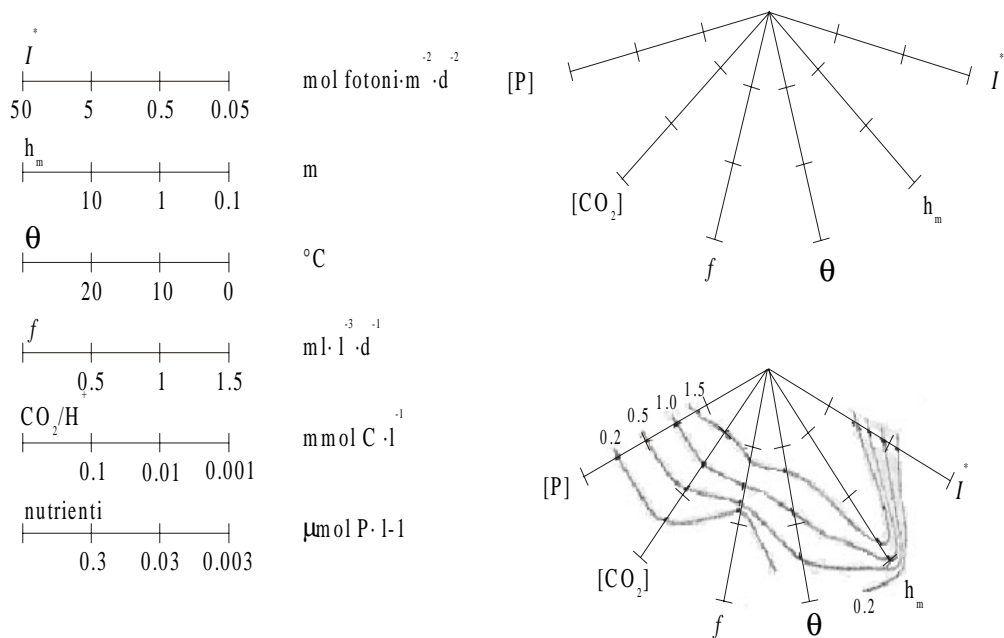


Figura 1. – Rappresentazione dei tassi di crescita di *Chlorella* sp. in funzione di valori differenti dei parametri riportati, secondo il concetto dell'habitat template. Il punto di convergenza degli assi coincide col fondo scala per tutti i parametri, eccetto che per f (tasso di filtrazione dello zooplancton) la cui scala va letta nella direzione opposta rispetto agli altri parametri. La figura è tratta da [4].

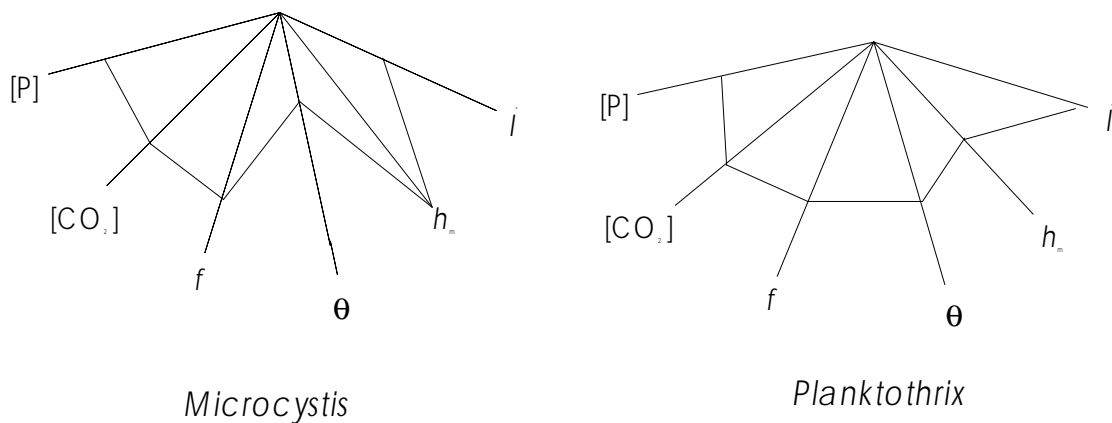


Figura 2. – Rappresentazione delle combinazioni ottimali dei parametri di Figura 1 cui corrisponde il tasso di crescita massimo di *Microcystis* e *Planktothrix*. La figura è tratta da [4].

Conclusioni

E' probabile che molte delle ipotesi elencate nell'introduzione siano coinvolte, anche contemporaneamente, nel regolare il successo dei cianobatteri. Tuttavia è opportuno distinguere tra i fattori che innescano la crescita di questi organismi e quelli che invece contribuiscono a mantenere la loro dominanza. Hyenstrand *et al.* [13] identificano come fattori principalmente responsabili nel promuovere la crescita iniziale dei cianobatteri i seguenti:

1. la temperatura elevata dell'acqua, che favorendo l'insorgere di condizioni di stratificazione, annulla il vantaggio competitivo delle diatomee e delle alghe che non sono in grado di migrare. Lo stabilizzarsi della stratificazione, porta alla separazione di strati d'acqua ricchi di nutrienti e poco illuminati da strati ben illuminati, ma con scarse risorse. In questa situazione sono avvantaggiate le alghe capaci di compiere delle migrazioni verticali. Il riscaldamento dell'acqua promuove inoltre lo sviluppo dello zooplancton erbivoro, dando quindi un ulteriore vantaggio alle alghe che resistono meglio alla predazione.
2. Limitazione da nutrienti (particolarmente azoto, ma eventualmente anche fosforo), che stimola l'utilizzo di azoto ammoniacale, favorisce i cianobatteri azotofissatori e/o aumenta il vantaggio competitivo per le forme che compiono migrazioni verticali o che si stratificano nella zona del metalimnio ricca di nutrienti (specie con vacuoli gassosi).

In conclusione è possibile delineare il quadro delle condizioni ambientali e delle proprietà ecofisiologiche che possono favorire e contribuire a mantenere la dominanza dei cianobatteri in ambiente pelagico, una volta che si siano realizzate le condizioni iniziali per un loro rapido sviluppo:

1. in primo luogo la stabilità termica della colonna d'acqua per periodi sufficientemente lunghi, oppure l'alternanza in tempi brevi di eventi di mescolamento e stratificazione;
2. l'adattamento sia a basse radiazioni luminose (tipo *Oscillatoria*) o a radiazioni superficiali di elevata intensità (tipo *Microcystis*);
3. la possibilità di regolare, tramite vacuoli gassosi, la loro posizione verticale nella colonna d'acqua, sfruttando i gradienti di luce e nutrienti, contrastando anche la sedimentazione;
4. tassi elevati di accumulo di fosforo, soprattutto quando vi sono flussi intermittenti ed abbondanti di questo nutriente;
5. utilizzo preferenziale di azoto ammoniacale;
6. sistemi metabolici di accumulo della CO₂;
7. resistenza alla predazione.

Bibliografia

1. BLOMQUIST, P., PETTERSON, A. & HYENSTRAND, P. Ammonium-nitrogen: A key regulatory factor causing dominance of non-nitrogen fixing cyanobacteria in aquatic systems. *Arch. Hydrobiol.* 1994, 132: 141-164.
2. SHAPIRO, J. Current beliefs regarding dominance by blue-greens: The case for the importance of CO₂ and pH. *Verh. Int. Verein. Limnol.* 1990, 24: 38-54.
3. PETTERSON, K., HERLITZ, E. & ISTVANOVICS, V. The role of *Gloetrichia echinulata* in the transfer of phosphorus from sediments to water in Lake Erken. *Hydrobiologia* 1993, 253: 123-129.
4. REYNOLDS, C.S. Vegetation processes in the pelagic: a model for ecosystem theory. *Excellence in Ecology* 1997, 9: 1-371.
5. ROBARTS, R. D. & ZOHARY, T. Temperature effects on photosynthetic capacity, respiration and growth rates of bloom-forming cyanobacteria. *N. Z. J. Mar. Freshwat. Res.* 1987, 21: 391-399.
6. REYNOLDS, C.S. *The ecology of freshwater phytoplankton*: Cambridge University Press, 1984, 384 p.
7. MUR, L.R., GONS, H.J. & VAN LIERE, L. Some experiments on the competition between green algae and blue-green bacteria in light-limited environments. *FEMS Microbiol. Letters* 1977, 1:335-338.
8. ZOHARY, T. & ROBARTS, R. D.. Diurnal mixed layers and the long-term dominance of *Microcystis aeruginosa*. *J. Plankt. Res.* 1989, 11:25-48.
9. VAN LIERE, L. & WALSBY, A.E. Interactions of cyanobacteria with light. In *The Biology of Cyanobacteria*. N.G. Carr. & B.A. Whitton (Eds). Blackwell Oxford, 1982. *Bot. Monographs* 19, p. 9-45.
10. REYNOLDS, C.S. The long, the short and the stalled: on the attributes of phytoplankton selected by physical mixing in lakes and rivers. *Hydrobiologia* 1994, 289: 9-22.
11. SCHREURS, H. *Cyanobacterial dominance. Relations to eutrophication and lake morphology*. Tesi di dottorato, Laboratorio di Microbiologia, Università di Amsterdam, 1992, 198 pp.
12. SHAPIRO, J. The role of carbon dioxide in the initiation and maintenance of blue-green dominance in lakes. *Freshwat. Biol.* 1997, 37: 307-323.
13. HYENSTRAND, P., BLOMQUIST, P. & PETTERSON, A. Factors determining cyanobacterial success in aquatic systems – a literature review. *Arch. Hydrobiol. Ergeb. Limnol.* 1998, 51: 41-62.
14. HANEY, J.F. Field studies on zooplankton-cyanobacteria interactions. *N. Z. J. Mar. Freshwat. Res.* 1987, 21: 467-475.

PROFILO TOSSICOLOGICO DELLE TOSSINE PRODOTTE DAI CIANOBATTERI

Michele Morari

Dipartimento Medicina Clinica e Sperimentale – Sezione di Farmacologia, Università degli Studi di Ferrara, Ferrara

Introduzione

I cianobatteri, altrimenti conosciuti come alghe verdi-blu, sono batteri fotosintetici che crescono in ambiente acquatici, prediligendo le acque ferme o poco mosse di fiumi, laghi, stagni o, più in generale, riserve idriche. La loro tossicità nei confronti delle specie viventi è nota da più di un secolo, da quando cioè furono osservati decessi di animali domestici che si erano abbeverati a riserve d'acqua contaminate [1]. Più recentemente, è cresciuta la preoccupazione circa il loro potenziale tossico per la specie umana dopo segnalazione di disturbi respiratori e gastrointestinali in soggetti che svolgevano attività sportive lungo corsi d'acqua contaminati [2-4].

Non tutte le specie di cianobatteri sono tossiche per l'uomo; infatti delle oltre 50 specie di cianobatteri conosciute, quelle più comunemente associate a tossicità sono *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Microcystis*, *Nodularia*, *Oscillatoria* e *Schizothrix*. Casi di intossicazione si verificano di norma durante i mesi estivi, quando il clima caldo e secco favorisce la fioritura algale ed il vento leggero può determinarne la concentrazione in prossimità delle rive.

I cianobatteri producono almeno tre classi di tossine che sono state riconosciute nocive per la salute umana: neurotossine, epatotossine ed endotossine. Sebbene le endotossine, di natura lipopolissacaridica, siano più comunemente associate a tossicità (blanda) nell'uomo, l'attenzione dei ricercatori si è da tempo focalizzata sugli effetti, potenzialmente letali, delle neuro- ed epatotossine di cui i caratteristici meccanismi d'azione sono stati ben descritti in diversi studi preclinici.

Tossicità acuta delle cianotossine

Le neurotossine prodotte dai cianobatteri sono l'anatossina-a, l'anatossina-a(S) e la saxitossina (e suoi derivati). Esse si differenziano per struttura chimica e profilo tossicologico.

L'anatossina-a è un potente agente colinergico in grado di stimolare i recettori nicotinici. La sua affinità per i recettori nicotinici (nel range nanomolare), come pure la sua potenza, è di varie volte superiore a quella della nicotina, tanto che l'anatossina-a è considerata il più potente agente colinergico nicotinico conosciuto [5,6]. Inoltre, come tipicamente succede durante la stimolazione nicotinica, alla fase di stimolazione subentra rapidamente quella della desensibilizzazione recettoriale (tachifilassi). Il

quadro sintomatologico dell'intossicazione riflette chiaramente questa duplicità di azione (stimolazione-inibizione) a livello dei recettori nicotinici della placca neuromuscolare (sia pre- che postsinaptici). Infatti, la somministrazione di anatoossina-a nel topo (DL_{50} = 100, 375 e 1000-10000 ug/Kg, rispettivamente, per via endovenosa, intraperitoneale e orale [7]; come peraltro in altri animali [8], è associata dapprima alla comparsa di incoordinazione motoria, fascicolazioni e tremori seguiti da affaticamento muscolare e paralisi dei muscoli respiratori. L'animale muore entro pochi minuti per asfissia, spesso associata a convulsioni riflesse. Le convulsioni possono avere anche un'origine centrale dal momento che l'anatoossina-a è in grado di attraversare la barriera ematoencefalica e di stimolare i recettori nicotinici cerebrali. Inoltre, sono stati descritti effetti a carico del sistema nervoso vegetativo, sia di natura adrenergica che colinergica (ad esempio aumento della pressione arteriosa e aumento/diminuzione della frequenza cardiaca), dovuti alla stimolazione dei recettori nicotinici gangliari.

Anche l'anatoossina-a(S) è una sostanza in grado di potenziare la trasmissione nervosa colinergica sebbene il meccanismo d'azione sia sostanzialmente diverso da quello dell'anatoossina-a. Infatti, l'anatoossina-a(S), al pari di altre sostanze tossiche più conosciute quali i pesticidi organofosforici, è in grado di bloccare l'acetilcolinesterasi, cioè l'enzima che degrada l'acetilcolina nel sistema nervoso, prolungando la permanenza e l'azione del neurotrasmettitore a livello sinaptico. L'intossicazione è quindi dovuta alla sovrastimolazione dei recettori nicotinici e muscarinici. Dal momento però che la tossina è fortemente polare, non è in grado di attraversare la barriera ematoencefalica, e quindi i suoi effetti sono confinati al sistema nervoso periferico. Il quadro sintomatologico (DL_{50} nel topo =40-60 ug/Kg per via intraperitoneale [9]; è simile a quello dell'anatoossina-a (l'animale muore per blocco respiratorio), con una maggiore presenza di sintomi vegetativi legati alla stimolazione dei recettori muscarinici (salivazione, lacrimazione, defecazione, incontinenza urinaria).

A differenza di quanto detto per le anatoossine, la tossicità della saxitossina (e dei suoi derivati) nell'uomo è ben conosciuta, dal momento che la tossina viene prodotta anche da alcune specie di dinoflagellati che entrano nel ciclo alimentare dei molluschi. Non è dunque raro, soprattutto nei paesi asiatici, registrare casi di intossicazioni (e decessi) in seguito al consumo di molluschi che hanno filtrato dinoflagellati produttori di tossina. I segni dell'avvelenamento, definito PSP (Paralytic Shellfish Poisoning) compaiono rapidamente (entro pochi minuti) e possono perdurare per qualche giorno. L'eziologia è legata al blocco dell'attività sodio-condotta, sia a livello neuronale che muscolare, in quanto la tossina è un potente bloccante dei canali del sodio voltaggio-dipendenti. Il quadro sintomatologico tipicamente esordisce con modesti sintomi gastrointestinali (nausea e vomito) seguiti da alterazioni del sensorio (parestesie) e progressiva paralisi dei muscoli scheletrici e respiratori. Le parestesie, che interessano la punta delle dita, le labbra, la lingua, e si possono estendere al collo e agli arti, sono seguite da perdita di sensibilità. La paralisi dei muscoli scheletrici può condurre ad alterazioni del visus (nistagmo, oftalmoplegia, fino a cecità transitoria), dislessia, disfagia, incoordinazione motoria, affaticamento muscolare e, infine, morte per asfissia. La prognosi è infausta in circa l'8% dei casi, anche se i pazienti che sopravvivono per le prime 12 ore si riprendono senza sequelae.

Le epatotossine sono peptidi ciclici (i pentapeptidi sono denominati nodularine mentre gli eptapeptidi microcistine) che colpiscono selettivamente il fegato. Molti sforzi sono stati compiuti per comprenderne il tropismo ed il meccanismo d'azione. Le epatotossine sono attivamente captate dagli epatociti attraverso i sistemi di trasporto degli acidi biliari. Una volta all'interno delle cellule, questi peptidi bloccano le protein fosfatasi 1 e 2A alterando i processi di fosforilazione-defosforilazione che sono fondamentali per la regolazione dell'attività cellulare. Ne risulta particolarmente danneggiato il citoscheletro, il che spiegherebbe la contrazione degli epatociti e la conseguente alterazione della permeabilità capillare che porta a shock epatico. La tossicità acuta della microcistina-LR (l'epatotossina più potente) somministrata per via intraperitoneale (DL_{50} nel topo 50-158 $\mu\text{g}/\text{Kg}$) si manifesta con prostrazione, convulsioni e depressione respiratoria, accompagnate da significativo danno epatico.

Tossicità cronica delle cianotossine

Sorprendentemente, pochi studi sono stati incentrati sulla tossicità cronica delle neurotossine ed epatotossine, un aspetto peraltro di notevole rilevanza visto il pericolo di contaminazione delle acque anche per usi domestici. In questi studi, comunque, è stato dimostrato che la somministrazione di anatossina-a per via orale a ratti per 7 settimane [10] o mediante sondino a topi per 28 giorni [11] è priva di effetti collaterali. Ulteriori studi si rendono però necessari dal momento che nello studio di Fawell e collaboratori sono stati registrati tre decessi apparentemente per cause ignote, dal momento che l'autopsia e l'analisi microscopica non ha permesso di rilevare alcuna significativa alterazione e quindi di escludere in maniera definitiva un coinvolgimento dell'anatossina-a. Inoltre, rimane da chiarire il significato dell'aumento nei livelli di emoglobina eritrocitaria osservato nei topi trattati con la tossina, giudicato peraltro di scarso rilievo tossicologico. Nello stesso studio è stata dimostrata l'assenza di effetti teratogeni dopo somministrazione di anatossina-a durante la fase di organogenesi, confermando un precedente studio di Astrachan e collaboratori [10] nel criceto. In entrambi gli studi di tossicità subcronica e riproduttiva è stato stimato un NOAEL di 2,46 mg/Kg. Al contrario, per ciò che riguarda la microcistina -LR è stato stimato un NOAEL di 40 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ in topi trattati per 13 settimane con sondino [7]. A dosi superiori sono state osservate significative alterazioni di parametri ematologici, quali un aumento della fosfatasi alcalina e delle transaminasi epatiche nonché una riduzione della proteinemia, e chiare alterazioni istopatologiche a livello epatico quali segni di infiammazione cronica con depositi di emosiderina e necrosi di epatociti. La microcistina-LR non appare essere un teratogeno specifico nel topo. Infatti, la somministrazione di 0,6 mg/Kg per via orale (sondino) durante l'organogenesi risulta priva di effetti sul feto, mentre l'embriotossicità osservata per dosi superiori (2mg/Kg) riflette chiaramente la tossicità a carico della madre [7].

Tossicità delle cianotossine nell'uomo

Sono stati registrati casi di intossicazione da cianotossine nell'uomo dopo esposizione ad acque contaminate da cianobatteri e/o loro tossine. Ciò generalmente in seguito ad attività ricreative [3,12] o al consumo di acqua per usi alimentari e non [13,14]. E' bene premettere che non in tutti gli studi presentati è stato in maniera inequivocabile escluso il coinvolgimento di altri patogeni, e quindi il nesso di causalità tra cianotossine e patologia non può essere sempre affermata in maniera incontrovertibile. In generale, comunque, casi di intossicazione severi sono piuttosto rari, probabilmente a causa della quantità ridotta di tossina introdotta nell'organismo piuttosto che ad una diversa sensibilità di specie.

Gli effetti più comuni rilevati in seguito ad esposizione accidentale a cianotossine sono a carico della cute e del sistema gastrointestinale. Si ritiene che la sintomatologia sia dovuta alle endotossine, simili a quelle prodotte da alcuni Gram(-), o alle proprietà allergeniche delle cellule in toto. Sono state comunemente osservate reazioni cutanee quali dermatiti, prurito, eruzioni bollose, edema labiale. In qualche caso i soggetti hanno manifestato una reazione sistemica febbrile. A livello gastrointestinale si osserva una sindrome ad esordio rapido (3-5 ore) che può perdurare per qualche giorno. Essa comprende vomito, nausea, crampi addominali e diarrea, e, se non opportunamente trattata, può portare a profusa perdita di liquidi e sbilancio elettrolitico. Altri sintomi riportati sono mal di gola, riniti, congiuntiviti ed otiti. Inoltre, sono stati anche segnalati cefalea, malessere e debolezza muscolare. Il quadro patologico si risolve spontaneamente entro qualche giorno e può essere utile un trattamento sintomatico. Può essere utile il monitoraggio degli enzimi epatici e degli elettroliti, nonché l'esame delle feci per la ricerca dei cianobatteri. In base alla sintomatologia riportata, non sembra che le neurotossine giochino un ruolo eziopatogenetico. Al contrario, per ciò che riguarda le epatotossine, sono stati riportati decessi in un gruppo di pazienti sottoposti ad emodialisi con acqua contaminata da microcistina-LR dal 17 al 20 febbraio 1996 in un centro di dialisi in Brasile [15]. Circa il 90% di questi pazienti ha lamentato nei giorni successivi alla seduta disturbi visivi, nausea e vomito. Ma, cosa ben più grave, dopo un mese circa, il 20% dei pazienti era morto a causa dell'insufficienza epatica mentre altrettanti risultavano ospedalizzati per la stessa ragione. Uno studio condotto in Australia ha inoltre dimostrato un aumento dei livelli di transaminasi epatiche in un gruppo di residenti che faceva uso di acque contaminate da *Microcystis* [14].

Possibili interventi terapeutici

E' bene precisare subito che non esiste antidoto specifico per l'intossicazione acuta da neuro- ed epatotossine. Rimane pertanto come unico rimedio la terapia sintomatica e di supporto delle funzioni vitali. Infatti, come precedentemente descritto, per le neurotossine che agiscono sul sistema colinergico la morte sopraggiunge a causa della desensibilizzazione dei recettori nicotinici della placca neuromuscolare. Gli inibitori della acetilcolinesterasi appaiono dunque inutili. L'utilizzo di atropina potrebbe ridurre

il grado di attivazione muscarinica periferica nel caso di intossicazioni da anatoxina-a(S), anche se non appare in grado di salvare la vita all'animale. Per ciò che riguarda la saxitossina non esistono ancora in clinica sostanze in grado di spiazzare la sostanza dai canali del sodio. Nel caso della saxitossina possono essere utili strategie per ridurre l'assorbimento intestinale (carbone attivato e lavanda gastrica). Per ciò che riguarda la microcistina-LR sono attualmente allo studio delle strategie volte ad impedire l'ingresso della tossina negli epatociti.

Conclusioni

I cianobatteri producono almeno tre classi di tossine con diverso profilo tossicologico: le neurotossine (anatoxina-a, anatoxina-a(S), saxitossina e derivati), le epatotossine (microcistine e nodularine) e le endotossine. Sia le cellule in toto che le tossine sono responsabili di tossicità acuta negli animali e nell'uomo, colpendo selettivamente diversi organi e/o apparati. Anche se le conseguenze di una intossicazione acuta nell'uomo sono in genere di modesta entità, una contaminazione accidentale per via parenterale può essere letale. Ulteriori studi devono inoltre essere intrapresi per studiare gli effetti dell'esposizione cronica a basse dosi di tossina (soprattutto epatotossine) sulla salute degli animali e dell'uomo. Dal momento che non esistono antidoti per le tossine prodotte dai cianobatteri, rimane di vitale importanza la prevenzione, attraverso il monitoraggio dei livelli di batteri e/o tossine nelle acque.

Bibliografia

1. CARMICHAEL, W.W. The toxins of cyanobacteria. *Sci. Am.* 1994, 270: 78-86.
2. SPOERKE, D.G. and RUMACK, B.H. Blue-green algae poisoning. *J. Emerg. Med.* 1985, 2: 353-355.
3. TURNER, P.C., GAMMIE, A.J., HOLLINRAKE, K. and CODD, G.A. Pneumonia associated with contact with cyanobacteria. *BMJ* 1990, 300: 1440-1441.
4. HUNTER, P.R. Cyanobacteria and human health. *J. Med. Microbiol.* 1992, 36: 301-302.
5. WONNACOTT, S., JACKMANN, K., SWANSON, H., RAPOPORT, H. and ALBUQUERQUE, E.X.. Nicotinic pharmacology of anatoxin analogs. II side chain structure-activity relationship at neuronal nicotinic ligand binding sites. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1991, 259: 387-391.
6. GOTTI, C., FORNASARI, D. and CLEMENTI, F. Human neuronal nicotinic receptors. *Progr. Neurobiol.* 1997, 53: 199-237.
7. FAWELL, J.K., MITCHELL, R.E., EVERETT, D.J. and HILL, R.E. The toxicity of cyanobacterial toxins in the mouse: I Microcystin-LR. *Hum. Exp. Toxicol.* 1999, 18: 162-167.

8. CARMICHAEL, W.W., BIGGS, D.F. and GORHAM, P.R. Toxicology and pharmacological action of *Anabaena flos-aquae* toxin. *Science* 1975, 187: 542-544.
9. MAHMOOD, N.A. and CARMICHAEL, W.W. The pharmacology of anatoxin-a(S), a neurotoxin produced by the freshwater cyanobacterium *Anabaena flos-aquae* NRC 525-17. *Toxicon* 1986, 24: 425-434.
10. ASTRACHAN, N.B., ARCHER, B.G. AND HILBELINK, D.R. Evaluation of the subacute toxicity and teratogenicity of anatoxin-a. *Toxicon* 1980, 18: 684-688.
11. FAWELL, J.K., MITCHELL, R.E., HILL, R.E. and EVERETT, D.J. The toxicity of cyanobacterial toxins in the mouse: II Anatoxin-a. *Hum. Exp. Toxicol.* 1999, 18: 168-173.
12. PILOTTO, L.S., DOUGLAS, R.M., BURCH, M.D., CAMERON, S., BEERS, M., ROUCH, G.J., ROBINSON, P., KIRK, M., COWIE, C.T., HARDIMAN, S., MOORE, C. and ATTEWELL, R.G. Health effects of exposure to cyanobacteria (blue-green algae) during recreational water-related activities. *Aust. N. Z. J. Public Health* 1997, 21: 562-566.
13. EL SAADI, O., ESTERMAN, A.J., CAMERON, S. and RODER, D.M. Murray River water, raised cyanobacterial cell counts, and gastrointestinal and dermatological symptoms. *Med. J. Aus.* 1995, 162: 122-125.
14. FALCONER, I.R., BERESFORD, A.M., RUNNEGAR, T.C. Evidence of liver damage by toxin from a bloom of the blue-green algae *Microcystis aeruginosa*. *Med. J. Aus.* 1983, 1: 511-514.
15. JOCHIMSEN, E.M., CARMICHAEL, W.W., AN, J., CARDO, D.M., COOKSON, S.T., HOLMES, C.E.M., DE ANTUNES, B., DE MELO FILHO, D.A., LYRA, T., BARRETO, V., AZEVEDO, S.M.F.O. and JARVIS, W.R. Liver failure and death after exposure to microcystins at a hemodialysis center in Brazil. *N. Eng. J. Med.* 1998, 338: 873-878.

VALUTAZIONE DEL RISCHIO SANITARIO ASSOCIATO ALLE FIORITURE DI CIANOBATTERI

Paola Ade, Enzo Funari

Laboratorio di Igiene Ambientale, Istituto Superiore di Sanità, Roma

Introduzione

I cianobatteri producono diverse categorie di tossine che sono classificate, a seconda degli effetti che causano, in: epatotossine, neurotossine e endotossine lipopolisaccaridiche –LPS endotossine [1].

Le epatotossine vengono prodotte da varie specie, ma non da tutti i ceppi, dei generi *Microcystis*, *Anabaena*, *Oscillatoria*, *Nodularia*, *Nostoc*, *Cylindrospermopsis* e *Umezakia*. Le epatotossine comprendono le microcistine, la cilindrospermopsina e la nodularina. Gran parte delle epatotossine (in tutti i casi eptapeptidi ciclici) sono tuttavia costituite da microcistine. Le microcistine vengono rilevate in gran parte nelle specie di *Microcystis*, che formano frequentemente schiume superficiali e in ceppi di alcune specie di *Anabaena*, che pure formano schiume. Sono noti più di 50 congeneri di microcistine e molti di questi possono venire prodotti durante una fioritura. Le microcistine si differenziano tra loro per lipofilità e polarità, che ne influenzano la tossicità.

I cianobatteri producono anche alcaloidi citotossici (ad esempio, quelli prodotti dalla specie *Cylindrospermopsis raciborskii*, che è presente in aree tropicali). L'esposizione a queste sostanze è stata associata a varie patologie umane (gastroenteriti e disfunzioni renali).

Molto probabilmente le cianotossine note rappresentano soltanto una parte di quelle esistenti, non ancora identificate.

Produzione di cianotossine

In condizioni adeguate, i cianobatteri possono riprodursi abbastanza rapidamente e formare così fioriture. I tempi di replicazione variano tra le diverse specie e all'interno di esse e dipendono da fattori ambientali quali temperatura, luce e disponibilità di nutrienti. Il tempo medio di duplicazione per molte specie è di 21 ore-14.7 giorni. In condizioni ottimali, la fioritura si forma in circa 2 giorni, quindi persiste per circa 5-7 giorni [2].

Nel 50-75% dei casi, le fioriture di cianobatteri risultano tossiche, spesso con più tossine presenti contemporaneamente [3]. La stessa specie di cianobatteri può tuttavia essere associata a fioriture tossiche e non tossiche. La tossicità complessiva di una

fioritura può essere incerta perché nel corso della fioritura stessa si possono verificare variazioni temporali e spaziali della concentrazione delle tossine.

In uno studio di oltre due anni su sei specie di *Microcystis* in acque superficiali è stato mostrato che le tossine erano non determinabili o presenti a basse concentrazioni durante l'inverno mentre raggiungevano concentrazioni più elevate in estate [4]. I fattori che contribuiscono alla produzione di tossine nei cianobatteri sono scarsamente conosciuti [2].

La produzione e l'accumulo di tossine sono correlate alla crescita, la loro produzione tende infatti ad aumentare durante la fase di crescita esponenziale e diminuisce gradualmente durante la fase stazionaria [5].

Condizioni di stress ambientale possono stimolare una maggior produzione di tossine da parte dei ceppi tossici. Basse intensità di luce o diminuzione nel periodo di esposizione alle radiazioni luminose sono in grado di aumentare la produzione di tossine, che varia con lo stato fisiologico della cellula in maniera ancora non molto chiara, da parte di *Leptolyngbya* sp. [6], di *Lyngbya wollei* [7] e di *Oscillatoria agardhii* [8]. Inoltre, è stato generalmente riconosciuto come in molti ceppi una maggior tossicità sia correlata a squilibri nella disponibilità di nutrienti (soprattutto il fosforo) rispetto al rapporto ottimale N/P. Nonostante le basi genetiche e le vie biochimiche che portano alla produzione delle tossine siano considerate molto complesse (si assume che la maggior parte di esse siano metaboliti secondari) e non siano ancora state spiegate, sembra dunque che i nutrienti abbiano una significativa influenza nell'espressione individuale di tossine o di loro derivati.

La produzione di tossine varia fortemente tra diversi ceppi della stessa specie. In alcuni studi è stato anche dimostrato che la capacità di produrre tossine può variare nel tempo e nello spazio in un dato sito o all'interno della fioritura stessa.

Destino ambientale delle cianotossine

Dai pochi studi finora disponibili risulta che le neurotossine studiate sono relativamente labili e in condizioni naturali tendono a decomporsi rapidamente per formare prodotti non tossici. E' stata riportata per l'anatossina-a in condizioni di intensa luminosità un'emivita di 1-2 ore [9]. La saxitossina e la neosaxitossina sono stabili in soluzioni acide a pH 2-4 ma diventano più labili con l'aumentare del pH [10].

Le microcistine sono state ampiamente studiate. Sono tossine intracellulari e vengono rilasciate in acqua per senescenza, morte cellulare, a seguito dei processi di trattamento delle acque con agenti ossidanti o con alghicidi [11, 12]. Una volta nell'acqua, le microcistine possono persistere per periodi relativamente lunghi prima di venire rimosse per biodegradazione o fotodegradazione [13, 14]. E' stato riportato che le microcistine possono persistere nelle schiume secche fino a 6 mesi [15]. In due studi sulle microcistine, sono stati riportati tempi di persistenza in acqua rispettivamente di 21 giorni e di 2-3 mesi [2, 12]. La microcistina -LR aggiunta a diverse acque superficiali ha mostrato tempi persistenza da 3 giorni a 3 settimane; una volta iniziata, la degradazione procede molto rapidamente e oltre il 95% di essa si verifica entro 3-4

giorni [16]. La velocità di degradazione delle microcistine può essere aumentata se il corpo idrico è stato precedentemente esposto alle microcistine [16].

Bioaccumulo delle cianotossine

I pochi studi condotti in quest'area sembrano indicare che il problema del bioaccumulo delle cianotossine nella catena alimentare può essere significativo per la salute umana e per gli ecosistemi naturali [1].

Infatti, è stato osservato che le microcistine possono accumulare in molluschi bivalvi e in pesci di acque dolci [17-19].

Il mitilo di acqua dolce *Anadonta cygnea* accumula rapidamente le microcistine da *Oscillatoria*; dopo 15 giorni di esposizione a 40-60 µg/l di queste tossine sono state rilevate nei tessuti di questo mollusco concentrazioni di 70 µg/g di peso secco [17].

E' stato anche riportato che le vongole di acqua dolce possono bioconcentrare la microcistina-LR a livelli misurabili in condizioni nelle quali questa non è invece rilevabile nei campioni d'acqua del corpo idrico [18].

Le microcistine-LR, RR e YR accumulano nello zooplancton a livelli relativamente alti, di 75-1387 µg/g peso secco [13].

Le microcistine sono state determinate in mitili di acque costiere [20], nel fegato di salmoni con severi danni epatici [21], nel fitoplancton, nei gasteropodi, nei copepodi e nelle larve di granchi [21, 22].

In conclusione, questi pochi dati mostrano che le microcistine possono bioaccumulare lungo la catena alimentare. E' necessario che questo aspetto venga approfondito con ulteriori studi.

Livelli di cianotossine nei corpi idrici

La conoscenza delle concentrazioni di cianotossine nei corpi idrici interessati da fioriture di cianobatteri è particolarmente importante per valutare il rischio sanitario. Tuttavia, sono pochissimi gli studi finora condotti.

Nei corpi idrici, le popolazioni di cianobatteri nelle prime fasi di fioritura liberano basse quantità di tossine (range 0.1-10 µg l⁻¹). Le concentrazioni di tossine intracellulari sono infatti diversi ordini di grandezza superiori rispetto a quelle delle tossine disciolte nell'acqua. In genere, le tossine una volta liberate dalle cellule sono diluite rapidamente dalla massa d'acqua. La concentrazione delle tossine disciolte può essere molto più alta nelle fioriture in decadimento, a seguito della lisi cellulare.

In generale, le più alte concentrazioni di tossine nell'acqua si ritrovano in estate e all'inizio dell'autunno [1]. Tra le cianotossine, soltanto le microcistine vengono determinate estesamente in tutto il mondo; la presenza di cilindrospermopsina è riportata in aumento in Australia e recentemente è stata rilevata nello Sri Lanka e probabilmente è presente in altre regioni tropicali e temperate; le neurotossine sono state

determinate in corpi idrici in Danimarca e Australia; sono stati pubblicati pochi lavori sulla presenza nei corpi idrici di altre cianotossine.

Le microcistine sono state ritrovate in molti corpi idrici superficiali e anche in acque sotterranee poco profonde [1]. Le concentrazioni delle microcistine disciolte in acqua oscillano da valori in traccia fino ad un massimo di 55 µg/l [1, 23].

La cilindrospermopsina è stata determinata in Australia a livelli da 0,2 a 10,1 µg/l [1].

Per le anatoxine e le saxitossine sono state riportate soltanto le concentrazioni espresse come contenuto cellulare e non come tossine disciolte in acqua.

In uno studio è stato dimostrato che a seguito del trattamento di una fioritura algale con algicidi la concentrazione in acqua delle tossine rilasciate da *M.aeruginosa* raggiungeva valori di 210-310 volte superiori a quelli rilevati prima del trattamento [12].

Secondo diversi studi pilota e di laboratorio, i trattamenti convenzionali delle acque grezze (coagulazione/filtrazione, filtrazione su sabbia, clorazione) sono in grado di rimuovere soltanto basse percentuali di tossine disciolte in acqua (11-18%) [24, 25].

L'ozono, il carbone attivo e soprattutto quello granulare sono molto efficaci nella rimozione delle cianotossine (99-100%) [25-27].

Tuttavia, nonostante questa elevata efficacia, in alcuni casi le cianotossine vengono comunque rilevate nelle acque trattate; inoltre rimane da valutare l'importanza da un punto di vista tossicologico dei metaboliti che si formano a seguito in particolare dei trattamenti di disinfezione [1].

Casi di avvelenamento di animali

Casi di avvelenamento di animali selvatici e domestici. - Il primo caso di intossicazione letale di animali associato a fioriture di cianobatteri è stato riportato nel secolo scorso; coinvolse numerosi animali d'allevamento che avevano bevuto schiume prodotte da *Nodularia spumigena* in un lago australiano [28]. Da allora, casi di avvelenamento di animali sono stati riportati nelle Americhe, in Europa, in Australia e in Africa [29].

Nella maggior parte dei casi, si tratta di intossicazioni epatiche dovute a specie appartenenti principalmente ai generi *Microcystis*, *Nodularia* e *Oscillatoria*. In altri casi, la principale causa di morte è stata associata a neurotossicità acuta con blocco respiratorio; i cianobatteri responsabili appartengono ai generi *Anabaena*, *Aphanizomenon* e *Oscillatoria*.

Gli animali domestici più frequentemente soggetti a intossicazioni letali da cianotossine sono: bovini, pecore, maiali, cani, gatti, oche, anatre, tacchini e polli. Tra gli animali selvatici, sono stati riportati casi di avvelenamenti mortali in api, pesci, tartarughe, serpenti, anfibi, uccelli acquatici, pipistrelli, roditori, zebre e rinoceronti [29].

La suscettibilità alle cianotossine varia notevolmente da specie a specie. Per esempio, mucche, maiali e cani muoiono in seguito all'ingestione di quantità relativamente piccole di cianobatteri epatotossici [30], i roditori sono invece molto più resistenti [31]; tra gli uccelli, il fagiano è da due a quattro volte più resistente del tacchino all'azione tossica dell'anatossina-a.

I pesci sono meno sensibili alle cianotossine di quanto lo siano i mammiferi e gli uccelli. Tuttavia, sono stati riportati episodi di morie di pesci a seguito di fioriture di cianobatteri [32] [33], anche se non risulta sempre chiara l'associazione tra queste morie e la presenza di cianotossine. Infatti, molte morie di pesci durante le fioriture di cianobatteri sono state attribuite piuttosto alle condizioni di ipossia successive alle fioriture o ai cambiamenti di viscosità dell'acqua [34]. La sensibilità di alcune specie di pesci, tra cui la trota [35], è stata comunque dimostrata in laboratorio in seguito a somministrazione intraperitoneale.

Casi di intossicazione nell'uomo

Sono noti molti casi di intossicazione anche molto grave nell'uomo attribuiti all'esposizione alle cianotossine. L'episodio più grave è stato osservato in Brasile, dove sono deceduti 56 pazienti dei 130 sottoposti a dialisi con acqua risultata poi contaminata da microcistine [36]. L'uso potabile di acqua contaminata da cianotossine è stata associata a varie forme di patologie nell'uomo. Particolarmente noto è l'episodio verificatosi in Australia dovuto al consumo di acqua proveniente da un approvvigionamento idrico interessato da una fioritura di cianobatteri. A distanza di una settimana 140 persone, in gran parte bambini, furono affette da forme severe di malattia, caratterizzate da vomito, epatomegalia e disfunzioni renali [37].

In Rhodesia, negli anni 1960-65, le gastroenteriti acute osservate stagionalmente nei bambini sono state attribuite a fioriture annuali di *Microcystis* nel lago le cui acque venivano utilizzate per scopo potabile [38]. Possibili danni epatici, evidenziati da aumenti significativi di gamma glutamil transferasi, sono stati associati al consumo di acqua potabile ricavata da approvvigionamenti idrici interessati da fioriture di *Microcystis* [39].

Sono stati riportati 26 casi di malattie cutanee e sintomi multipli sistemici associati all'esposizione, anche per l'uso potabile, ad acqua di origine superficiale e piovana che, conservata in contenitori aperti, era risultata interessata da una fioritura di *Anabaena* [40]. In un'indagine epidemiologica effettuata in Cina, è stata trovata una stretta correlazione tra incidenza di tumori epatici primari e il consumo di acqua potabile di origine superficiale interessata da fioriture di *Microcystis* [41]. In questo studio furono rilevate concentrazioni di microcistine nell'acqua di 0,058-0,460 µg/l. Secondo gli autori dello studio, l'esposizione simultanea alle microcistine insieme ad altri cancerogeni, come l'aflatossina B1, rilevata negli alimenti, potrebbe essere stata la causa delle alte incidenze osservate di tumori epatici primari.

Anche l'attività ricreativa in corpi idrici interessati da fioriture di cianobatteri è stata associata a patologie nell'uomo. E' stato riportato un episodio nel quale 13 persone

hanno contratto una forma di patologia (caratterizzata da emicrania, nausea, dolori muscolari e diarrea), dopo aver nuotato in un lago interessato da una fioritura di cianobatteri [42].

In Inghilterra dieci soldati su venti che avevano nuotato o svolto attività di canottaggio in un corpo idrico interessato da una forte fioritura di *Microcystis* contrassero varie forme di malattia; due svilupparono gravi forme di polmonite attribuite all'inalazione di microcistine e necessitarono di intense terapie [43]. Da uno studio prospettico condotto in Australia su 852 persone dopo 2-7 giorni dall'esposizione, risultarono alte incidenze di diarrea, vomito, sintomi influenzali, febbre, ulcerazioni della bocca, irritazioni di occhi e orecchi [44].

Nonostante le reazioni allergiche e le irritazioni cutanee o delle mucose associate ai cianobatteri siano ritenute relativamente comuni, sono tuttavia rari gli studi disponibili al riguardo [45]. È probabile che le sostanze che provocano reazioni allergiche siano diverse dalle cianotossine sopra descritte. Questi aspetti sono stati affrontati in modo approfondito in Ransom et al. [2].

Tossicocinesi

Tra le cianotossine, le più studiate dal punto di vista tossicocinetico sono le microcistine, in particolare la microcistina-LR. Le varie microcistine hanno differenti polarità che ne caratterizzano l'assorbimento e la distribuzione. La microcistina-LR essendo fortemente idrosolubile non attraversa facilmente le membrane cellulari e non entra nella maggior parte dei tessuti [46]. Attraversa l'ileo grazie al sistema di trasporto degli anioni organici, raggiungendo il fegato [47]. Altre microcistine, più idrofobiche, attraversano le membrane cellulari con altri meccanismi tra cui la diffusione passiva. La microcistina-LR viene quindi difficilmente assorbita attraverso la cute ed essendo non volatile, è anche improbabile il suo assorbimento per via polmonare, a meno che non sia presente nell'aria sotto forma di aerosol [48]. La più importante via di esposizione è quindi quella orale in seguito all'ingestione di acqua. Tuttavia non sono stati condotti studi di tossicocinesi in seguito a somministrazione orale e tutti i dati disponibili sono stati ottenuti a seguito di somministrazione intraperitoneale o endovenosa.

In gran parte degli esperimenti sugli animali, il fegato è risultato il principale organo bersaglio della microcistina-LR, accumulando il 50-70% della dose [1]. Altri organi che possono accumulare quantità significative della tossina sono l'intestino (7-10%) e i reni (1-5%) [14].

Le microcistine sono resistenti all'idrolisi enzimatica e di conseguenza alla degradazione nei tessuti [49]; la loro escrezione con la bile avviene come tossine tal quali o a seguito della loro coniugazione [50]. Il fegato svolge un ruolo fondamentale nella detossificazione di queste tossine [51]. I prodotti di detossificazione sono stati rilevati nelle urine e nelle feci. Sono stati identificati tre prodotti metabolici derivati da reazioni di coniugazione rispettivamente con il glutatione, con la cisteina e con il diene ADDA ossidato [52].

A seguito di studi su topi è risultata una eliminazione plasmatica biesponenziale della microcistina-LR, con emivite di 0.8 e 6.9 minuti [53]

La microcistina-LR viene escreta rapidamente, il 75% dell'escrezione totale avviene entro 12 ore. Il restante 24% viene escreto dopo 6 giorni, di cui il 9% con le urine e il 15% più lentamente con le feci [54].

Meccanismi di azione e tossicologia delle cianotossine

Dai cianobatteri sono state isolate ed identificate le neurotossine che bloccano la neurotrasmissione (anatosina-a, anatosina-a(S) e saxitossina), le cilindrospermopsine, che inibiscono la sintesi proteica e le microcistine, che inibiscono le fosfatasi proteiche [55]. Le neurotossine, con differenti meccanismi d'azione, possono essere letali causando soffocamento. La saxitossina e l'anatosina-a(S) sono tra le più potenti sostanze neurotossiche.

La cilindrospermopsina causa epatoenterite [56]. Il cianobatterio che la produce, *Cylindrospermopsis raciborskii*, è considerato una specie tropicale e subtropicale, ma recentemente è stato osservato anche in zone temperate [57, 58].

Le microcistine sono le cianotossine più diffuse e vengono prodotte dalla maggior parte delle specie di *Microcystis* e da alcune specie di *Anabaena*, da *Planktothrix agardhii* e *P. rubescens* [59]. Sono delle potenti epatotossine [60], come precedentemente menzionato, la loro tossicità è cumulativa [61] e possono agire come promotori tumorali [62].

Sono disponibili i seguenti risultati relativi a studi di tossicologia sperimentale sulle cianotossine.

Neurotossine. - L'anatosina-a (S) è un organofosfato prodotto da *Anabaena flos-aquae* e *Anabaena lemmermannii*. Blocca l'attività acetilcolinesterasica in un modo analogo a quello degli insetticidi organofosfati. È stata riportata una DL50 a seguito di somministrazione intraperitoneale (ip) nel topo di 20 µg/kg peso corporeo (pc) [63, 64]. Non sono disponibili dati di tossicità a seguito di somministrazione orale.

Per l'anatosina-a è stata riportata una DL50 per ip nel topo di 375 µg/kg pc e una DL50 per via orale superiore a 5.000 µg/kg pc [65, 66].

In uno studio su ratti ai quali la tossina è stata somministrata con l'acqua potabile per 54 giorni alle dosi di 0,51 e 5,1 ppm (equivalenti rispettivamente a 51 e 510 µg/kg pc/giorno) non sono stati osservati effetti tossici [67].

Da due studi di tossicità subacuta condotti su topi, a seguito di somministrazione di anatosina-a per via orale, sono stati individuati rispettivamente NOEL di 1.500 e 100 µg/kg pc/giorno [59]. Lo studio dal quale è stato individuato il NOEL di 100 µg/kg pc/giorno mostra considerevoli limiti e non sembra adeguato per derivare una TDI. In uno studio di tossicità riproduttiva e teratogenesi, l'anatosina-a somministrata a topi alla massima dose tollerata di 2.460 µg/kg pc/giorno non ha dato luogo ad effetti sulle

madri e sulla prole, ad eccezione di una leggera diminuzione del peso corporeo rispetto ai controlli [65].

Saxitossine. - La produzione di saxitossina e di suoi analoghi è stata riportata in acque dolci australiane da parte di *Anabaena circinalis* e negli Stati Uniti da parte di *Aphanizomenon flos-aquae* [63, 68, 69] e *Lyngbya wollei* [55] in Europa da parte di *Aphanizomenon flos-aquae* [70] e *Leptolyngbya* sp. [6]. Il gruppo delle saxitossine è responsabile della sindrome di avvelenamento chiamata nell'uomo Paralytic Shellfish Poisoning (PSP), che in casi estremi può condurre alla morte [71]. E' una tossina di elevatissima tossicità acuta, facilmente bioaccumulabile. Recenti studi hanno dimostrato che la saxitossina a concentrazioni superiori a 10 µg/l ha attività teratogena su larve di pesce e anfibio [72], provoca ritardo nella crescita dell'embrione, malformazioni e morte a concentrazioni dell'ordine dei 500 µg/l. Fino ad ora non è mai stata dimostrata la capacità di promozione tumorale da parte della saxitossina, ma molte ricerche sono in corso di svolgimento al fine di chiarirne il profilo tossicologico.

Microcistine. - La microcistina-LR e' una tossina con un'elevatissima tossicità acuta. E' stata riportata una DL50 ip di 25-150 µg/kg pc nel topo e una DL50 per via orale di 5.000 µg/kg pc nel topo e superiore nel ratto [73]. Le DL50 di molte microcistine che sono presenti comunemente nelle acque (microcistine-LA,-YR e YM) sono simili a quella della microcistina-LR. La DL50 della microcistina-RR è invece circa 10 volte più alta [74, 75].

In uno studio di 13 settimane su topi ai quali la microcistina-LR è stata somministrata per via orale, per gavaggio, è stato individuato un *no observed adverse effect level* (NOAEL) di 40 µg/kg pc/ giorno [73].

In uno studio di 44 giorni su maiali, ai quali è stato somministrato con l'acqua potabile un estratto da *M. aeruginosa*, è stato osservato un *low observed adverse effect level* (LOAEL) di 280 µg/kg pc/giorno per le microcistine presenti [70]. L'estratto conteneva una miscela di microcistine.

In uno studio di un anno, sono stati somministrati estratti di *M. aeruginosa* a topi attraverso l'acqua potabile, corrispondenti a cinque dosi comprese tra 750-12000 µg/kg/giorno di equivalenti di microcistina-YM. Da questo studio non è stato individuato chiaramente un NOAEL. Alla dose più alta sono stati osservati aumentata mortalità e aumento dell'incidenza di broncopolmoniti ed epatiti croniche [60]. Non sono stati osservati tumori epatici; gli autori dello studio hanno tuttavia osservato alcune evidenze di promozione tumorale.

In uno studio di tossicità riproduttiva e dello sviluppo, a seguito di somministrazione di dosi comprese tra 200 e 2000 µg/kg pc/ giorno non sono state osservate evidenze di mortalità degli embrioni, teratogenicità o ritardo della crescita dell'embrione a tutte le dosi. Da questo studio è stato individuato un NOAEL di 600 µg/kg pc giorno [73]. Test di mutagenesi condotti su *Salmonella* e *Bacillus subtilis* su tossine purificate derivate da *Microcystis* hanno dato esito negativo; i risultati di uno studio su linfociti umani suggeriscono invece che queste tossine possono essere clastogene [76].

Sono stati condotti due studi di cancerogenesi dai quali risulta, nonostante qualche limitazione metodologica, una qualche evidenza di promozione tumorale da parte della microcistina-LR [59,77]. D'altra parte, la microcistina-LR inibisce le fosfatasi proteiche di tipo 1 e 2 mostrando un'analogia con l'acido ocadaico, che è una tossina algale nota come inibitore delle fosfatasi proteiche e come promotore tumorale.

E' stato suggerito che il legame delle microcistine e della nodularina alle fosfatasi proteiche PP1 e 2A danno luogo all'iperfosforilazione delle proteine cellulari, che pertanto cesserebbero di svolgere le loro normali funzioni [78, 79]. L'iperfosforilazione influenza il citoscheletro delle cellule determinando una transizione ad uno stato apparentemente mitotico [80]. Di conseguenza lo sviluppo tumorale si verifica perché l'aumentata mitosi dà luogo ad una crescita accelerata dei tessuti [1]. Inoltre, le microcistine potrebbero dar luogo alla crescita di tumori poiché causano la perdita del contatto cellula-cellula e possono ridurre la normale inibizione da contatto della replicazione cellulare [80].

E' stato dimostrato che la tossicità delle microcistine è cumulativa. In un esperimento è stato osservato che una determinata singola dose di microcistina somministrata per via orale non causava alcun incremento del peso del fegato. La stessa dose somministrata per una settimana causava invece un aumento del peso del fegato dell'84%, producendo lo stesso effetto di una singola dose 16 volte superiore [60].

Nodularina. - Gli effetti fisiologici della nodularina sugli animali sono simili a quelli delle microcistine [1]. Per esempio, la nodularina può causare danni epatici e promozione tumorale [81]. Tuttavia, diversamente dalle microcistine, la nodularina può agire anche come iniziatore tumorale [82]. Come nel caso delle microcistine, i dati disponibili fanno ritenere che anche la nodularina sia un promotore tumorale e tale ipotesi è stata confermata da studi *in vivo* [59, 77].

Cilindrospermopsina. - Il principale organo bersaglio della Cilindrospermopsina è il fegato ma la tossina ha effetti anche su altri organi quali il timo, i reni e il cuore; inibisce la sintesi proteica [83].

Sono disponibili dati di tossicità acuta e subacuta a seguito di somministrazione ip e per via orale. In uno studio su topi, ai quali è stata somministrata questa tossina per ip ad una dose di 0.02 µg/kg pc/ giorno per 12 giorni non sono stati osservati effetti tossici [1].

LPS endotossine. - L'esposizione a queste tossine può dar luogo a gastroenteriti, irritazioni cutanee e degli occhi, reazioni allergiche e asma [84]. Tuttavia questi effetti non sono mai stati dimostrati in animali di laboratorio [1].

Valutazione del rischio per l'uomo

Acque potabili. - Per la microcistina-LR, l'OMS ha considerato lo studio di 13 settimane sul topo, precedentemente menzionato, adeguato per ricavare un valore di

linea guida. Al NOAEL di 40 $\mu\text{g}/\text{kg}$ pc giorno, è stato applicato pertanto un fattore d'incertezza di 1000 che ha permesso di ottenere una TDI per l'uomo di 0,04 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ pc giorno (100 per la variabilità intra e interspecifica e 10 per la mancanza di dati adeguati di tossicità cronica e di cancerogenicità). È stata assegnata una percentuale di assunzione con l'acqua potabile dell'80% rispetto all'assunzione totale, in considerazione del fatto che le assunzioni da altre fonti di esposizione dovrebbero essere molto contenute. Considerando un consumo per uso potabile di 2 litri di acqua/giorno per una persona di 60 kg di peso, si può derivare un valore di linea guida di 1 $\mu\text{g}/\text{l}$ (valore arrotondato). Questo valore è provvisorio, in quanto gli studi disponibili sono limitati [4].

Ovviamente, la microcistina-LR non è presente da sola nelle fioriture dei cianobatteri, anzi è spesso presente insieme ad altre microcistine in percentuali non adeguatamente definite. Pertanto, il valore di linea guida dell'OMS dovrebbe essere considerato soltanto l'inizio di un'attività per una valutazione adeguata del rischio sanitario associato all'esposizione a lungo termine alle microcistine.

Attualmente, l'approccio che sembra di poter raccomandare per la valutazione del rischio associato alla presenza simultanea di più microcistine è quello di considerare queste tossine dello stesso significato e valore tossicologico della microcistina-LR [77]. In sostanza, la somma delle concentrazioni delle microcistine presenti simultaneamente non dovrebbe superare il valore di linea guida della microcistina-LR [85]. Ovviamente, l'analisi chimica delle singole microcistine è un'operazione assai difficile. La concentrazione delle microcistine può allora essere dedotta dal test sul topo, dopo averlo calibrato usando gli standard di microcistina-LR, disponibili in commercio. In questo modo la tossicità delle microcistine sarà verosimilmente sopravvalutata, poiché la microcistina-LR è una delle microcistine più potenti, almeno per quanto riguarda gli effetti acuti. Un superamento contenuto del valore della linea guida di 1 $\mu\text{g}/\text{l}$ per un periodo limitato non comporta necessariamente un rischio significativo per la popolazione esposta.

Per la cilindrospermopsina sono state calcolate le seguenti linee guida per esposizioni a breve termine, basate sul NOAEL di 0,02 mg/Kg pc/giorno e applicando un fattore di incertezza di 1000:

per adulti: 0,48 $\mu\text{g}/\text{l}$; per bambini 0,16 $\mu\text{g}/\text{l}$; per infanti 0,11 $\mu\text{g}/\text{l}$ [1].

Per le saxitossine, il valore di riferimento di 80 μg equivalenti di saxitossina per 100 g di molluschi, usato nell'America Settentrionale [86], potrebbe essere usato in prima istanza anche per le acque potabili.

Per l'anatossina-a, gli studi disponibili di tossicità subacuta mostrano alcuni limiti, tali che non risulta siano stati utilizzati per derivare una TDI. Nonostante ciò, allo scopo di individuare in modo orientativo le soglie di rischio si ritiene possibile utilizzare la procedura dell'US-EPA per la derivazione degli Health Advisories per un periodo di esposizione di 10 giorni allo scopo di proteggere la salute dei bambini. Gli Health Advisories vengono derivati con una procedura del tutto simile a quella con la quale

l'OMS definisce i valori di linea guida per l'acqua potabile [87]. Il 10 giorni H. A. viene calcolato come segue:

10 days Health Advisory = NOAEL X 10 kg pc: 100 x 1 l/giorno, dove 10 kg pc è il peso corporeo di un bambino di riferimento, 100 è il fattore di incertezza e 1l/g è il consumo di acqua potabile giornaliero attribuito al bambino di riferimento. Dal NOAEL di 100 µg/kg pc/ giorno, individuato negli studi sugli animali di laboratorio [67], risulterebbe un 10 days H.A. di circa 10 µg/l. Ovviamente questo risultato non può che essere considerato provvisorio, come primo orientamento, in attesa di ulteriori studi tossicologici.

Recentemente sono state calcolate le seguenti linee guida basate sullo stesso studio ma su un NOAEL di 0.51 mg/kg/giorno [1]. Applicando un fattore di incertezza di 1000, sono state calcolate le seguenti linee guida:

12 µg/l per una persona adulta; 4 µg/l per un bambino di 10 kg di peso corporeo e 2.7 µg/l per un infante di 5 kg di peso corporeo.

I dati di tossicità sperimentale disponibili per l'anatossina-a(S) non sono sufficienti per calcolare una TDI ed una linea guida per l'acqua potabile.

Acque di balneazione . - Chorus and Bartram [85] hanno proposto i seguenti tre livelli di sicurezza associati all'aumento della probabilità e dell'importanza degli effetti per la salute umana.

Sembra tuttavia opportuno rilevare che le endotossine LPS possono causare irritazioni degli occhi e della pelle nonché gastroenteriti [1].

Livello 1. Bassa probabilità e/o lievi effetti nocivi per la salute umana. - Per la protezione della salute umana da effetti irritativi od allergenici, viene proposto un livello di 20.000 cianobatteri/ ml (corrispondente a circa 10 µg/l di clorofilla *a* in condizioni di dominanza di cianobatteri), derivato da uno studio epidemiologico di Pilotto *et al.* [44]. In questo studio gli effetti sulla salute dei bagnanti, messi in relazione alla densità dei cianobatteri e alla durata dell'esposizione, interessarono meno del 30 % degli individui esposti. A queste densità, se i cianobatteri produttori di microcistine sono dominanti, ci si possono attendere 2 - 4 µg/l di microcistine fino a 10 µg/l, nei casi di fioriture altamente tossiche. Questi livelli sono vicini alla linea guida dell'OMS per la qualità dell'acqua potabile, di 1 µg/l di microcistina-LR [4] che si riferisce tuttavia ad un'esposizione a lungo termine. Queste situazioni si possono considerare pertanto a basso rischio.

Livello 2. Probabilità moderata di effetti nocivi per la salute umana. - A più alte concentrazioni di cianobatteri, la probabilità di sintomi irritativi aumenta. Inoltre, sempre facendo riferimento alla linea guida dell'OMS per la qualità dell'acqua potabile, è possibile sviluppare il seguente ragionamento. Si assume che i nuotatori involontariamente ingeriscano fino a 100 - 200 ml di acqua in un bagno, mentre i surfisti e coloro che praticano lo sci d'acqua probabilmente ingeriscono quantità maggiori.

Una densità di 100.000 cellule di cianobatteri per ml (equivalente all'incirca a 50

$\mu\text{g/l}$ di clorofilla *a* se i cianobatteri dominano) costituisce un livello di allerta moderato per le acque di ricreazione. A questa densità infatti, è possibile una concentrazione di microcistine di $20 \mu\text{g/l}$ (fino a $50 \mu\text{g/l}$), se la fioritura è dovuta a *Microcystis* e se possiede un contenuto medio di microcistina di $0,2 \text{ pg/cellula}$ o $0,4 \mu\text{g}/\mu\text{g}$ di clorofilla *a*. Questi livelli possono raddoppiare se è dominante *Planktothrix agardhii*. Questa concentrazione di tossina è equivalente a 20 volte il valore guida dell'OMS per la qualità dell'acqua potabile per la microcistina-LR. Corrisponderebbe ad una dose vicina alla TDI, per un adulto di 60 kg che nuotando ingerisca 100 ml di acqua (invece dei 2 litri di acqua potabile). Un bambino di 15 kg che ingerisce 250 ml di acqua giocando a lungo nell'acqua potrebbe invece essere esposto a 10 volte la TDI. A questa dose corrisponde un rischio significativo di danno epatico, che aumenta ulteriormente in casi di particolare suscettibilità (ad esempio, a causa dell'epatite B cronica).

Perciò, densità di cianobatteri tali da comportare concentrazioni di microcistine di $20 \mu\text{g/l}$ richiedono provvedimenti cautelativi.

Specie di cianobatteri che non formano schiume, come *Planktothrix agardhii*, possono raggiungere densità cellulari corrispondenti a $200 \mu\text{g/l}$ di clorofilla *a* o più in corpi d'acqua poco profondi. In tali situazioni la trasparenza al disco di Secchi sarà minore di 0,5 m. *Planktothrix agardhii* è caratterizzata da un alto contenuto cellulare di microcistine ($1 - 2 \mu\text{g} / \mu\text{g}$ di clorofilla *a*) e si possono avere perciò concentrazioni di tossina di 200 - 400 μg di microcistina/L senza formazione di schiume.

Un'ulteriore ragione di allarme alla concentrazione di 100.000 cellule per ml è associata alla potenzialità, a queste densità elevate, di formare schiume da parte di alcune specie (particolarmente *Microcystis* spp. e *Anabaena* spp.). Le schiume possono aumentare la concentrazione di tossine di un fattore 1.000 o anche più in poche ore, determinando rapidamente un passaggio da una situazione di rischio moderato a rischio elevato.

La formazione di schiume costituisce un problema particolare per il monitoraggio di routine. A causa della possibilità di formazione rapida di schiume, alla densità di 100.000 cellule/ml o $50 \mu\text{g/l}$ di clorofilla *a* è opportuno intensificare la sorveglianza e adottare misure preventive.

In questi casi si raccomanda di intervenire con campagne di informazione per educare il pubblico ad evitare il contatto con le schiume e di intensificare il programma di monitoraggio.

In alcuni casi, potrebbe essere opportuno vietare la balneazione.

Livello 3. Rischio elevato di effetti nocivi per la salute umana. - E' stato calcolato che un bambino giocando in schiume di *Microcystis* per un tempo prolungato ed ingerendone un volume significativo potrebbe riceverne una esposizione letale, sebbene non siano disponibili evidenze al riguardo. Sulla base della LD50 orale della microcistina-LR nei topi, di $5.0 - 11.6 \text{ mg/kg pc}$, un bambino di 10 kg che ingerisce 2 mg o meno di microcistina potrebbe subire un danno epatico. Questa dose è del tutto plausibile se si considera che sono state riportate nella letteratura scientifica concentrazioni di microcistine nelle schiume fino a 24 mg/l .

Bibliografia

1. DUY T.N., LAM, K.S., SHAW, G.R., CONELL D.C. Toxicology and risk assessment of freshwater cyanobacterial (blue-green algal) toxins in water. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 2000, 163: 113-186.
2. RESSOM, R., SOONG, F.S., FITZGERALD, J. Health Effects of Toxic Cyanobacteria (Blue-Green Algae). Australian National Health and Medical Research Council, Looking glass Press, 1994, 108 p.
3. AN, J., CARMICHAEL, W.W. Use of a colorimetric protein phosphatase inhibition assay and enzyme linked immuno sorbent assay for the study of microcystins and nodularins. *Toxicon* 1994; 32: 1495-507.
4. WHO. Guidelines for drinking-water quality. 2nd ed. Addendum to volume 2. Health Criteria and other supporting information. Geneva: World Health Organization, 1998, 283 p.
5. WATANABE, M.F., OISHI, S. Effects of environmental factors on toxicology of a cyanobacterium (*Microcystis aeruginosa*) under culture conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* 1985, 49(59): 1342-1344.
6. POMATI, F., SACCHI, S., ROSSETTI, C., GIOVANNARDI, S., ONODERA, H., OSHIMA, Y., AND NEILAN, B.A. The freshwater cyanobacterium *Planktothrix* sp. FP1: molecular identification and detection of paralytic shellfish poisoning toxins. *J. Phycol.* 2000, 36 (3): 40-49.
7. YIN, Q.Q., CARMICHAEL, W.W., EVANS, W.R. Factors influencing growth and toxin production by cultures of the freshwater cyanobacterium *Lyngbya wollei* Farlow ex Gomont. *J. Appl. Phycol.* 1997, 9:55-63.
8. SIVONEN, K. Effects of light, temperature, nitrate, orthophosphate, and bacteria on growth of and hepatotoxin production by *Oscillatoria agardhii* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 1990, 56: 2658-2666.
9. STEVENS, D.K., KRIEGER, R.I. Stability studies on the cyanobacterial nicotinic alkaloid anatoxin-a. *Toxicon* 1991, 29(2): 167-179.
10. JACKIM, E., GENTILE, J. Toxins of a blue-green alga: similarity to saxitoxins. *Science* 1968, 162: 915-916.
11. FALCONER, I.R. Measurement of toxins from blue-green algae in water and foodstuffs. In: Algal Toxins in Seafood and Drinking Water. I.A. Falconer (Ed.). London: Academic Press, 1993, p. 165-175.
12. JONES, G.J., ORR, P.T. Release and degradation of microcystin following algicide treatment of a *Microcystis aeruginosa* bloom in a recreational lake, as determined by HPLC and protein phosphatase inhibition assay. *Water Res.* 1994, 28(4):871-876.
13. WATANABE, M.F., KAYA, K., TAKAMURA, N. Fate of the toxic cyclic heptapeptides, the microcystins, from blooms of *Microcystis* (cyanobacteria) in a hypertrophic lake. *J. Phycol.* 1992, 28:761-767.

14. HRUDNEY, S.E., LAMBERT, T.W. KENEFICK, S.L. Health risk assessment of microcystins in drinking water supplies. In: *Toxic Cyanobacteria: a Global Perspective Symposium*, Adelaide, 28 March 1994. Australian Centre for Water Quality Research, Adelaide, SA, p. 7-16.
15. JONES, G.J., FALCONER, I.R., WILKINS, R.M. Persistence of cyclic peptide toxins in dried *Microcystis aeruginosa* crusts from Lake Mokoan, Australia. *Environ. Toxicol. Water Qual.* 1995, 10:19-24.
16. JONES, G.J. Biodegradation and removal of cyanobacterial toxins in natural waters. In: *proceedings of Sydney Water Board Blue-green algae Seminar*, Sydney 1990, p. 33-36.
17. ERIKSSON, J.E., MERILUOTO, J.A.O., LINDHOLM, T. Accumulation of a peptide toxin from the cyanobacterium *Oscillatoria agardhii* in the freshwater mussel *Anadonta cygnea*. *Hydrobiologia* 1989, 183: 211-216.
18. PREPAS, E.E., KOTAK, B.G., CAMPBELL, L.M., EVANS, J.C., HRUDNEY, S.E., HOLMES, C.F.B. Accumulation and elimination of cyanobacterial hepatotoxins by the freshwater clam *Anodonta grandis simpsoniana*, *Can. J. Fish Aquat. Sci.* 1997, 54: 41-46.
19. RABERGH, C.M.L., BYLUND, G., ERIKSSON, J.E. Histopathological effects of microcystin-LR, a cyclic peptide toxin from the cyanobacterium (blue-green alga) *Microcystis aeruginosa*, on common carp (*Cyprinus carpio* L.) *Aquat Toxicol* 1991, 20: 131-146.
20. CHEN, D.Z.X., BOLAND, M.P., SMILLIE, M.A., KLIX, H., PTAK, C., ANDERSEN, R.J., HOLMES, C.F.B. Identification of protein phosphatase inhibitor of the microcystin class in the marine environment. *Toxicon* 1993, 31: 1407-1414.
21. KOTAK, B.G., ZURAWELL, R.W., PREPAS, E.E., HOLMES, C.F.B. Microcystin-LR concentration in aquatic food web compartments from lakes of varying trophic status. *Can. J. Fish Aquat. Sci.* 1996, 53:1974-1985.
22. WILLIAM, D.E., KENT, M.L., ANDERSON, R.J., KLIX, H., HOLMES, C.F.B. Tissue distribution and clearance of tritium-labeled dihydromicrocystin-LR epimers administered to Atlantic salmon via intraperitoneal injection. *Toxicon* 1995, 33(2): 125-131.
23. YU, S.H. Blue-green algae and liver cancer, In: *primary Liver Cancer*, D.A. Steffensen, B.C. Nicholson (Eds.). London: Springer, p. 30-37, 1994
24. KEIJOLA, A.M., HIMBERG, K., ESALA, A.L., SIVONEN, K., HIISVIRTA, L. Removal of cyanobacterial toxins in water treatment processes: laboratory and pilot scale experiments. *Toxic Assess.* 1988, 3:643-656.
25. HIMBERG, K., KEIJOLA, A.M., HIISVIRTA, L., PYYSALO, H, SIVONEN, K. The effect of water treatment processes on the removal of hepatotoxins from *Microcystis* and *Oscillatoria* cyanobacteria: a laboratory study. *Water Res.* 1989, 23(8): 979-984.
26. DRIKAS, M. Control and/or removal of algal toxins. In: Steffens D.A., Nicholson B.C. (Eds), *toxic cyanobacteria, current status of research and management: International workshop*, 22-26 March 1994, Adelaide, SA, Proceedings Australian Centre for Water Treatment and Water Quality Research, Salisbury, SA.

27. FALCONER, I.R. Using activated carbon to remove toxicity from drinking water containing cyanobacterial blooms. *J. Am. Water Works Assoc.* 1989, 81(2): 102-105.
28. FRANCIS, G. Poisonous Australian lake. *Nature* 1978, 18:11-12
29. CARMICHAEL, W.W. *A status report on planktonic cyanobacteria (Blue-green algae) and their toxins.* Environmental Monitoring Systems Laboratory, Office of Research and Development, US Environmental Protection Agency, Cincinnati, Ohio, 1992 (EPA/600/R-92/079).
30. RUNNEGAR, M.T.C., FALCONER, I.R. The *in vivo* and *in vitro* biological effects of the peptide hepatotoxin from the blue-green alga *Microcystis aeruginosa*. *S. Afr. J. Sci.* 1982, 78:363-366
31. BEASLEY, V.R., DAHLEM, A.M., COOK, W.O., VALENTINE, W.M., LOVELL, R.A., HOSSER, S.B., SUZUKI, M. AND CARMICHAEL, W.W. Diagnostic and clinically important aspects of cyanobacterial (blue-green algae) toxicosis. *J. Vet. Diagn. Invest.* 1989, 1:359-365
32. OCHUMBA, P.B.O. Massive fish kills within the Nyaza gulf of Lake Victoria, Kenya. *Hydrobiologia* 1990, 208: 93-99.
33. SEVRIN-REYSSAC, J., PLETIKOSIC, M. Cyanobacteria in fish ponds. *Aquaculture* 1990, 88: 1-20.
34. JENKINSON, I.R. Increases in viscosity may kill fish in some blooms. In: *Red Tides. Biology, environmental science and toxicology.* Okaichi T., Anderson D.M. and Nemoto T. (Eds.). New York: Elsevier, 1989, p. 435-438.
35. PHILLIPS, M.J., ROBERTS, R.J. AND STEWART, J.A. Toxicity of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* to rainbow trout *Salmo gairdneri* Richardson. *J. Fish Dis.* 1985, 8:339-343
36. JOCHIMSEN E.M., CARMICHAEL W.W., AN J., CARDO D.M., COOKSON S.T., HOLMES C.E.M., ANTUNES M.B. DE C., FILHO DA DE MELO, LYRA TM, SPINELLI VT, AZEVEDO S.M.F.O. and JARVIS W.R. Liver failure and death after exposure to microcystins at a hemodialysis center in Brazil. *N. Engl. J. Med.* 1998, 338(13): 873-78.
37. BYTH S. Palm Island mystery disease. *Med. J. Australia* 1980, 2: 40-2.
38. ZILBERG L.L. Gastroenteritis in Salisbury European children – a five-year study. *Centr. Afr. J. Med.* 1966, 12: 164-68.
39. FALCONER I.R. Effects on human health of some toxic cyanobacteria (blue-green algae) in reservoirs, lakes and rivers. *Toxicity assessment* 1989, 4: 175-84.
40. EL SAADI O., CAMERON A.S. The occurrence and fate of blue-green algal toxins in freshwaters. London: Her Majesty's Stationery Office, 1993 (National Rivers Authority R. and D. Report 29).
41. UENO Y., NAGATA S., TSUTSUMI T., HASEGAWA A., WATANABE M.F., PARK H.D., CHEN, G.C., CHEN, G. and YU, S.Z. 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(Suppl.6): 1317-1321.
42. DILLENBERG, H.O., DEHNEL, M.K. Toxic waterbloom in Saskatchewan, 1959. *Can. Med. Assoc. J.* 1960, 83: 1151-1154.
43. TURNER, P.C., GAMMIE, A.J., HOLLINRAKE, K., CODD, G.A. Pneumonia associated with

- cyanobacteria. *Br. Med. J.* 1990, 300: 1440-1441.
44. PILOTTO, L.S., DOUGLAS, R.M., BURCH, M.D., CAMERON, S., BEERS, M., ROUCH, G.R., ROBINSON, P., KIRK, M., COWIE, C.T., HARDIMAN, S., MOORE, C., ATTWELL R.G. Health effects of exposure to cyanobacteria (blue-green algae) due to recreational water-related activities. *Aust. N. Zealand J. Public Health* 1997, 21: 562-566
 45. YOO, S., CARMICHAEL, W., HOEHN, R., HRUDNEY, S. Cyanobacterial (blue-green algal) toxins: A Resource Guide. AWWA Research Foundation 1995.
 46. ERIKSSON, J.E., GROENBERG, L., NYGARD, S., SLOTTE, J.P. AND MERILUOTO, J.A.O. Hepatocellular uptake of 3H-dihydromicrocystin-LR, a cyclic peptide toxin. *Biochim. Biophys. Acta* 1990, 1025: 60-66
 47. RUNNEGAR, M.T.C. GERDES, R.G., FALCONER, I.R. The uptake of the cyanobacterial hepatotoxin microcystin by isolated rat hepatocytes. *Toxicon* 1991, 29: 43-51.
 48. LAMBERT, T.W., HOLMES, C.F.B., HRUDNEY, S.E. Microcystin class of toxins: health effects and safety of drinking water supplies. *Environmental Review* 1994, 2:167-186
 49. RUNNEGAR, M.T.C., FALCONER, I.R. Isolation, characterization, and pathology of the toxins from the blue-green alga *Microcystis aeruginosa*. In: *The Water Environment: Algal toxins and Health*. W.W. Carmichael (Ed.), Plenum Press 1981, New York, p. 325-342.
 50. FALCONER, I.R., BUCKLEY, T.H, RUNNEGAR, M.T.C. Biological half-life, organ distribution and excretion of 125I-labelled toxic peptide from blue-green alga *Microcystis aeruginosa*. *Aust J. Biol. Sci.* 1986, 39:17-21.
 51. BROOKS, W.P. AND CODD, G.A. Distribution of *Microcystis aeruginosa* peptide toxin and interactions with hepatic microsomes in mice. *Pharmacol. Toxicol.* 1987, 60: 187-191
 52. KONDO, F., MATSUMOTO, H., YAMADA, S., ISHIKAWA, N., ITO, E., NAGATA, S., UENO, Y., SUZUKI, M. AND HARADA, K.I. Detection and identification of metabolites of microcystins formed in vivo in mouse and rat livers. *Chem. Res. Toxicol.* 1996, 9: 1355-1359.
 53. FALCONER, I.R. Mechanism of toxicity of cyclic peptide toxins from blue-green algal in water and foodstuffs. In: *algal Toxins in Seafood and Drinking Water* I.A. Falconer (Ed.). London: Academic Press 1993, p. 177-186.
 54. ROBINSON, N.A., PACE, J.G., MATSON, C.F., MIURA, G.A., LAWRENCE, W.B. Tissue distribution, excretion, and hepatic biotransformation of microcystin-LR in mice. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1991, 256:176-182
 55. CARMICHAEL, W.W., FALCONER, I.R. Disease related to freshwater algal blooms. In: Falconer I.R. (Ed.), *Algal toxins in seafood and drinking water*, London: Academic Press, 1993.
 56. HAWKINS, P.R., RUNNEGAR, M.T.C., JACKSON, A.R.B., FALCONER, I.R. Severe hepatotoxicity caused by the tropical cyanobacterium (blue-green alga) *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska) Seenaya and Subba Raju isolated from a domestic water supply reservoir. *Appl Environ. Microbiol.* 1985, 50: 1292-1295.
 57. COUTE A., LEITAO M., MARTIN C. First observation of the genus *Cylindrospermopsis* (Cyanophyceae, Nostocales) in France. *Cryptogamie Algologie* 1997, 18: 57-70.

58. PADISÀK, J. *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska) Seenayya et Subba Raju, an expanding, highly adaptive cyanobacterium: worldwide distribution and review of its ecology: *Arch. Hydrobiol.* 1997, 107(suppl): 563-593.
59. FASTNER, J., CHORUS, I., NEUMANN, U. Microcystins (hepatotoxic heptapeptides) in German fresh waterbodies. *Environ. Tox. Water Qual.* 1999, 14 (in press).
60. FALCONER, I.R. Tumor promotion and liver injury caused by oral consumption of cyanobacteria. *Environ. Toxicol. Water Qual.* 1991; 6(2): 177-84.
61. FITZGEORGE, R., CLARK, S., KEEVIL, C. Routes of intoxication. In: *Detection methods for cyanobacterial toxins*. G.A. Codd, T.M. Jefferies, C.W. Keevil, E. Potter (Eds). London: The Royal Society of Chemistry, 1994, p. 69-74.
62. FALCONER, I.R., HUMPAGE, A.R. Tumour promotion by cyanobacterial toxins. *Phycologia* 1996, 35(6): 74-79.
63. MAHMOOD, N.A., CARMICHAEL, W.W. Anatoxin-a(s), an anticholinesterase from the cyanobacterium *Anabaena flos-aquae* NRC-525-17. *Toxicon* 1987, 25: 1221-1227.
64. MATSUNAGA, S., MOORE, R.E., NIEMSZURA, W.P. Anatoxin-a(S), a potent anticholinesterase from *Anabaena flos-aquae*. *J. Am. Chem. Soc.* 1989, 111: 8021-8023.
65. FAWELL, J.K., JAMES, H.A. 1994. Report No. FR 0434/DoE 3728. Allen House, The Listons, Liston Road, Marlow, Bucks, SL7 1FD, UK.
66. STEVENS, D.K., KRIEGER, R.I. Application of a sensitive, GC-ECD analysis for anatoxin-a. In: Abstracts of Plenary lectures, slides and Poster presentations at the 9th world congress on animal plant and microbial toxins. Nanning, Guangxi, 22-25 May 1989, China. *Toxicon* 1989, 27: 79 a.
67. ASTRACHAN, N.B., ARCHER, B.G., HILBELINK, D.R. Evaluation of the subacute toxicity and teratogenicity of anotoxin-a. *Toxicon* 1980, 18: 684-688.
68. HUMPAGE, A.R. ROSITANO, J., BRETAG, A.H., BROWN, R., BAKER, P.D. NICHOLSON, B.C., STEFFENSEN, D.A. Paralytic shellfish poisons from Australian cyanobacterial blooms. *Aust. J. Mar. Freshwater Res.* 1994, 45: 761-71.
69. SAWYER, P., GENTILE, J., SASNER, J.J. Demonstration of a toxin from *Aphanizomenon flos-aquae* (L) Ralfs. *Can. J. Microbiol.* 1968, 14: 1199-204.
70. FERREIRA, F., FRANCO, J.M., FIDALGO, M.L., FERNANDEZ-VILA, P. Detection of PSP toxins from *Aphanizomenon flos-aquae* (cyanobacteria) collected in the Crestuma/Lever reservoir (Duro River, Northern Portugal). In: *Abstracts of the Symposium Eutrophication, Causes, Consequences and Remediation*. 21-23 May 1995, Porto, Portugal. 1995, p. 24.
71. FALCONER, I.R., BURCH, M.D., STEFFENSEN, D.A. CHOICE, M., COVERDALE, O.R. Toxicity of the blue-green alga (cyanobacterium) *Microcystis aeruginosa* in drinking water to growing pigs, as an animal model for human injury and risk assessment. *J. Environ. Toxicol. Water Qual.* 1994, 9: 131-39.
72. OBEREMM, A., BECKER, J., CODD, G.A., STEINBERG, C. Effects of cyanobacterial toxins and aqueous crude extract of cyanobacteria on the development of fish and amphibians. *Environ. Toxicol.*

- 1999, 14: 10-15.
73. FAWELL, J.K., MITCHELL, R.E., EVERETT, D.J., HILL, R.E. The toxicity of cyanobacterial toxins in the mouse: I Microcystin-LR. *Human and Experimental Toxicology* 1999, 18: 162-167
 74. KOTAK, B.G., KENEFICK, S.L., FRITZ, D.L., ROUSSEAU, C.G., PREPAS, E.E., HRUDEY, S.E. Occurrence and toxicological evaluation of cyanobacterial toxins in Alberta lakes and farm dugouts. *Water Res.* 1993, 27: 495-506.
 75. RINEHART, K.L., NAMIKOSHI, M., CHOI, B.W. Structure and biosynthesis of toxins from blue-green algae (cyanobacteria). *J Appl Phycol* 1994, 6: 159-76.
 76. REPAVICH, W.M., SONZOGNI, W.C., STANDRIDGE, J.H. WEDEPOHL, R.E., MEISNER, L.F. Cyanobacteria (blue-green algae) in Wisconsin waters: acute and chronic toxicity. *Water Res.* 1990, 24: 225-31.
 77. NISHIWAKI-MATSUSHIMA, R., OHTA, T., NISHIWAKI, S., SUGANUMA, M., KOHYAMA, K., ISHIKAWA, T., CARMICHAEL, W.W., and FUJIKI, H. Liver tumor promotion by the cyanobacterial cyclic peptide toxin microcystin-LR. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 1992, 118: 420-424.
 78. MACKINTOSH, C., BEATTIE, K.A., KLUMPP, S., COHEN, P., CODD, G.A. Cyanobacterial microcystin-LR is a potent and specific inhibitor of protein phosphatases 1 and 2A from both mammals and higher plants. *FEBS Lett.* 1990, 264: 187-192.
 79. YOSHIKAWA, S., MATSUSHI, R., WATANABE, M.F., HARADA, K.I., ICHIHARA, A., CARMICHAEL, W.W., FUJIKI, H. Inhibition of protein phosphatases by microcystin and nodularin associated with hepatotoxicity. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 1990, 116: 609-614.
 80. FALCONER, I.R., YEUNG, D.S.K. Cytoskeletal changes in hepatocytes induced by Microcystis toxins and their relation to hyperphosphorylation of cell proteins. *Chem Biol Interact* 1992, 81:181-196.
 81. RUNNEGAR, M.T.C., JACKSON, A.R.B., FALCONER, I.R. Toxicity of the cyanobacterium *Nodularia spumigena* Mertens. *Toxicon* 1988, 26(2): 143-151.
 82. LAHTI, K. Cyanobacterial hepatotoxins and drinking water supplies-aspects of monitoring and potential health risks. Monographs of Boreal Environment Research No. 4, 1997, Finnish Environmental Institute, Finland.
 83. TERAOKA, K., OHMORI, S., IGARASHI, K., OHTANI, I., WATANABE, M., HARADA, K.I., ITO, E. AND WATANABE, M. Electron microscopic studies on experimental poisoning in mice induced by cylindrospermopsin isolated from blue-green alga *Umezakia natans*. *Toxicon* 1994, 32: 833-843.
 84. FALCONER, I.R. Health problems from exposure to cyanobacteria and proposed safety guidelines for drinking and recreational water. In: codd G.A., Jefferies, T.M., Keevil, C.W., Potter, E. (eds) *Detection Methods for Cyanobacterial Toxins*. London: The Royal Society of Chemistry, 1994 , pp. 3-10.
 85. CHORUS, I., BARTRAM, J. Toxic Cyanobacteria in Water: a Guide to Public Health, Consequence Monitoring and Management. In: I. Chorus and J. Bartram, (Eds.) London, New York: Published on behalf of WHO by E&FN Spon, 1999, p. 416.

86. MCDERMOTT, C.M., FEOLA, R., PLUDE, J. Detection of cyanobacterial toxins (microcystins) in waters of northeastern Wisconsin by a new immunoassay technique. *Toxicon* 1995, 33: 1433-1442.
87. ZAVALETA, J.O., CANTILLI, R., OHANIAN, E.V. Drinking water health advisory program. In: Fawell J.H. and Funari E. (Eds.), Chemical in drinking water and human health implications. *Ann. Ist. Super. Sanità* 1993, 29: 355-358.

TECNICHE DI ANALISI CHIMICA PER LE PRINCIPALI TOSSINE CIANOATTERICHE

Francesco Pomati, Carlo Rossetti

*Unità di Biologia Applicata, Dipartimento di Biologia Strutturale e Funzionale,
Università degli Studi dell'Insubria, Varese*

Introduzione

La chimica analitica in generale, ed in particolare quella applicata allo studio delle tossine cianobatteriche, ha lo scopo di valutare dal punto di vista qualitativo e/o quantitativo la presenza di una molecola, in questo caso una tossina algale. L'indagine viene operata in maniera specifica a seconda della struttura e delle caratteristiche chimiche della molecola in esame, ed è quindi noto che in analitica "si trova solo ciò che si cerca". Ad ogni modo, per rendere un'indagine chimica il più informativa possibile, si può agire sui due diversi aspetti che la caratterizzano: la valutazione di natura qualitativa e la valutazione di natura quantitativa.

Le più importanti proprietà di una valutazione qualitativa sono rappresentate dalla ripetibilità dell'analisi e dalla affidabilità del metodo. E' intuitivo il fatto che, per avere informazioni sulla presenza/assenza di un particolare composto, sia indispensabile disporre di un metodo affidabile (testato e valutato) nonchè ripetibile. La standardizzazione del procedimento di preparazione e di analisi dei campioni è quindi indispensabile, e per questo processo è fondamentale la disponibilità di standard di riferimento certificati.

Le qualità principali che devono caratterizzare una valutazione di natura quantitativa sono invece la selettività e la sensibilità. L'analisi deve essere in grado di rilevare selettivamente il composto o i composti in indagine e deve essere il più possibile sensibile per poter ricavare utili informazioni anche per concentrazioni molto basse del campione.

I metodi più affidabili, ripetibili, precisi e sensibili, nonchè i più diffusi nell'analisi delle cianotossine, sono i sistemi di indagine cromatografica. Essi permettono di separare su colonna le molecole indagate grazie alla loro differente affinità per una fase stazionaria (ferma sulla colonna) ed una fase mobile (detta eluente), uscendo quindi dalla colonna cromatografica con tempi diversi (tempo di ritenzione). Generalmente la fase stazionaria è polare e quella mobile apolare, nel caso delle analisi applicate alle cianotossine vengono utilizzate colonne apolari ed eluenti a forza polare variabile.

Lo strumento di indagine chimico/cromatografica più diffuso ed utilizzato nello studio delle cianotossine è l'HPLC (high performance liquid chromatography). Esso è pratico ed efficiente, poco costoso in relazione alla quantità di informazioni ricavabili

dall'uso della macchina, ed è caratterizzato da una buona sensibilità e da una buona selettività.

Le tossine cianobatteriche

I cianobatteri, alghe procariotiche considerate ubiquitarie, sono in grado di produrre un'ampia varietà di composti bioattivi, ed in particolare alcuni generi sono considerati pericolosi perchè potenzialmente capaci di produrre composti tossici.

Per quanto riguarda l'effetto biologico, le cianotossine di maggiore importanza sanitaria si dividono in due principali categorie (Figura 1): le epatotossine, che espletano il loro effetto tossico sulle cellule epatiche provocando necrosi dell'organo e morte dell'organismo, e le neurotossine che invece agiscono a livello dei neurotrasmettitori bloccando o interagendo negativamente con il corretto trasferimento degli impulsi nervosi. Le più importanti epatotossine cianobatteriche sono le Microcistine, la Nodularina e la Cilindrospermopsina. Le principali neurotossine sono le Anatossine e le tossine PSP (paralytic shellfish poisoning), di cui la Saxitossina è la più importante.

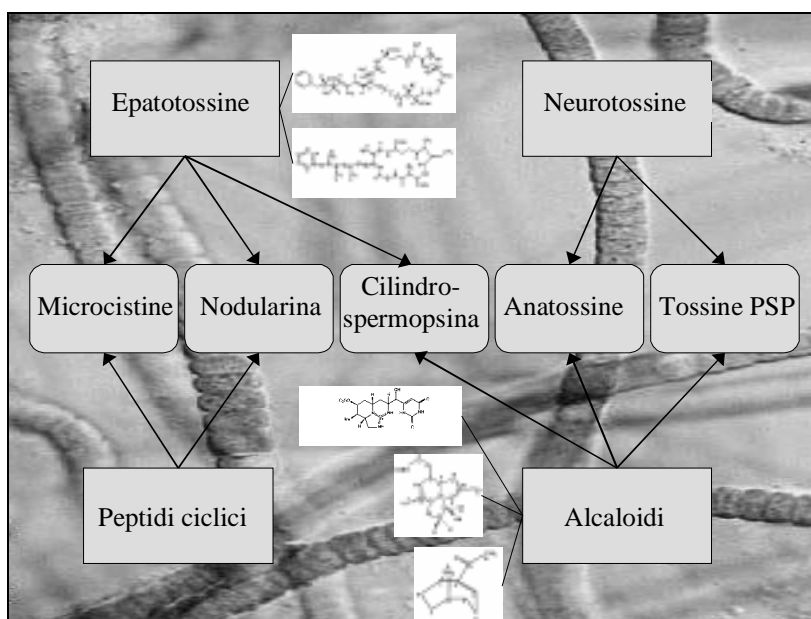


Figura 1.- Le principali tossine cianobatteriche.

Dal punto di vista chimico, è opportuno suddividere queste tossine in base alla loro struttura (Figura 1): le microcistine e la nodularina sono peptidi ciclici; la cilindrospermopsina, le anatoxine e le saxitossine sono degli alcaloidi. Il comportamento e le caratteristiche chimiche delle due categorie sono chiaramente differenti e si riflettono nelle diverse procedure di analisi di questi composti.

Determinazione di peptidi ciclici

Estrazione. - I peptidi ciclici microcistine (MC) e nodularina (Nod) sono caratterizzati da un procedimento analitico comune. Data la maggiore solubilità di questi composti in solventi organici, l'estrazione delle tossine dalle cellule cianobatteriche viene eseguita generalmente in metanolo diluito con acqua bidistillata (MilliQ). La percentuale di diluizione metanolo/acqua può variare dal 50% al 75% di metanolo. Soprattutto per quanto riguarda analisi più specificatamente volte alla determinazione delle microcistine, è opportuno utilizzare diluizioni vicino al 50% di metanolo/acqua, in conseguenza del fatto che alcune delle circa 60 microcistine tuttora conosciute mostrano moderate affinità per solventi polari [1].

La procedura di estrazione prevede comunque l'utilizzo di procedimento di rottura delle cellule, onde poterne separare le tossine. Molti sono i metodi generalmente utilizzati per questo scopo (French cell press, congelamento e scongelamento, omogeneizzazione), ma probabilmente il più veloce ed efficiente è la sonicazione. A tal proposito è consigliabile eseguire la rottura delle cellule con ultrasuoni utilizzando una sonda ad immersione e procedendo per cicli [2-4] non superiori al minuto, al fine di evitare un eccessivo riscaldamento del campione (da tenere sempre in ghiaccio) [2, 5]. Questo tipo di procedimento ha una resa in estrazione paragonabile circa all'80% delle tossine totali presenti nelle cellule di partenza. Una ulteriore centrifugazione dell'estratto con ri-estrazione del pellet può portare la resa del procedimento ben oltre il 90% [1].

Preparazione. - Una volta ottenuto l'estratto cellulare grezzo, o nel caso si stia valutando la presenza delle tossine disciolte nell'acqua, è necessario centrifugare il campione (13 000 rpm, 15 min.) o filtrarlo (porosità 0.45 μm) per eliminare residui di membrana o altre eventuali impurità di grosse dimensioni [2]. La fase successiva prevede la separazione dell'estratto su colonna C-18 SPE (solid phase extraction), precedentemente condizionata con acqua e metanolo. Il campione viene caricato sulla colonnina e fatto passare completamente, la colonna viene poi eluita con Metanolo acidificato con 0.1% di acido trifluoroacetico (TFA), con conseguente recupero della fase peptidica dell'estratto. Nel caso l'eluizione della colonnina venga eseguita con molto solvente e si desidera concentrare l'estratto, è opportuno farlo per liofilizzazione o, in alternativa, mediante un evaporatore rotante. A questo punto è possibile risospingere il concentrato in metanolo e stoccarlo in freezer (almeno $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$) prima dell'analisi HPLC.

Analisi HPLC.- Brevemente, l'analisi HPLC per la determinazione della nodularina e delle microcistine si opera usando una colonna C-18 a fase inversa, eluita per gradiente di acetonitrile/acqua + 0.05% di TFA per le microcistine (miglior separazione delle diverse forme di questa tossina) o in condizione isocratica miscelando 26% di acetonitrile in 0.1M di ammonio acetato per la nodularina. La rilevazione avviene agli UV (238 – 240 nm per MC e Nod rispettivamente) [1].

Benché il procedimento di analisi sia tutto sommato abbastanza semplice, l'identificazione delle diverse microcistine presenta alcune problematiche. Data l'elevata quantità di analoghi e derivati (circa 60), l'identificazione e di conseguenza la quantificazione delle MC in campioni ambientali diventa spesso difficile. Generalmente si riesce a risalire alla presenza di pochi (3 o 4) tipi di microcistina all'interno di un campione, con conseguente sottostima della concentrazione di tossine totali, non essendo attualmente disponibili sul mercato standard di riferimento per tutte le MC. Questo induce inoltre a considerare erroneamente alcuni picchi riscontrati a volte nei campioni come sconosciuti e quindi come contaminanti. Nondimeno, capita spesso che i tempi di ritenzione di alcuni analoghi siano identici, complicando ulteriormente l'interpretazione dei risultati dell'analisi. Proprio per questo motivo alcuni autori hanno recentemente proposto un processo di derivatizzazione delle microcistine per mezzo di 2-amminoetantiolo (AET), durante il quale i peptidi reagiscono con l'AET ed i prodotti derivatizzati risultano più facilmente separabili durante l'analisi. Questo metodo risulta addirittura infallibile se l'analisi finale viene operata per mezzo di LC/MS (HPLC collegata ad uno spettrometro di massa) [3].

Analisi di alcaloidi: Anatoxina-a e Homoanatoxina-a

Estrazione.- Il metodo più efficace di estrazione dalle cellule dell'anatoxina-a e dell'homoanatoxina-a prevede l'utilizzo di una miscela di estrazione di metanolo puro + 1% HCl 1M e la rottura delle cellule per sonicazione (2-5 minuti come precedentemente riportato per le microcistine e la nodularina). In seguito l'estratto grezzo può essere centrifugato ed il pellet riestratto per migliorare la resa del procedimento. Il campione deve successivamente essere concentrato fino alla totale assenza di solvente e risospeso in acqua MQ [3, 4].

Preparazione.- La purificazione del campione estratto o il recupero delle tossine da campioni d'acqua si esegue su colonna WCX (weak cation exchange) a basso scambio cationico la quale, dopo aver caricato il campione, va eluita con una soluzione di metanolo acidificato con lo 0.2% di TFA. Anche in questo caso il campione deve essere concentrato e risospeso, questa volta in sodio borato 0.1M, ed in attesa del passaggio di derivatizzazione può essere conservato in freezer a -20 °C.

Il processo di derivatizzazione avviene facendo reagire le anatoxine con fluoronitrobenzodiazolo (NBD-F) [4].

Analisi HPLC.- La procedura analitica HPLC per le anatoxine prevede l'utilizzo di una colonna C-18 a fase inversa eluita con una miscela al 45% di acetonitrile/acqua. Le tossine derivatizzate con NBD-F sono rilevabili in fluorescenza alla lunghezza d'onda di 530 nm (emissione, eccitazione 470 nm) [4].

La metodologia di analisi qui riportata è considerata la migliore per questa famiglia di composti, in quanto permette la rilevazione di alcuni prodotti di degradazione nonché di idro ed epossidi derivati delle anatoxine.

Analisi di alcaloidi: Anatoxina -a(s)

L'anatoxina-a(s) è un composto considerato in natura molto raro e pericoloso (è un inibitore dell'acetilcolinesterasi). Nessuna procedura standardizzata è ancora disponibile per l'analisi di questa molecola, che non assorbe alle radiazioni UV e di cui non sono note reazioni di derivatizzazione. L'unico procedimento analitico attualmente disponibile (ma non ancora pubblicato, Onodera H.- comunicazione personale) prevede l'utilizzo dell'LC/MS.

Analisi di alcaloidi: Cilindrospermopsina

Estrazione.- Il procedimento di estrazione della cilindrospermopsina dalle cellule cianobatteriche può essere eseguito mediante sonicazione, come precedentemente descritto, sospendendo la biomassa da estrarre in acido acetico al 5%. Anche in questo caso, per migliorare l'efficienza di recupero delle tossine si può centrifugare l'estratto e riestrarre il pellet.

Preparazione.- Il materiale estratto, o un eventuale campione d'acqua, possono essere estratti su fase solida per mezzo di una colonna C-18. Nel caso il campione sia caricato sulla colonna in acido acetico al 5%, le tossine sono recuperate nella frazione del campione che passa direttamente nella colonna e nelle prime frazioni di lavaggio con acqua. Se sulla colonna si passa un campione d'acqua, le tossine si possono recuperare eluendo la colonna con acido acetico al 5%.

Analisi HPLC.- Il procedimento analitico HPLC viene eseguito separando il campione su colonna ODS-2 Silica Gel eluita con un gradiente lineare 0-5% di metanolo-acqua. La cilindrospermopsina mostra un tipico assorbimento UV a 262 nm (1).

Alcaloidi: Tossine PSP (STX, neoSTX, GTXs, Bs, Cs)

Estrazione.- L'estrazione di queste tossine da un campione di cianobatteri può essere eseguita alternativamente in acido acetico al 5% o in acqua, e preferibilmente per sonicazione più eventuale riestrazione del pellet dopo centrifugazione [6].

Preparazione. - Il passaggio di “clean-up” dei campioni si esegue su colonna C-18 eluita con una quantità variabile di acido acetico 5% nel caso di estrazione in acqua, e recuperando il primo eluito del campione più eventuali ulteriori frazioni acquose nel caso di estrazione in acido acetico al 5%. Come in quasi tutti i casi, l’eluito può essere concentrato per evaporazione o per liofilizzazione. Lo stoccaggio va eseguito sempre in soluzione acida e ad almeno $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ [2, 6].

Analisi HPLC. - La derivatizzazione delle tossine PSP avviene per ossidazione con perossido o periodato, reazione che rende queste molecole fluorescenti. Il campione così trattato viene quindi eluito isocraticamente con 1% acenotrile / ammonioformato (o con gradiente lineare 0-4%) su colonna C-18 a fase inversa. La rivelazione di queste tossine ossidate avviene in fluorescenza a 390 nm (emissione, 330 nm eccitamento) [6].

Questo tipo di procedura analitica, con ossidazione pre-colonna, presenta la problematica della distinzione di acuni derivati della saxitossina, che danno gli stessi prodotti di ossidazione pur essendo strutturalmente differenti [5, 6]. Per ovviare a questo inconveniente, che incide negativamente anche sulle possibilità di quantificazione delle tossine e riduce il grado di confidenza delle analisi, è stato messo a punto un procedimento analitico con ossidazione post-colonna per mezzo di un miscelatore che permette agli ossidanti di reagire con il campione dopo che i diversi composti sono stati separati sulla colonna in base alle loro effettive differenze strutturali, e prima del rivelatore in fluorescenza. Questo metodo prevede inoltre l’uso di tre differenti fasi mobili per l’analisi delle saxitossine, delle GTX o delle B e C toxins [7].

Conclusioni

Nella valutazione del rischio associato alla presenza di tossine cianobatteriche i metodi chimici di analisi attualmente disponibili consentono la determinazione nonché una buona quantificazione delle cianotossine presenti sia all’interno delle cellule che libere in acqua. In un bloom tossico in condizioni naturali, ad una tossina nota sono sempre associati prodotti di degradazione (la cui percentuale aumenta col passare del tempo dal momento del collasso della fioritura), la cui determinazione sarebbe fondamentale per quantificare il picco di concentrazione di tossina effettivamente presente nelle acque, oltre a derivati e metaboliti di diversa natura che possono influire significativamente sul rischio potenziale. Ciò che ancora rappresenta un’incognita nel campo di queste analisi è la possibilità di valutare la presenza degli eventuali prodotti di degradazione presenti. Essi presentano generalmente una struttura differente ed una minor tossicità, ma non per questo rivestono un ruolo di importanza minore nell’eventuale analisi del rischio chimico associato ad una fioritura di cianobatteri tossici. Purtroppo, al momento, poco si sa in merito a derivati e prodotti di degradazione della maggior parte delle tossine conosciute, e anche nel caso se ne conoscano alcuni, la disponibilità degli standard di riferimento per le analisi è molto limitata.

Ciò che emerge comunque dai recenti meetings è che quello della ricerca e della determinazione delle cianotossine è un campo molto vasto e parzialmente inesplorato, soprattutto in Italia dove sono state poco sperimentate anche le tecniche di monitoraggio. Sarebbe auspicabile un investimento di risorse nei campi della ricerca e dello sviluppo di nuove metodologie orientate al monitoraggio ed all'analisi delle cianotossine principali, promuovendo inoltre l'utilizzo di apparecchiature più efficaci, quali LC/MS, nonché la ricerca di una più vasta e disponibile gamma di standard di riferimento. Questo potrebbe permettere in un vicino futuro di operare una più rapida valutazione del rischio chimico potenziale grazie ad una più sofisticata quantificazione e determinazione delle possibili cianotossine.

Bibliografia

1. HARADA, K., KONDO, F. & LAWTON, L. 1999. Laboratory analysis of Cyanotoxins. In TOXIC CYANOBACTERIA IN WATER, Edited by Chorus I. and Bartram J., WHO, 41-111, E & FN Spon Publishers, London, p. 369-399.
2. POMATI, F., SACCHI, S., ROSSETTI, C., GIOVANNARDI, S., ONODERA, H., OSHIMA, Y., AND NEILAN, B.A. The freshwater cyanobacterium *Planktothrix* sp. FP1: molecular identification and detection of paralytic shellfish poisoning toxins. *J. Phycol.* 2000, 36 (3): 40-49.
3. AMBROSE, F., KEVIN, J.J., SHERLOCK, I.R., SKULBERG O.M. Application of derivatisation methods for the HPLC determination of anatoxins and microcystins in Irish Lakes. Poster presentation, 4th International Conference on Toxic Cyanobacteria, Beaufort, North Carolina, 27/9-1/10, 1998.
4. KEVIN, J.J., AMBROSE, F., SHERLOCK, I.R., STACK, M.A., TWOHIG, M., CAUDWELL F.B., SKULBERG O.M. 1998. Sensitive determination of anatoxin-a, homoanatoxin-a and their degradation products by liquid chromatography with fluorimetric detection. *J. Chromatogr.* 798(1-2), p. 147-157.
5. JONES, G.J. & NEGRI, A.P. 1997. Persistence and degradation of cyanobacterial paralytic shellfish poisons (PSPs) in freshwaters. *Wat. Res.* 1997, 31(3):. 525-533.
6. LAWRENCE, J.F., WONG, B. AND MÉNARD, C. Determination of decarbamoyl saxitoxin and its analogues in shellfish by prechromatographic oxidation and liquid chromatography with fluorescence detection. *J. AOAC Int.* 1996, 79 : 1111-1116.
7. OSHIMA, Y. 1995. Postcolumn derivatization liquid chromatographic method for paralytic shellfish toxins. *J. AOAC Int.* 1995: 78: 528-32

APPLICAZIONE DI TEST BIOLOGICI PER LA DETERMINAZIONE DELL'EFFETTO ASSOCIATO ALLE TOSSINE CIANOBATTERICHE

Francesco Pomati, Carlo Rossetti

Unità di Biologia Applicata, Dipartimento di Biologia Strutturale e Funzionale, Università degli Studi dell'Insubria, Varese

Introduzione

I test di laboratorio volti alla determinazione di un effetto biologico possono essere generalmente considerati di due tipi: aspecifici e specifici. Nella valutazione della tossicità di estratti cianobatterici vengono utilizzate entrambe le categorie.

I test biologici aspecifici hanno lo scopo di dare un'indicazione grossolana della presenza o assenza di un effetto biologico, generalmente la morte dell'organismo, più raramente il verificarsi di sintomi correlati all'intossicazione. Per via di queste loro caratteristiche i test aspecifici sono abbastanza veloci, non richiedono complicati accorgimenti nella preparazione dei campioni, ma vantano una bassa selettività ed una scarsa sensibilità.

Al contrario i test specifici, indirizzati alla valutazione dell'effetto associato alla singola molecola nota, mostrano elevata sensibilità e selettività. Essi rappresentano quindi un valido mezzo di valutazione quantitativa dell'effetto tossico specifico associato ad un composto, nonché uno strumento di indagine del rapporto struttura-attività biologica di tossine appartenenti alla stessa famiglia.

Test Biologici Aspecifici: Mouse Bioassay

Fra i test di indagine biologica aspecifica quello sul topo è in assoluto il più diffuso, soprattutto ed in particolare nel campo delle cianotossine.

Procedimento.- Il protocollo prevede in sintesi l'estrazione e la preparazione del campione in maniera analoga a quella utilizzata per le analisi chimiche, con risospensione dell'estratto in una soluzione fisiologica sterile (0.1, 1 o 2 ml) e successiva iniezione intraperitoneale della stessa nel topo. Il periodo di osservazione dura generalmente 24 ore, anche se in alcuni casi può protrarsi per 7 giorni (cilindrospermopsina), ed al termine di questo periodo si procede con l'esame dei tessuti (le cavie ancora vive vengono sacrificate), al fine di individuare delle eventuali lesioni a tessuti specifici [1].

Vantaggi.- Questo test generico permette di valutare la tossicità totale di un estratto su un intero organismo, ed oltre ad una risposta di tipo vivo/morto si possono ottenere informazioni riguardo alle grossolane malformazioni dei tessuti. Il test sul topo risulta abbastanza rapido, relativamente economico, non necessita di una particolare tecnologia ed è per questo molto diffuso ed usato. E' attualmente ancora l'unico test che fornisca informazioni riguardo alla tossicità di tutte le principali cianotossine.

Svantaggi.- L'esecuzione del test di tossicità sul topo richiede comunque personale specializzato, soprattutto nei campi della patologia e dell'istologia, ed in alcuni casi, come in Italia, è necessaria l'abilitazione. Il test non è specifico e spesso è poco sensibile, e data la sua aspecificità l'effetto tossico è a volte falsato dalla presenza di diverse sostanze nell'estratto. Il test classico non fornisce informazioni sugli effetti a lungo termine degli estratti testati, quali mutagenicità, cancerogenicità o teratogenicità. Test di questo tipo su topo o coniglio sono estremamente lunghi (mesi) e costosi (decine di milioni).

Dati questi svantaggi ed alcune ragioni etiche, nel campo della valutazione tossicologica degli estratti cianobatterici sono stati proposti, come alternativa, alcuni test di tossicità su invertebrati [1].

Test specifici

I test specifici di tossicità, come precedentemente accennato, permettono la quantificazione dell'attività specifica di una molecola, sono quindi molto validi e sensibili. Proprio per la loro elevata specificità e selettività essi hanno un utilizzo limitato, sono abbastanza costosi, richiedono spesso tecnologie particolari e personale specializzato. Questo naturalmente rappresenta un disagio di natura tecnico organizzativa per i laboratori, e di conseguenza sono poco usati di routine.

Il test di inibizione specifica delle fosfatasi è utilizzato per valutare l'attività biologica di campioni contenenti microcistine o nodularina, che esplicano la loro tossicità sull'organismo appunto inibendo le proteine fosfatasi nelle cellule epatiche. Il test di inibizione dell'acetilcolinesterasi è il principale metodo di indagine biologica specifica per l'antossina-a(s), mentre per l'antossina-a e tossine PSP, che esplicano la loro attività a livello dei recettori nicotinici e dei canali del sodio nelle cellule neurali, sono necessari test più sofisticati che valutino i cambiamenti nel potenziale d'azione delle membrane in tempo reale. Questi test necessitano quindi di alta tecnologia e personale molto qualificato, e sono di conseguenza i meno diffusi.

Integrazione di test specifici ed aspecifici

Il processo di innovazione nell'utilizzo dei test biologici ha portato all'integrazione di test aspecifici (risposta dell'organismo) con un maggior contenuto informativo (mutagenesi, cancerogenesi, teratogenesi) ed una maggiore sensibilità con test a crescente grado di specificità indirizzati alla risposta cellulare generica (citotossicità) ed alla risposta cellulare specifica (meccanismo molecolare bersaglio) (Figura 1).

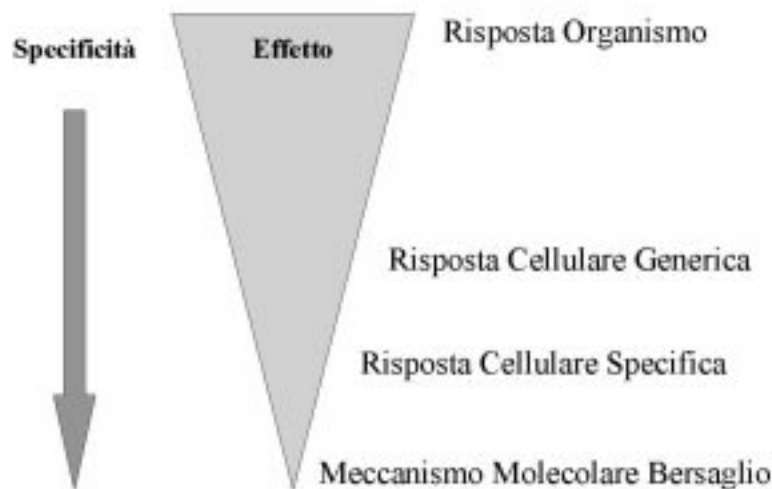


Figura 1.- Specificità ed effetto nei test biologici

A titolo di esempio, viene qui riportata la procedura che è stata applicata allo studio della tossicità degli estratti grezzi e purificati del cianobatterio tossico *Planktothrix* sp. FP1, produttore di tossine PSP ed isolato dal Lago di Varese . In questo caso i test utilizzati sono stati: il FETAX, un test di tossicità su linfociti umani ed il patch-clamp sui canali del sodio di cellule di neuroblastoma umane.

Test FETAX (*frog embryo teratogenesis assay Xenopus*)

Il FETAX è un test di teratogenesi che fa uso di embrioni di *Xenopus laevis* [2]. Esso è di natura aspecifica ma è dotato di un elevato grado di sensibilità grazie all'adozione degli embrioni ancora nelle prime fasi di sviluppo. Il FETAX permette la valutazione della

tossicità acuta ma anche di quella cronica dato che il test, ripetuto tre volte, ha una durata standard di 5 giorni, periodo durante il quale gli embrioni si sviluppano fino alla forma di girino. Nel corso del test vengono registrati dati embrionali riguardo alla mortalità ed alle malformazioni, variazioni nella lunghezza testa-coda, problemi di locomozione o pigmentazione (indici di danni neurali e muscolari) nonché ritardi nella schiusa o nello sviluppo. E' possibile quindi ottenere indici di mortalità o di teratogenicità quali: 96h LC50, 96h EC50, TI (teratogenic index) e MCIG (minimum concentration to inhibit growth).

Il procedimento di attuazione del FETAX prevede l'induzione dell'ovulazione, che avviene nell'arco di 24 ore, nelle femmine di *Xenopus* (generalmente 4 o 5) per mezzo di iniezione di gonadotropina corionica. Le uova così ottenute vengono fecondate *in vitro*, e questo permette di avere a disposizione per gli esperimenti gli embrioni già ai primi stadi di sviluppo. Gli embrioni, immediatamente dopo la fecondazione, vengono messi in capsule petri (10-20 ognuna) con concentrazioni crescenti di estratto tossico e monitorati per cinque giorni raccogliendo dati relativi alle morti, malformazioni, ecc. Il test viene svolto generalmente in triplo e ripetuto almeno tre volte, e la conseguente mole di dati analizzata statisticamente.

Questo tipo di test è relativamente poco costoso, facile, veloce (giorni). Dal punto di vista statistico i dati ottenuti possono essere considerati molto robusti, e le informazioni tossicologiche ricavabili molteplici. Inoltre, *Xenopus laevis* rappresenta un modello animale molto ben studiato e conosciuto, sono quindi facili le connessioni tra la tossicologia e la biologia dello sviluppo, la biochimica e la biologia molecolare nella forma dell'individuazione di variazioni metaboliche fini in seguito alle diverse forme di intossicazione. I dati ottenuti con il FETAX sono anche estrapolabili facilmente ad altre specie, soprattutto i mammiferi, con la possibilità di individuare criteri di qualità ambientale per altri organismi acquatici.

Test su PBL (periferal blood lymphocytes)

L'utilizzo di linfociti T umani isolati dal sangue periferico per valutare la tossicità di un estratto algale comporta il vantaggio di poter ottenere dati riguardo alla citotossicità generica del campione nonché informazioni importanti riguardo ad eventuali suoi effetti sulla risposta immunitaria a carico del network linfocitario. In quest'ultimo caso è possibile quantificare la capacità stimolativa o repressiva dell'estratto sulla proliferazione dei linfociti. Dato che spesso si possono evidenziare in un campione effetti sia di natura citotossica che immunitaria, è opportuno operare questo tipo di test sia sugli estratti grezzi che su preparati opportunamente frazionati e purificati. Spesso procedimenti di questo tipo permettono di evidenziare la presenza di nuovi composti ad azione bioattiva.

Il test che fa uso di PBL è facile, veloce ed economico, anche se comporta lo scomodo utilizzo di composti radioattivi.

La procedura prevede il prelievo di campioni di sangue periferico di soggetti di umani di sesso sia maschile che femminile, e l'isolamento successivo di macrofagi, linfociti B e linfociti T (helper). Le colture di T helper vengono arricchite con timidina triziata. Questo permette poi di ottenere una misura dell'accrescimento della popolazione di linfociti per mezzo di uno scintillatore (incorporazione di timidina nel DNA).

Il test viene allestito in triplo per ogni soggetto prendendo in considerazione due possibili effetti dell'estratto: quello diretto sulle cellule e quello su uno stimolo proliferativo standard.

Nel primo caso la popolazione di PBL viene divisa in aliquote mantenute in terreno con concentrazione crescente di estratto algale. Dopo 48 ore, le cellule vengono raccolte e ne viene misurata l'incorporazione di timidina triziata, indice di eventuale aumento o diminuzione della popolazione. In queste condizioni si possono ottenere informazioni sulla tossicità cellulare nonché, in caso di proliferazione, dell'effetto stimolatorio operato dal campione sui secondi messaggeri cellulari (cAmp, Ca^{++} , IP3).

Predisponendo inoltre il test su linfociti ed estratto algale con l'aggiunta di uno stimolo proliferativo standard quale la fitoemoagglutinina (PHA), è possibile valutare l'interferenza agonistica o antagonistica del campione sullo stimolo standard di natura proliferativa.

Patch-clamp: inibizione della corrente del sodio voltaggio dipendente

Questo test viene utilizzato per valutare l'inibizione della corrente del sodio voltaggio dipendente negli estratti algali contenenti neurotossine, in particolare le tossine PSP di cui la saxitossina (STX) è la principale. L'elevata affinità della STX per i canali del sodio ne inibisce l'apertura in seguito alla depolarizzazione della membrana nelle cellule neurali.

Il patch-clamp [3] è una tecnica elettrofisiologica per mezzo della quale è possibile registrare, a *potenziale costante*, la corrente elettrica ($-i$) generata dal flusso di ioni (Na^+ , K^+ , Ca^{++}) attraverso i canali della membrana utilizzando un elettrodo attaccato alla membrana stessa. Nella configurazione "whole-cell" l'elettrodo viene attaccato ad una intera cellula (Figura 2).

Il test viene generalmente operato utilizzando cellule di neuro- o medullo-blastoma umane, allevate e poi preparate in una soluzione (bath solution) contenente $CdCl_2$ ad una concentrazione finale $100 \mu M$ per bloccare i canali del calcio voltaggio dipendenti, di cui non si vuole l'interferenza. L'elettrodo, riempito di soluzione fisiologica-elettrolitica, viene attaccato alla membrana delle cellule in "bath solution" e l'intensità di corrente $-i$ (pA) viene registrata durante l'applicazione di una rampa di potenziale da -80 a $+80$ mV (incremento di 10 mV, durata 40 ms). Uno scambiatore rapido delle soluzioni (rapid solution changer) permette di sostituire alle cellule attaccate all'elettrodo la "bath solution"

(controllo) con l'estratto tossico, e quindi di registrare l'effetto del campione sui canali di membrana.

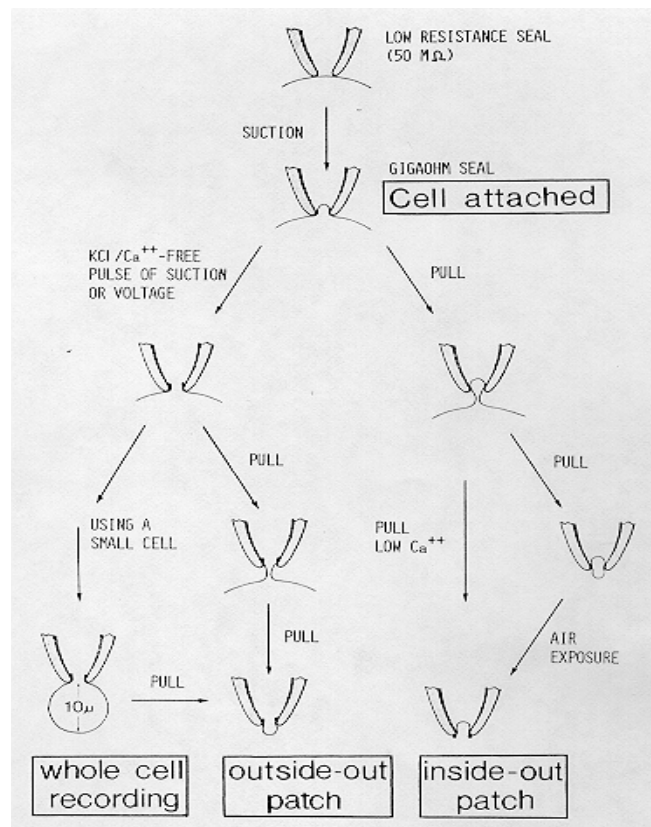


Figura 2. - Tecniche di patch-clamp

Con questa tecnica è possibile quindi valutare l'inibizione della corrente del sodio voltaggio dipendente dovuta alla presenza di eventuali tossine PSP nell'estratto algale, il quale deve essere precedentemente purificato e frazionato per evitare interferenze. La possibilità di misurare la corrente del sodio in maniera fine permette di poter valutare l'effetto tossico di diverse tossine PSP, quali prodotti di degradazione e derivati, in rapporto alla loro struttura e quindi alla loro affinità per i canali di membrana.

La stessa tecnica può essere utilizzata anche per misurare le variazioni nella depolarizzazione della membrana dovute alla presenza di anatoossina-a in campioni algali.

Conclusioni

L'integrazione di test aspecifici di tossicità generica con elevato grado informativo e di sensibilità, uniti a test cellulari e test specifici su target molecolare (proteine fosfatasi, recettori dell'acetilcolina, canali del sodio, ecc.) è applicabile ed auspicabile per tutte le cianotossine. Un procedimento analogo a quello riportato permetterebbe di aumentare notevolmente il grado di comprensione e di consapevolezza degli effetti delle tossine e degli estratti cianobatterici sugli organismi. L'organizzazione di una più completa banca di dati tossicologici riguardo alle cianotossine aiuterebbe inoltre a valutare con più sicurezza il rischio ambientale e sanitario dovuto alle fioriture cianobatteriche, nonché permetterebbe di poter prevedere l'effetto del sempre maggior numero di nuovi derivati, metaboliti e prodotti di degradazione scoperti per queste tossine.

Bibliografia

1. HARADA, K., KONDO, F. & LAWTON, L. 1999. Laboratory analysis of Cyanotoxins. In TOXIC CYANOBACTERIA IN WATER, Edited by Chorus I. and Bartram J., WHO, 41-111, E & FN Spon Publishers, London, p. 369-399.
2. DUMONT, J., SCHULTZ, T.W., BUCHNAN, M. & KAO, G. 1983. Frog Embryo Teratogenesis Assay-*Xenopus* (FETAX) – a short-term assay applicable to complex environmental mixtures. In SHORT-TERM BIOASSAYS IN THE ANALYSIS OF COMPLEX ENVIRONMENTAL MIXTURES III, Waters, Sandhu, Lewtas, Claxton, Chernhoff and Nesnow, eds., Plenum, N.Y., p. 393-405.
3. HAMILL, O.P., MARTY, A., NEHER, B., SAKMANN, B., SIGWORTH, F.J. 1981. Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflugers Archiv – Eur. J. Physiol.* 391, p. 85-100.

SONDE MOLECOLARI: APPLICAZIONI ATTUALI E PROSPETTIVE

Anna Maria Sanangelantoni(a), Giuseppe Forlani(b)(c), Alberto Campani(b) e Luciana Vezzani(b)

(a) *Università degli Studi di Parma, Dipartimento di Scienze ambientali*

(b) *Università degli Studi di Pavia, Dipartimento di Genetica e Microbiologia*

(c) *Università degli Studi di Ferrara*

Il grande sviluppo di tecniche come ibridazione di acidi nucleici, amplificazione *in vitro*, sequenziamento, ecc. verificatosi negli ultimi decenni ha fatto emergere nuovi importanti approcci nell'ambito del monitoraggio ambientale.

Anche se tali metodiche offrono potenzialmente alta specificità e sensibilità, esistono tuttora alcune limitazioni tecniche al loro utilizzo in analisi di routine ed è molto attiva la ricerca di sistemi di prelievo, trattamento ed analisi di campioni ambientali semplici e complessi che siano facilmente applicabili, diano risultati quantitativamente e qualitativamente affidabili e siano riproducibili in ogni situazione.

Un approccio molecolare al monitoraggio delle popolazioni cianobatteriche, soprattutto di quelle che provocano le fioriture potenzialmente tossiche nei bacini impiegati come riserve idriche nell'Italia insulare e meridionale, può offrire un potente mezzo per seguire e controllare il fenomeno sin dalle fasi più precoci e per intervenire tempestivamente ed è per questo motivo che si sta cercando il modo di superare le limitazioni tecniche.

L'impegno scientifico con cui in altri Paesi europei, negli Stati Uniti, in Australia, in Giappone, è stato affrontato il problema delle fioriture tossiche è notevole e accompagnato, in molti casi, dalla creazione di centri specializzati di riferimento. Le ricerche hanno già portato ad apprezzabili risultati nel campo della rilevazione delle tossine nelle acque con metodologie chimiche e mediante saggi enzimatici e si stanno orientando, in questi ultimi anni, al possibile uso di sonde per individuare e caratterizzare a livello molecolare i cianobatteri produttori di tossine.

Gli aspetti fondamentali, e complementari, del monitoraggio di questi microrganismi, prevalentemente acquatici, con tecniche molecolari sono attualmente due: i) sviluppo di efficaci metodi di campionamento ed analisi delle acque e ii) definizione di sonde molecolari specifiche per l'identificazione dei ceppi capaci di produrre le tossine.

I due approcci si stanno sviluppando parallelamente e di pari passo con l'evoluzione dei metodi molecolari per la definizione tassonomica dei cianobatteri che, come si sa, sono microrganismi dalla variabilità fenotipica notevole in relazione alle condizioni di crescita e di difficile classificazione.

Sviluppo dei metodi di campionamento ed analisi

L'individuazione precoce di specie cianobatteriche potenzialmente in grado di produrre fioriture tossiche nei bacini lacustri è uno degli obiettivi che si intende raggiungere al più presto.

Allo scopo di facilitare il campionamento e concentrare i microrganismi quando sono presenti in numero ancora esiguo nelle acque, è stato recentemente sperimentato l'uso di sfere paramagnetiche (già disponibili in commercio per altri scopi) capaci di adsorbire le cellule cianobatteriche e consentire la purificazione degli acidi nucleici e l'amplificazione dei geni prescelti, mediante PCR, direttamente sul substrato [1].

Il metodo si è rivelato efficace quando è stato saggiato con oligonucleotidi specifici per i geni codificanti l'RNA ribosomale 16S, con un limite di sensibilità fino a 50 cianobatteri in 0.5 ml di acqua trattata che è dieci volte inferiore al limite di 500 cianobatteri produttori di tossine per millilitro d'acqua potabile tollerati secondo la New South Wales Blue-Green Algae Task Force, 1992 [2].

Per rendere il saggio ancora più sensibile e quantitativo, sono state apportate al metodo successive modifiche utilizzando una combinazione di PCR competitiva, marcatura sequenza-specifica di sonde oligonucleotidiche, ibridazione e reazione cromogenica [3].

Nel contempo sono in via di sperimentazione metodologie molecolari che potranno permettere l'identificazione *in situ* dei cianobatteri e che attualmente utilizzano sequenze "firma" dei geni codificanti gli rRNA 16S e un tipo di marcatura fluorescente delle sonde in grado di sovrastare l'autofluorescenza di queste cellule ricche di pigmenti fotosintetici [4].

Definizione delle opportune sonde molecolari

E' noto che le fioriture di cianobatteri possono essere prodotte anche da ceppi non tossici e pertanto non costituire un rischio per la salute.

Fino a pochi anni fa l'unico modo per essere certi che una fioritura producesse tossine era la constatazione di problemi agli animali venuti in contatto con essa o saggi di tossicità effettuati sui topi, o analisi chimiche più o meno complesse per evidenziare la presenza delle molecole tossiche nei campioni d'acqua.

L'ipotesi di utilizzare sonde molecolari si è fatta strada circa cinque anni fa quando è risultato chiaro che i ceppi in grado di produrre tossine non lo fanno in tutte le condizioni ambientali e cercare solo queste nelle acque sarebbe stato un controllo insufficiente e incompleto se non integrato dal riconoscimento dei cianobatteri potenzialmente capaci di produrle.

Con quali sonde molecolari identificare questi cianobatteri?

La ricerca di sequenze in grado di riconoscere i ceppi tossici si è mossa in due direzioni:

Un primo tentativo di confronto fra ceppi tossici e non tossici (definiti tali in base alla rilevazione di tossine nei loro terreni di coltura) è stato fatto nel 1995 dal gruppo di Neilan [5] attraverso l'analisi del polimorfismo di sequenze tipiche dei cianobatteri (i geni per le ficocianine). Questo lavoro, come quello che ha preso in esame le sequenze eptameriche ripetute in tandem presenti in ceppi di *Anabaena* [6], non ha dato risultati determinanti e non ha permesso di disegnare sonde utilizzabili.

Nel 1997 Neilan, amplificando i geni codificanti gli rRNA 16S di *Microcystis* e sequenziandoli, ha potuto analizzare diversi ceppi (tossici e non) e definire regioni della sequenza che possono essere considerate "firme" per il genere *Microcystis*, che tuttavia contiene sia ceppi tossici che ceppi non tossici [7]. Anche in questo caso, quindi, le sonde non consentivano di fare previsioni di tossicità della fioritura.

Il migliore risultato nella ricerca di sonde molecolari disegnate su geni non correlati alla produzione di tossine è stato ottenuto finora utilizzando le sequenze ITS (Internal Transcribed Spacers) tra i geni codificanti gli rRNA 16S e 23S.

L'analisi ha permesso di associare in tre principali cluster i 47 ceppi di *Microcystis* analizzati: un cluster comprende solo ceppi non tossici, un secondo solo ceppi tossici e un terzo, più ampio, ceppi tossici e non [8].

E' tuttavia dai geni coinvolti nella produzione delle neurotossine o delle epatotossine che ci si attende la migliore capacità di riconoscimento ed è per questo motivo che in molti laboratori si sono avviate ricerche in questo senso, rivolte in particolare ai geni coinvolti nella produzione delle potenti microcistine, eptapeptidi ciclici epatotossici ed inibitori delle protein-fosfatasi di tipo 1 e 2A.

Considerata la struttura chimica delle microcistine, era stata da tempo avanzata l'ipotesi che una peptide sintetasi fosse coinvolta nella loro sintesi.

Dai primi dati del 1996 di Meißner et al. [9] alla pubblicazione di tutto il locus genetico coinvolto nella sintesi di microcistina LR in *Microcystis aeruginosa* [11,12] sono state sequenziate più di 60000 paia di basi e sono stati identificati una serie di geni che hanno dimostrato di essere implicati nella sintesi delle epatotossine prodotte dal ceppo [10,13] (Figura 1).

Alcuni di questi geni codificano per peptide sintetasi, enzimi multifunzionali, generalmente di notevoli dimensioni, coinvolti, in molti microrganismi, nella sintesi di diversi composti peptidici bioattivi.

Studiando i numerosi geni di peptide sintetasi sequenziati è stato messo in evidenza che questi enzimi sono formati da un susseguirsi di "domini" che hanno il compito di attivare gli amminoacidi, intervallati da regioni "interdominio". Ogni dominio presenta almeno sei regioni altamente conservate di 3-8 amminoacidi alle quali sono state assegnate funzioni varie.

Utilizzando questi geni, o parte di essi, si è pensato di poter creare un pannello di sonde specifiche, adatte al monitoraggio ambientale dei cianobatteri produttori di tossine.

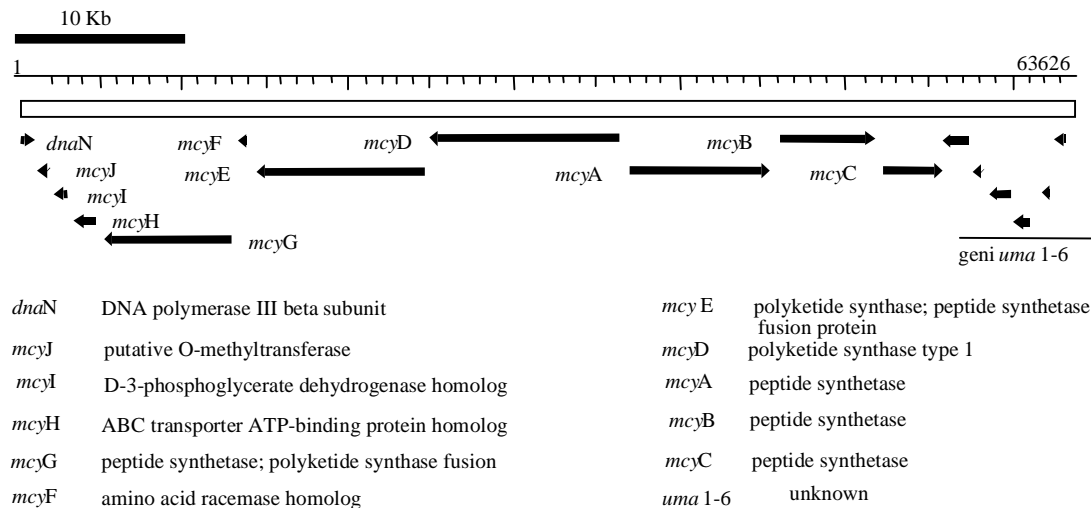


Figura 1. - Cluster di geni coinvolti nella sintesi di microcistina in *Microcystis* spp.

La ricerca di queste sonde è in corso anche presso il Dipartimento di Genetica e Microbiologia dell'Università di Pavia dove sono state amplificate, clonate e sequenziate porzioni dei geni codificanti regioni dominio di peptide sintetasi da alcuni cianobatteri sia coinvolti in fenomeni di fioritura che non, appartenenti ai generi *Microcystis*, *Nostoc*, *Oscillatoria*.

Nel caso del gene di *Microcystis aeruginosa* PCC7941, clonaggio e sequenziamento sono stati proseguiti per 13000 paia di basi circa e hanno messo in evidenza che il gene codifica una peptide sintetasi con domini ed interdomini. Da questo gene sono stati estratti diversi frammenti appartenenti sia alle regioni dominio che alle regioni interdominio che sono stati in seguito utilizzati in esperimenti di ibridazione a diverse condizioni di stringenza dimostrando che le sequenze dominio riconoscono sequenze omologhe sul DNA di molti microrganismi (Figura 2), mentre le regioni interdominio sono molto specifiche per *Microcystis* stessa, ma non riconoscono, o riconoscono molto poco, sequenze di altri cianobatteri. (Figura 3).

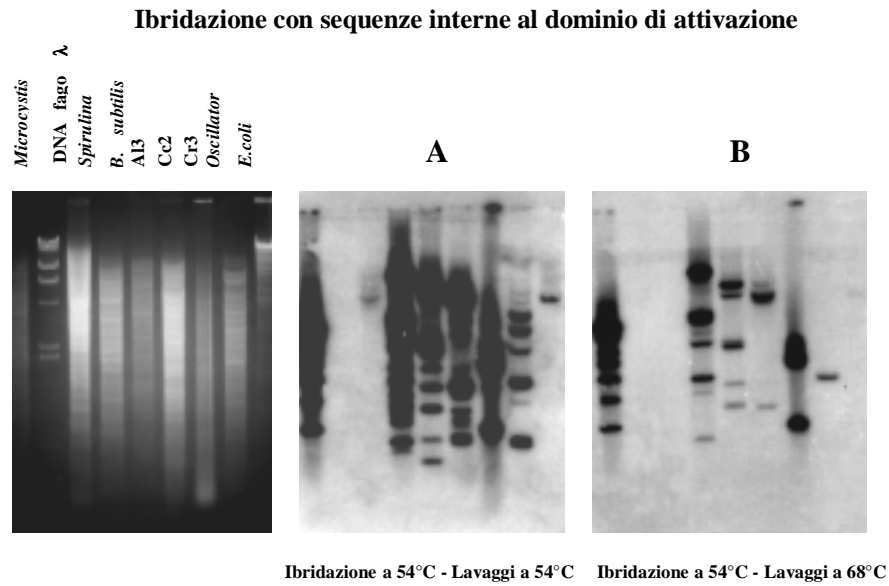


Figura 2. -Ibridazioni con una delle sonde ricavate dalla regione "dominio" su DNA appartenente a diversi ceppi batterici e cianobatterici. Lavaggi a due differenti condizioni di stringenza.

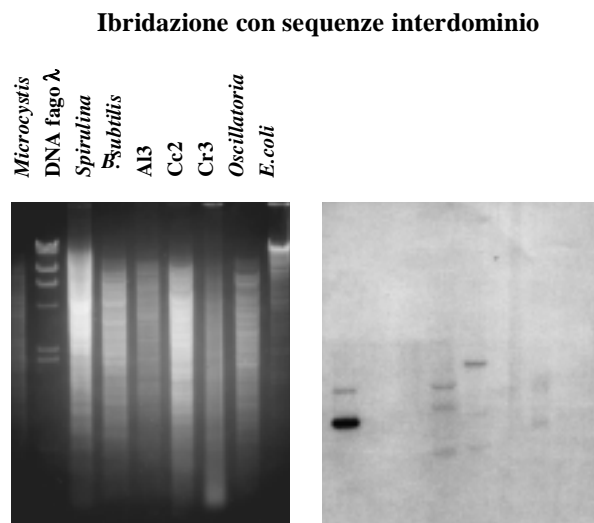


Figura 3. -Ibridazioni con sonda ricavata dalla regione "interdominio" su DNA appartenente a diversi ceppi batterici e cianobatterici. Lavaggi nella condizione meno stringente.

Il risultato relativo all'ibridazione con sequenze interne ai domini di attivazione era atteso se si considera che piccoli peptidi sono spesso prodotti dalle cellule microbiche e che sequenze omologhe si trovano anche in enzimi con diverse funzioni (ad esempio "adenilate-forming enzymes" come le acetil CoA sintetasi).

Questo indica chiaramente che sequenze all'interno delle regioni dominio non sono adatte all'uso come sonde molecolari specifiche per i ceppi produttori di microcistine.

Nelle regioni interdominio si potrebbero trovare invece sequenze utili all'identificazione dei ceppi epatotossici e caratteristiche dei singoli ceppi produttori (sequenze "firma").

Tutto questo presuppone che si conoscano bene questi geni nel maggior numero possibile di specie cianobatteriche e di ceppi produttori di microcistine e che sia ben chiara la correlazione gene/microcistina/tossicità per ognuno dei ceppi riconosciuti come tossici e capaci di produrre fioriture. Esperimenti in questa direzione sono in corso in molti laboratori.

Un altro aspetto che la conoscenza dei geni coinvolti nella sintesi delle tossine potrebbe aiutare a chiarire è la relazione che intercorre fra espressione di questi geni e condizioni ambientali, che permetterebbe di prevedere se, in determinate situazioni, ci si può aspettare una produzione di tossine da parte della fioritura.

Conclusioni

Lo studio di sonde molecolari sia di tipo non specifico che correlate alla sintesi delle tossine cianobatteriche è ancora nelle fasi preliminari in molti laboratori di ricerca che si interessano, nel mondo, al problema delle fioriture tossiche. Tuttavia già si hanno a disposizione alcuni dati relativi a geni sicuramente associati alla produzione di microcistine e si prevede che la quantità di informazioni aumenti velocemente ora che le tecniche di clonaggio e sequenziamento hanno avuto un così rapido sviluppo.

Sarà presto possibile conoscere i geni coinvolti nella sintesi di questi eptapeptidi tossici in molti ceppi e disegnare sonde per ciascuno di essi. Si tratterà poi di elaborare kit diagnostici veloci e precisi.

Naturalmente questa ricerca di sonde, che è già piuttosto avanti nel campo delle microcistine, andrà intrapresa anche per quel che riguarda le neurotossine delle quali si conosce solo il modo di azione, ma non si è studiata in modo particolareggiato la sintesi né i geni che vi sono coinvolti.

Ringraziamenti: Il lavoro è stato svolto con il contributo di ricerca del CNR n. 96.03167.CT04

Bibliografia

1. RUDI, K., LARSEN, F. & JAKOBSEN, K.S. Detection of toxin-producing cyanobacteria by use of paramagnetic beads for cell concentration and DNA purification. *Appl. Environ. Microbiol.* 1998, 64: 34-37.
2. CARMICHAEL, W.W. Cyanobacterial toxins. In Manual on harmful marine microalgae. Hallegraeff G.M., Anderson, D.M. & Cembella, A.D. (eds). Paris, UNESCO, 1995, p. 163-175.
3. RUDI, K., SKULBERG, O.M., LARSEN, F. & JAKOBSEN, K.S. Quantification of toxic cyanobacteria in water by use of competitive PCR followed by sequence-specific labeling of oligonucleotide probes. *Appl. Environ. Microbiol.* 1998, 64: 2639-2643.
4. SCHONHUBER, W., ZARDA, B., EIX, S., RIPPKA, R., HERDMAN, M., LUDWIG, W. & AMANN, R. *In situ* identification of cyanobacteria with horseradish peroxidase-labeled, rRNA-targeted oligonucleotide probes. *Appl. Environ. Microbiol.* 1999, 65: 1259-1267.
5. NEILAN, B.A., JACOBS, D. & GOODMAN, A.E. Genetic diversity and phylogeny of toxic cyanobacteria determined by DNA polymorphisms within the phycocyanin locus. *Appl. Environ. Microbiol.* 1995, 61: 3875-3883.
6. ROUHIAINEN, L., SIVONEN, K., BUIKEMA, W. J. & HASELKORN, R. Characterization of toxin-producing cyanobacteria by using an oligonucleotide probe containing a tandemly repeated heptamer. *J. Bacteriol.* 1995, 177: 6021-6026.
7. NEILAN, B.A., JACOBS, D., DEL DOT, T., BLACKALL, L.L., HAWKINS, P.R., COX, P.T. & GOODMAN, A.E. rRNA sequences and evolutionary relationships among toxic and nontoxic cyanobacteria of the genus *Microcystis*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1997, 47, 693-697.
8. OTSUKA, S., SUDA, S., LI, R., WATANABE, M., OYAIZU, H., MATSUMOTO, S. & WATANABE, M.M. Phylogenetic relationships between toxic and non-toxic strains of the genus *Microcystis* based on 16S to 23S internal transcribed spacer sequence. *FEMS Microbiol. Lett.* 1999, 172:15-21.
9. MEIßNER, K., DITTMANN, E. & BORNER, T. Toxic and non-toxic strains of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* contain sequences homologous to peptide synthetase genes. *FEMS Microbiol. Lett.* 1996, 135: 295-303.
10. DITTMANN, E., NEILAN, B.A., ERHARD, M., VON DOHREN, H. & BORNER, T. Insertional mutagenesis of a peptide synthetase gene which is responsible for hepatotoxin production in the cyanobacterium *Microcystis* PCC7806. *Mol. Microbiol.* 1997, 26: 779-787.
11. NEILAN, B.A., DITTMANN, E., ROUHIAINEN, L., BASS, R.A., SCHAUB, V., SIVONEN, K. & BORNER T. Nonribosomal peptide synthesis and toxigenicity of cyanobacteria. *J. Bacteriol.* 1999, 181: 4089-4097.

12. NISHIZAWA, T., ASAYAMA, M., FUJII, K., HARADA, K. & SHIRAI, M. Genetic analysis of the peptide synthetase genes for a cyclic heptapeptide microcystin in *Microcystis* spp. *J. Biochem.* 1999, 126: 520-529.
13. ROHRLACK, T., DITTMANN, E., HENNING, M., BORNER, T. & KOHL J-G. Role of microcystins in poisoning and food ingestion inhibition of *Daphnia galeata* caused by the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. *Appl. Environ. Microbiol.* 1999, 65: 737-739.

PROPOSTE PER LA GESTIONE DEL RISCHIO DA CIANOBATTERI TOSSICI NELLE ACQUE INTERNE ITALIANE

Maurizio Cavalieri

Laboratorio UdB, ACEA SpA, Roma

1. Introduzione

Vari modelli di gestione del rischio sono stati proposti ma la maggior parte si basano sui seguenti elementi comuni:

- la necessità di una base di informazioni su cui decidere;
- la necessità di prendere decisioni basandosi su informazioni spesso inadeguate (ad esempio, nel nostro caso, lo stato di conoscenza parziale riguardante alcune tossine cianobatteriche);
- la necessità di paragonare e valutare insieme diversi tipi di danni per la salute umana;
- la necessità di una larga comunicazione e partecipazione pubblica in tutte le fasi del processo.

Uno schema di gestione del rischio è presentato in Figura 1.

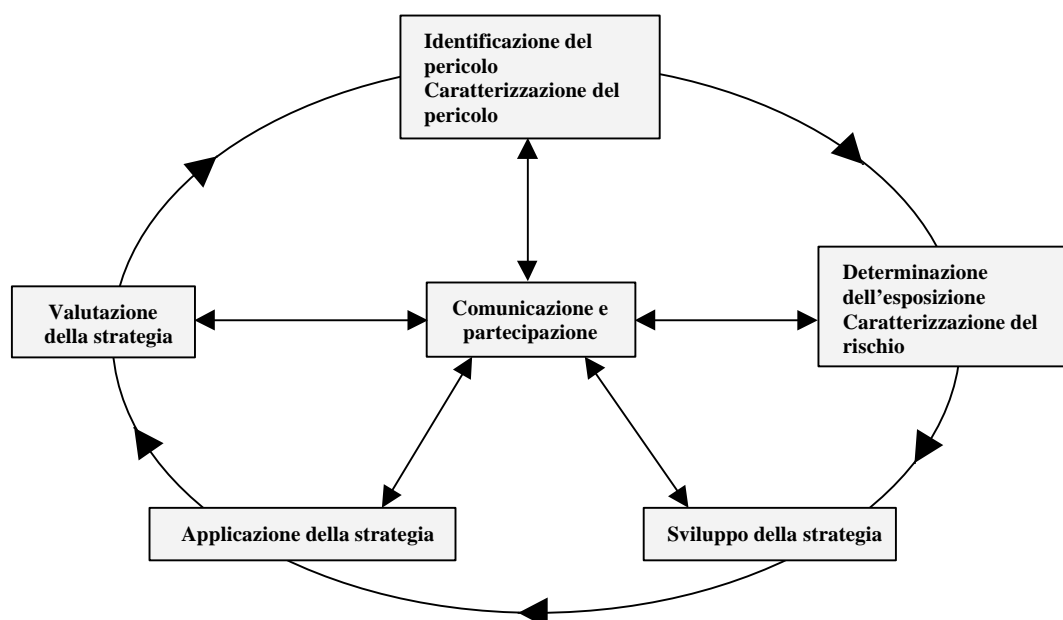


Figura 1. – Il ciclo di gestione del rischio. Adattato da OMS [1].

Nel contesto della gestione del rischio, per “pericolo” si intendono le proprietà di una sostanza (o di un’attività) che causano danno in determinate circostanze. Il termine “rischio” si riferisce alla probabilità che l’esposizione ad un pericolo conduca ad uno specifico danno per la salute umana. Esso è generalmente espresso come una frequenza in un dato tempo.

Le diverse fasi del ciclo sono brevemente descritte nel contesto della problematica dei cianobatteri:

- Identificazione del pericolo - Fase di identificazione dei danni per la salute umana (conosciuti o potenziali) associati ad un particolare agente, basandosi, ad. esempio, su studi epidemiologici e studi di tossicità su animali
- Caratterizzazione del pericolo - Fase di estrapolazione all’uomo, cioè una caratterizzazione predittiva del pericolo per l’uomo, basata su studi animali (estrapolazione da una specie all’altra) in condizione di bassa esposizione (estrapolazione da alte a basse dosi). Lo scopo è di stimare una “dose sicura”: ad esempio una TDI (Tolerable Daily Intake), se esiste una soglia nella relazione dose-effetto, oppure, ad esempio nel caso di composti carcinogeni in cui non esiste una dose soglia, quella dose che corrisponde ad un livello di rischio tollerabile o trascurabile di 1 in 1×10^5 o 1×10^6 .

Per le cianotossine, la determinazione del rischio è resa più difficile da i) una scarsità di studi epidemiologici e tossicologici scientificamente validi; da ii) una disponibilità limitata di dati animali, particolarmente nel caso di effetti cronici o a lungo termine, tant’è che l’OMS ha formulato linee guida - ed in modo preliminare - solo per la microcistina-LR [2]; da iii) incertezze sul destino ambientale di tali tossine.

- Determinazione dell’esposizione - Determinazione della probabile esposizione attraverso il consumo di acqua potabile o nuotando in un lago, conosciuti i livelli di cianotossine o cianobatteri.
- Caratterizzazione del rischio - Stima quali/quantitativa, con relative incertezze, della gravità e probabile presenza/assenza di danni alla salute, conosciuti o potenziali, in una popolazione esposta. Ad esempio, si stabiliscono i livelli di esposizione giornaliera per l’intera vita per cui il rischio è trascurabile.
- Sviluppo della politica - Esso si basa sulla conoscenza delle caratteristiche del pericolo, sulla distribuzione locale delle condizioni del pericolo, sulla determinazione della serietà degli effetti all’esposizione (paragonati con altri pericolo ed effetti), su un’analisi dei costi e dell’efficacia delle azioni.
- Applicazione della politica - Essa consiste non solo nella formulazione di una legislazione, ma anche in codici volontari, risoluzione di conflitti, strumenti economici, informazione pubblica e partecipazione.
- Comunicazione e partecipazione - nello schema è evidenziata la comunicazione come processo centrale ed a due vie.

2. Analisi della situazione in Italia

2.1 *Introduzione.* - Prima di tutto occorre capire se l'informazione esistente in Italia sulla problematica dei cianobatteri è adeguata. Spesso le evidenze epidemiologiche non sono disponibili per i) diagnosi non standardizzate o poco differenziate, per ii) una mancanza di consapevolezza delle cianotossine come causa potenziale di sintomi, per iii) una inadeguatezza dei sistemi di raccolta dati, programmi di ricerca ed analisi dell'informazione.

In questa fase sarebbe opportuno disporre delle informazioni riportate in Tabella 1.

Tabella 1. - *Tipi di informazione utili nel processo di determinazione del rischio da fioriture di cianobatteri in un particolare corpo d'acqua. Adattata da OMS [1].*

Tipo di informazione	Fonte di informazione	Opzioni per la gestione
Potenziale di formazione di fioriture	<ul style="list-style-type: none"> • Monitoraggio della qualità dell'acqua: dati fisici (temperatura, luce), chimici (fosforo, nitrati, ammoniaca, clorofilla-<i>a</i>) • Studi limnologici (mescolamento, processi di trasporto, ecc.) 	Base per una gestione di tipo preventivo
Storia di formazione di fioriture	<ul style="list-style-type: none"> • Dati storici e tradizione locale • Letteratura "grigia" • Letteratura scientifica 	Può guidare una gestione di tipo preventivo
Monitoraggio di cianobatteri e/o cianotossine	Torbidità, colore delle acque, identificazione microscopica, conteggio delle cellule ed analisi delle cianotossine	Possibile solo durante gli eventi stessi, può innescare solo azioni di tipo reattivo
Monitoraggio visuale (ricerca di schiume /fioriture)	In aree in cui l'interesse pubblico è elevato, il pubblico ed il personale non specializzato potrebbero identificare e registrare tali pericoli	Possibile solo durante gli eventi, può innescare solo azioni di tipo reattivo
Rapporti di morie di animali e malattie umane	Dati storici e informazione locale; richiede comunque un sistema di raccolta dati che spesso non esiste	Possibile solo durante gli eventi, è utile solo per una gestione di tipo reattivo
Rilevazione epidemiologica di pattern di malattia nella popolazione umana	Richiede sia un efficace sistema di raccolta dati, sia l'esistenza di effetti su larga scala perché tale rilevazione sia possibile ✘	In genere ben possibile dopo un evento Può ispirare future strategie di gestione

✘ *Finché il monitoraggio dei cianobatteri e l'analisi delle cianotossine non saranno più ampiamente adottati, sarà difficile correlare rapporti clinici con gli effetti tossici dei cianobatteri*

Nonostante la sua ampia diffusione in Italia e le possibili gravi conseguenze sanitarie ed ambientali, questo fenomeno non è stato definito nei suoi aspetti principali:

- natura e caratteristiche tossicologiche delle fioriture;
- cianotossine presenti e relative concentrazioni durante le fioriture e negli altri periodi;
- cause e fattori che lo favoriscono.

Questi limiti rendono particolarmente difficile la valutazione e la gestione del rischio nelle aree interessate.

La normativa nazionale vigente, nella sostanza, non si occupa di questo problema né in relazione alle misure per la sua prevenzione o un suo contenimento, né alla prevenzione del rischio associato all'esposizione dell'uomo con uso potabile e/o ricreativo delle acque interessate. Coloro che devono affrontare il problema nel territorio non dispongono di alcun riferimento tecnico organico.

In relazione alla situazione nazionale, sembra opportuno che sia effettuata un'attenta ricognizione dei corpi lacustri interessati da fioriture di cianobatteri. Sui corpi idrici, le cui acque vengono utilizzate per attività ricreative e soprattutto potabilizzate, dovrebbero essere condotti studi approfonditi finalizzati a:

- l'identificazione delle specie e dei ceppi che danno luogo alle fioriture;
- la caratterizzazione della tossicità delle tossine eventualmente prodotte;
- la valutazione dei livelli di esposizione;
- l'influenza dei fattori ambientali sullo sviluppo delle fioriture;
- la definizione dei sistemi di trattamento per la potabilizzazione delle acque infestate.

2.2 Acque usate per scopi potabili - Per ciò che riguarda la determinazione della situazione relativa alle acque destinate al consumo umano, sono importanti le seguenti considerazioni:

- comune (ma non sistematico ed organizzato) è il monitoraggio dei cianobatteri;
- ancor più scarsamente indagate le cianotossine;
- se popolamenti significativi di cianobatteri sono presenti nelle acque utilizzate a scopo potabile, bisognerebbe effettuare il monitoraggio delle cellule (e tossine) in punti critici del sistema;
- importante è conoscere le relazioni tra popolazioni e tipo di acque fornite (più difficile in zone rurali) ed accertarsi dell'esistenza di sistemi di trattamento e della loro efficacia nella rimozione delle cellule e delle cianotossine.

Per una rapida determinazione della sicurezza di una fonte di approvvigionamento, è opportuno considerare i seguenti punti critici:

- tipi di fonte (acque sotterranee/superficiali);
- tendenza alla formazione di bloom e presenza di cianobatteri;
- possibilità di lisi cellulare nei sistemi di trasporto e trattamento;
- sistemi di trattamento capaci di rimuovere cellule e tossine.

Per una stima del grado di protezione fornito da un sistema di approvvigionamento idropotabile, consultare il seguente diagramma di Figura 2.

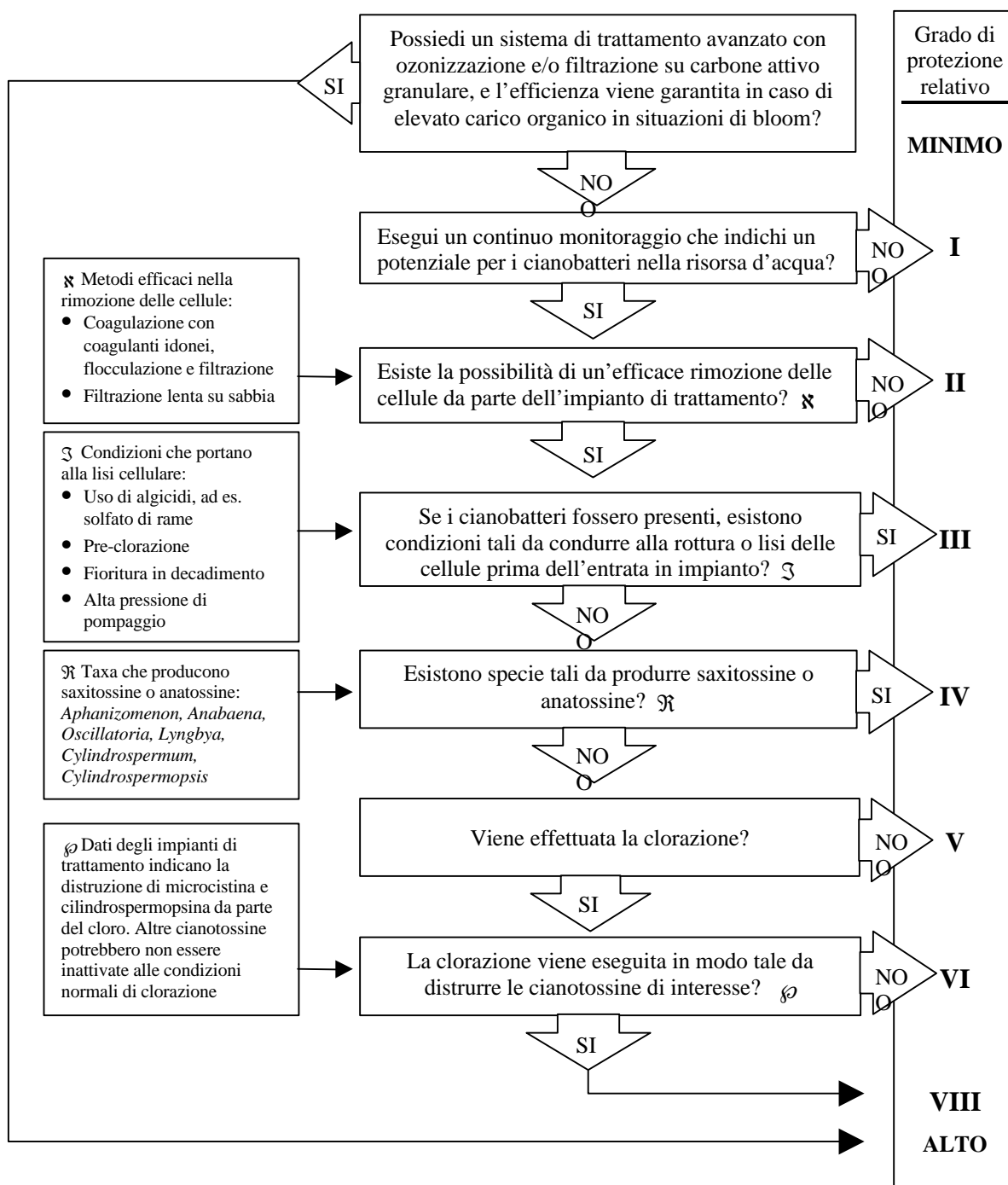


Figura 2. – Determinazione del grado di protezione fornito da un sistema di approvvigionamento idropotabile. Tale schema dovrebbe essere usato congiuntamente a ricerche più dettagliate di tipo sanitario - adattata da OMS [1].

Bartram *et al.* [1] propongono una sequenza di livelli e di relative azioni di monitoraggio e di gestione che gli operatori degli impianti ed i manager possono adottare per fornire una risposta graduata al formarsi e progredire di una fioritura di cianobatteri:

1) Livello di Vigilanza – fino ad 1 colonia di cianobatteri oppure 5 filamenti di cianobatteri per mL.

Se si ricade in tale ambito, aumentare la frequenza di campionamento ad almeno 1 volta per settimana.

2) Livello di Allerta 1 – 2.000 cellule di cianobatteri/mL o 0,2 mm/L di biovolume di cianobatteri oppure 1µg/L di clorofilla-*a* nel caso di dominanza di cianobatteri. Anche a questo livello sono possibili schiume.

Se si ricade in tale ambito, saranno necessarie le seguenti azioni:

- determinare (possibilmente basandosi su un'analisi chimica od immunochimica della concentrazione totale di tossine nell'acqua grezza) se la concentrazione di cianobatteri potenzialmente tossici può essere ridotta nella risorsa o nel sistema di trattamento;
- consultarsi con le autorità sanitarie;
- se la biomassa aumenta, estendere il monitoraggio a tutto il corpo d'acqua;
- comunicare con il pubblico;
- se sono presenti cianobatteri produttori di altre tossine oltre alle microcistine, sarà necessario intraprendere una determinazione del rischio;
- se i livelli di biomassa sono mantenuti ma le tossine o la tossicità non sono mantenute, continuare il regolare monitoraggio per accertarsi che specie tossiche non si sviluppino ulteriormente.

3) Livello di Allerta 2 – 100.000 cellule/mL o 50 µg/L di clorofilla-*a* (in caso di dominanza di cianobatteri) con la presenza di tossine confermate da tecniche chimiche o biosaggi. Con ciò si descrive una fioritura stabilita e tossica con elevata biomassa e possibile presenza di schiume. Essendo in questo caso alto il rischio se l'acqua non è trattata oppure trattata con sistemi insufficienti, sarà estremamente importante attivare un monitoraggio dell'efficienza dei sistemi di trattamento (altamente sconsigliata la chiusura dell'acquedotto).

Sarà necessario inoltre considerare la possibilità di attivare piani contingenti relativi a:

- forniture alternative di acque;
- sistemi di trattamento di emergenza;
- consegna di acque con autobotti, ecc;
- comunicazione, distribuzione di brochure, redazione di manuali, ecc.

2.3 Acque di balneazione - Nel caso della balneazione, le schiume concentrate pongono il maggior rischio per i bagnanti e, pertanto, il monitoraggio visivo è di massima importanza.

Una sorveglianza adeguata è però spesso difficile a causa della variabilità dei numerosi fattori ambientali che inducono alla rapida formazione di tali schiume e ad una loro ulteriore concentrazione (vedi Figura 3).

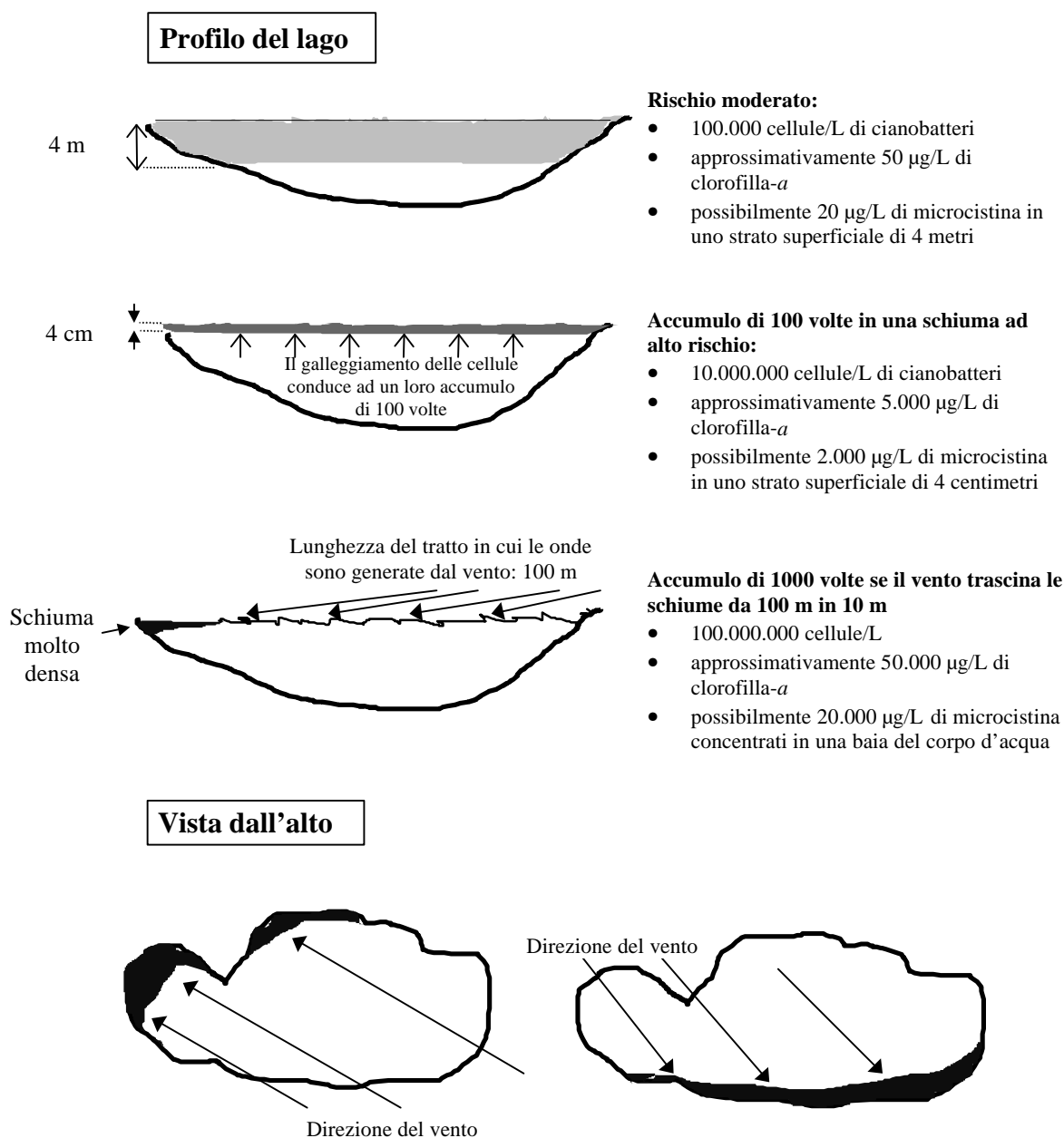


Figura 3. — *Il potenziale di formazione di schiume può cambiare il rischio di cianotossine da moderato a molto alto - adattata da OMS [3].*

Essendo inoltre scarse le opzioni di gestione (eccetto lo scoraggiamento dell'uso o la chiusura dei siti), la sicurezza del bagnante dipenderà in buona parte da un suo comportamento responsabile ed informato. In questi casi, perciò, la principale responsabilità dell'autorità consiste nella produzione e diffusione di una informazione corretta al pubblico.

Inoltre, un pubblico ben informato e capace di riconoscere le schiume potrebbe contribuire ad una migliore capacità di sorveglianza: ad esempio i nuotatori ed altri utilizzatori potrebbero contattare le autorità pubbliche in presenza di strie e/o addensamenti di colore blu-verde. In più, un pubblico ben informato acquisterebbe una migliore capacità di riconoscimento e comprensione dei sintomi causati dall'eventuale esposizione alle tossine, aumentando in tal modo le possibilità di identificarne le cause.

Nell'ambito delle attività di balneazione, i possibili danni alla salute provocati dai cianobatteri devono essere distinti tra irritazioni della pelle e malattie gastrointestinali causate da sostanze cianobatteriche sconosciute, malattie a lungo termine provocate da alcune specie di cianobatteri fino a casi di intossicazione acuta con esito letale. Pertanto, non essendo appropriato stabilire una sola lineaguida, pare opportuno definire una serie di lineeguida raggruppate in tre livelli di gravità decrescente (Tabella 2) [4].

Tabella 2. - Linee Guida OMS per una pratica sicura nella gestione di acque di balneazione che possono produrre o contenere cellule cianobatteriche [4].

Livello guida o situazione	Modo di derivazione del livello guida	Rischi per salute	Azioni raccomandate
Formazione di schiume di cianobatteri in aree di balneazione	<ul style="list-style-type: none"> • Deduzione da casi di avvelenamento di animali - vedi [5] • Casi di malattie umane - vedi [5] 	<ul style="list-style-type: none"> • Rischi di avvelenamento letale • Rischio di malattia a lungo termine con alcune specie di cianobatteri • Danni per la salute a breve termine, ad es. irritazioni della pelle, malattie gastrointestinali 	<ul style="list-style-type: none"> • Azioni immediate per prevenire il contatto con le schiume; possibilità di vietare la balneazione ed altre attività che implicano contatto con l'acqua • Sorveglianza e ricerche sullo stato di salute della popolazione • Informare le autorità competenti
100.000 cellule di cianobatteri per mL oppure 50 µg di clorofilla-a per L in caso di dominanza di cianobatteri	<ul style="list-style-type: none"> • Dedotto dalle linee guida OMS per l'acqua potabile relative alla microcistina-LR (provvisorie) [2]e da dati relativi ad altre cianotossine 	<ul style="list-style-type: none"> • Rischio di malattia a lungo termine con alcune specie di cianobatteri • Danni per la salute a breve termine, ad es. irritazioni della pelle, malattie gastrointestinali 	<ul style="list-style-type: none"> • Sorvegliare la presenza di schiume • Limitare la balneazione e proseguire le indagini • Esporre cartelli di segnalazione dei rischi • Informare le autorità competenti
20.000 cellule di cianobatteri per mL oppure 10 µg di clorofilla-a per L in caso di dominanza di cianobatteri	<ul style="list-style-type: none"> • Dedotto da studi epidemiologici sulla balneazione [6] 	<ul style="list-style-type: none"> • Danni per la salute a breve termine, ad es. irritazioni della pelle, malattie gastrointestinali 	<ul style="list-style-type: none"> • Esporre cartelli di segnalazione dei rischi • Informare le autorità competenti

Chorus [7], considerando possibile ma poco probabile un'intossicazione acuta con esito letale dovuta alle alte concentrazioni di microcistine presenti nelle schiume, pone l'accento piuttosto sulla eventualità di riportare danni epatici da microcistine a causa di ripetute esposizioni a schiume durante le attività di balneazione. Ciò in particolare nel caso di bambini che giocano continuamente in acque basse dove appunto tendono ad accumularsi le più alte concentrazioni di tossine. Per cui la protezione della salute in aree di ricreazione infestate da cianobatteri dovrebbe mirare prima di tutto al rischio di danno epatico da microcistine ed inoltre al rischio di contrarre irritazioni generalizzate del tipo descritto da Pilotto *et al.* [6].

3. Misure di prevenzione

Le misure di prevenzione rappresentano il primo e più efficace livello di gestione di questo problema. La formazione di fioriture di cianobatteri può essere evitata con misure che affrontino i fattori necessari per la loro crescita. Fattore limitante è spesso il fosfato ma in alcuni sistemi acquatici non tutto il fosfato è utilizzato perché anche luce ed azoto sono limitanti. In molti casi le macrofite acquatiche e la predazione da parte dello zooplankton possono svolgere un ruolo importante.

L'azione primaria consiste quindi nel controllo e riduzione delle immissioni di nutrienti (da fonti puntuali e diffuse) per la prevenzione delle fioriture (prevenzione dell'eutrofizzazione).

Secondariamente, altre azioni (di tipo interno) per il controllo dei nutrienti e dei cianobatteri potrebbero essere considerate: precipitazione del fosforo, rimozione dei sedimenti, rimozione di acque profonde, mescolamento artificiale, biomanipolazione, uso di algicidi.

Comunque, misure come il mescolamento artificiale (che riduce la disponibilità di luce) e la biomanipolazione possono avere successo solo in situazioni di minore trofia.

Per la pianificazione e la gestione sarà perciò necessario determinare :

- la biomassa sostenibile in base alla disponibilità di fosforo, azoto e luce;
- la biomassa di fitoplancton da attendersi a date concentrazioni di fosforo totale.

In molti corpi d'acqua, è stato osservato, infatti, che a concentrazioni di fosforo totale ben al di sotto di 50 µg/L viene ridotta la formazione delle schiume per mezzo di una sostanziale riduzione della biomassa cianobatterica.

Sarà necessario quindi procedere a:

- determinare i valori desiderabili di immissione di fosforo totale nei corpi d'acqua;
- identificare, quantificare e ridurre le immissioni esterne (dovute a dilavamento ed erosione da zone agricole fertilizzate, erosione causata da deforestazione, acque di scarico, tributari di bacini idrici).

4. Misure di rimedio

4.1 *Modalità di captazione* - Tecniche molto importanti e di rapida applicazione riguardano le modalità di captazione dell'acqua superficiale.

- Captazione diretta - la captazione dovrebbe essere effettuata in modo da evitare per quanto possibile le zone e/o le profondità del corpo idrico interessate dalle fioriture e/o dalle schiume, con i seguenti metodi: torri con prese multiple, installazione di sifoni temporanei, cortine galleggianti
- “Bank filtration” e ricarica della falda con acque superficiali – si tratta di metodi efficaci nel rimuovere particelle e molti composti disciolti in siti con favorevoli condizioni del sottosuolo [8]. La captazione avviene da fori o gallerie praticate vicino le sponde del fiume o del bacino utilizzato a scopi potabili

4.2 *Uso di algicidi* - Queste sostanze devono essere usate con estrema cautela per evitare il rilascio di tossine, ad esempio quando le densità cellulari sono ancora basse e solo dopo avere effettuato un'analisi di impatto.

4.3 *Processi di potabilizzazione* - Le cianotossine sono prodotte e contenute all'interno delle cellule cianobatteriche in crescita attiva (tossine intracellulari). Il rilascio delle tossine nell'acqua circostante (tossine disciolte) pare che avvenga soprattutto per senescenza, morte e lisi delle cellule, più che per secrezione continua. Pertanto, la sequenza dei trattamenti dovrà tendere alla rimozione sia delle tossine disciolte che delle cellule, evitando che per lisi cellulare si verifichi un considerevole rilascio di cianotossine nel mezzo. Le tossine libere nell'acqua possono essere trattenute soprattutto con carbone attivo od ossidate con agenti specifici. Il controllo frequente dell'efficacia delle varie fasi di trattamento è cruciale per assicurare la sicurezza dell'acqua distribuita.

Ecco alcune indicazioni sull'efficacia dei diversi tipi di trattamento sulla rimozione delle tossine intracellulari e disciolte (Tabella 3).

5. Criteri per l'elaborazione dei piani di monitoraggio

Un piano adeguato di monitoraggio, dovrebbe includere, secondo Codd *et al.* [9]:

- un'adeguata conoscenza dell'ecologia dei cianobatteri nel corpo idrico considerato;
- l'identificazione delle aree contaminate (in relazione ai punti di captazione di acqua per uso potabile ed alle aree utilizzate per attività ricreative);
- la valutazione delle cause del fenomeno (concentrazioni di nutrienti e ruolo di altri fattori che possono favorire la crescita dei cianobatteri);
- lo sviluppo di un programma di controllo della contaminazione da nutrienti;
- la previsione degli effetti degli interventi, inclusi i metodi di gestione dei corpi idrici e di trattamento delle acque, sui livelli di cianobatteri e di cianotossine;

Un esempio di strategia di monitoraggio è presentato in Tabella 4.

Tabella 3. - *Tipi di trattamento e loro efficacia nella rimozione delle cianotossine*

<p>Rimozione delle cellule</p> <ul style="list-style-type: none"> • Coagulazione, chiarificazione e filtrazione: efficienza di rimozione delle cellule > 90%; efficienza di rimozione delle tossine disciolte <10%. • Filtrazione lenta su sabbia: efficienza di rimozione delle cellule \cong 99% (una certa rimozione delle tossine disciolte dipende probabilmente dalla formazione di biofilm) [10]. <p>Rimozione delle tossine disciolte</p> <p>a) Ossidazione chimica</p> <ul style="list-style-type: none"> • I trattamenti di pre-ossidazione (ozono o cloro) favoriscono la coagulazione ma rischiano di provocare la lisi cellulare ed il rilascio di tossine. E' pertanto opportuno applicare basse dosi iniziali di ossidante in pre-ossidazione per migliorare la flocculazione e prevedere ulteriori fasi di trattamento per la rimozione delle tossine disciolte. • L'ozono, insieme al cloro, è molto efficace nell'ossidazione delle tossine disciolte una volta che le cellule sono state rimosse. L'ozono determina una distruzione quasi completa (> 98 %) delle microcistine, dell'anatossina-<i>a</i> e della nodularina [11, 12]. Concentrazioni di ozono > 1-2 mg/L sono efficaci per la distruzione della microcistina-LR, mentre a concentrazioni minori l'ozono degrada il DOC (Carbonio organico disciolto) ed ha scarso effetto sulla tossina [11, 13]. • Il cloro promuove una distruzione > 80 % di microcistina-LR e nodularina nelle seguenti condizioni: pH < 8, cloro libero > 0,5 mg/L, tempo di contatto > 30 minuti, basso DOC [14]. La clorazione non si è dimostrata efficace nella rimozione dell'anatossina-<i>a</i> [14]. <p>b) Adsorbimento su carbone attivo</p> <ul style="list-style-type: none"> • Il carbone attivo granulare (GAC) è in grado di rimuovere molto efficacemente le microcistine (>80%) ed ancora meglio l'anatossina-<i>a</i>, soprattutto se sul GAC si stabilisce un'attività biologica che contribuisce alla degradazione delle tossine [15]. Anche il carbone attivo in polvere (PAC) risulta efficace. Ad una concentrazione iniziale di microcistina-LR pari a 50 µg/L, un PAC ad alto volume di mesopori (concentrazione di PAC 25 mg/L, tempo di contatto 30 minuti) può ottenere una rimozione del 98 % [16]. Il grado di esaurimento e la competizione con il DOC ne riducono la capacità. In generale, per ottenere alte efficienze di rimozione, sono necessarie alte dosi di PAC ed il tempo di contatto è molto importante. • Gli impianti di trattamento convenzionali senza GAC possono rimuovere in modo soddisfacente i cianobatteri e le tossine disciolte solo se le fasi di coagulazione, chiarificazione, filtrazione e superclorazione – dechlorazione, od ozonazione si svolgono in modo efficace.
--

Tabella 4. – *Approccio strutturato e quantitativo al monitoraggio e sorveglianza dei cianobatteri tossici e del loro potenziale di crescita - adattata da OMS [9].*

<p>1) Ispezione visiva: se la trasparenza è inferiore a 2 metri, l'acqua è colorata o torbida, si dovrebbe procedere alla fase 2; se il colore o la presenza di schiume indicano chiaramente la presenza massiva di cianobatteri, allora si dovrebbe procedere alla fase 2 ed immediatamente anche alla fase 3.</p> <p>2) Monitoraggio del fosforo totale: se la concentrazione di fosforo è inferiore a 10-20 µg P/L, è improbabile che si tratti di sviluppi di masse di cianobatteri e la scarsa trasparenza può avere altre cause. Se la concentrazione di fosforo è più alta, allora si dovrebbe:</p> <ol style="list-style-type: none"> procedere alla fase 3 Monitoraggio dei cianobatteri; considerare la possibilità di monitorare altri nutrienti e condizioni idrologiche; indagare sulle cause del fenomeno. <p>3) Monitoraggio dello sviluppo della massa di cianobatteri: se i livelli di cianobatteri superano i valori di allerta per l'acqua potabile e le acque di balneazione, si dovrebbe:</p> <ol style="list-style-type: none"> avviare le misure necessarie per proteggere la salute della popolazione potenzialmente coinvolta; intensificare le attività di monitoraggio (settimanale o più frequente); passare alla fase 4 Monitoraggio delle cianotossine; raccogliere ulteriori informazioni (dati storici, osservazioni su casi di avvelenamento di animali, ecc.). <p>4) Monitoraggio del contenuto di tossine dei cianobatteri. Se i livelli di tossine superano le linee guida per l'uso potabile e/o per la balneazione, confermare e rafforzare i provvedimenti già avviati (vedi 3a) per la protezione della salute delle popolazioni coinvolte.</p>
--

Un esempio di procedura di monitoraggio messa a punto in Germania adattandola alla propria realtà [8] per la protezione dei bagnanti dall'esposizione a cianotossine, è presentata in Figura 4.

Durante elaborazione di un piano di monitoraggio, estrema importanza riveste la scelta dei siti di campionamento. In questo caso, dovranno essere perciò considerati i punti e le concentrazioni potenziali dei cianobatteri nel corpo d'acqua, come in Figura 5.

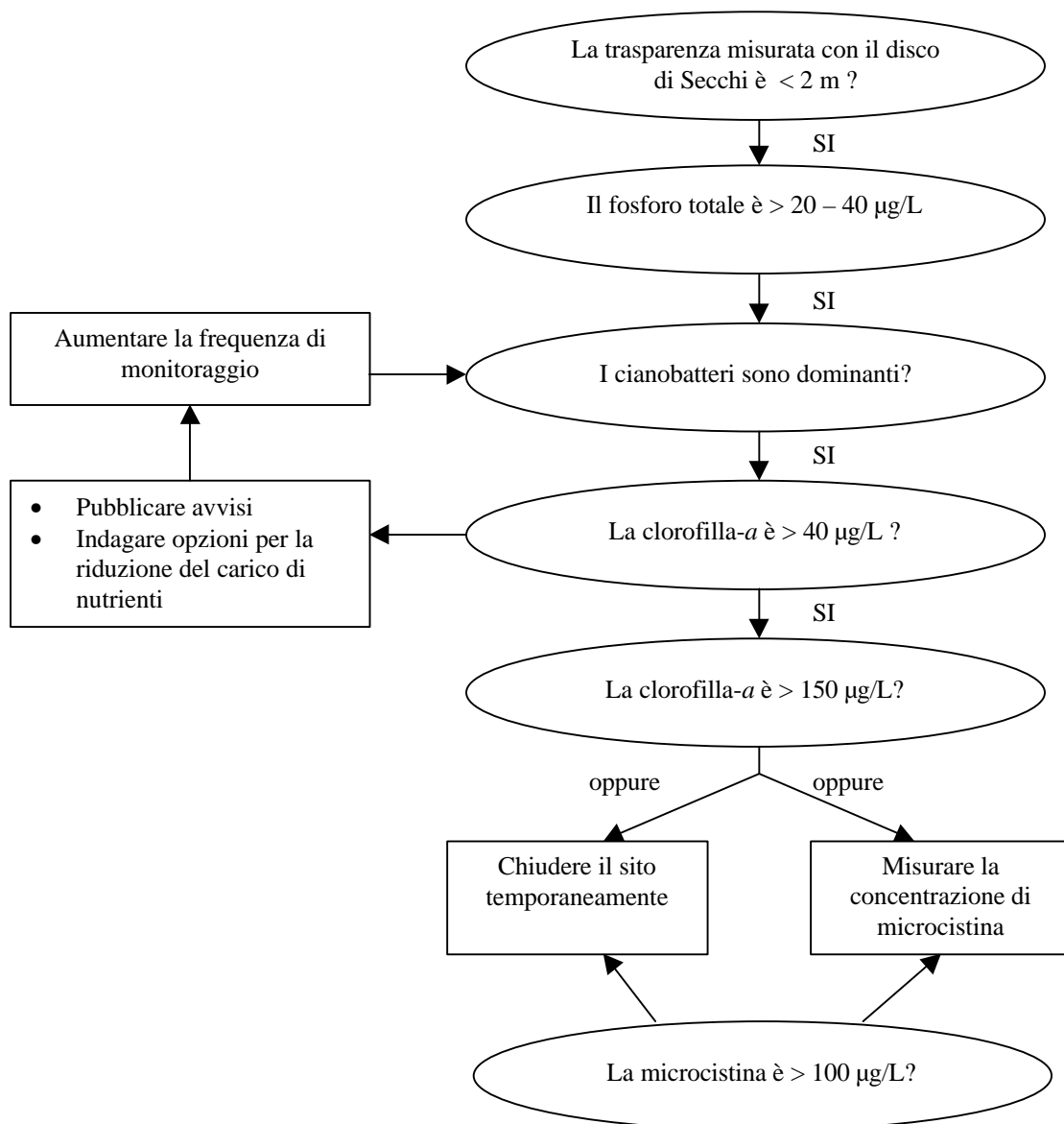


Figura 4. - Approccio strutturato per la protezione dei bagnanti da cianobatteri tossici in Germania, basato sulla Direttiva Europea sulle acque di balneazione con frequenza di campionamento bisettimanale.

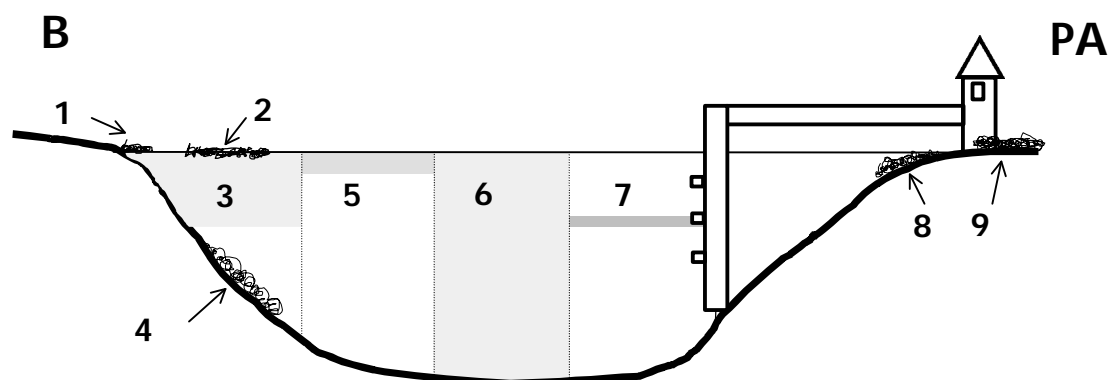


Figura 5. – Alcune zone in cui i cianobatteri possono essere presenti in laghi termicamente stratificati - adattata da OMS [9].

B, Area di balneazione; PA, punto di adduzione; 1, schiuma lungo la riva (spesso in decomposizione); 2, schiuma in acque aperte in condizioni di calma; 3, cianobatteri dispersi nell'epilimnio; 4, cianobatteri planctonici sul sedimento; 5, strato mescolato superficiale; 6, colonna interamente mescolata; 7, massimo profondo di cianobatteri (non evidente dalla superficie); 8, masse di cianobatteri bentonici su sedimenti in acque basse; 9, accumuli di cianobatteri bentonici ormai distaccatisi.

6. Consapevolezza, partecipazione del pubblico e comunicazione

Come già detto in precedenza, è essenziale che il pubblico sia ben informato e cosciente dei rischi potenziali legati alle fioriture di cianobatteri tossici. Le seguenti azioni, perciò, rivestono un ruolo determinante:

- E' opportuno elaborare appositi opuscoli, video, ecc. per informare il pubblico in generale o particolari gruppi di utenti;
- Quando i popolamenti di cianobatteri superano determinati limiti, avvertimenti pubblici dovrebbero essere forniti (ad esempio su giornali, radio e televisione) in relazione alle diverse situazioni di bloom e ai diversi usi del corpo d'acqua;
- In occasione delle fioriture nelle zone di accesso ai corpi d'acqua dovrebbero essere esposti cartelli informativi e di pericolo. I segnali dovrebbero poi venire rimossi quando le condizioni lo permettono;
- La consapevolezza e la partecipazione sono estremamente importanti in ambienti con fioriture occasionali, dove:
 1. la protezione della salute deve, in certa misura, affidarsi al giudizio personale;
 2. a causa della loro rapida comparsa/scomparsa, le fioriture e le schiume potrebbero non essere rilevate in tempo dalle autorità.

Bibliografia

1. BARTRAM, J., BURCH, M., FALCONER, I., JONES, G., KUIPER-GOODMAN, T. Situation assessment, planning and management. In *Toxic Cyanobacteria in Water: A Guide to their Public Health Consequences, Monitoring and Management*. J. Bartram & I. Chorus (Eds.) London, New York: Published on behalf of WHO by E&FN Spon, 1999, p.179-209.
2. WHO 1998 Guidelines for Drinking-water Quality. Second edition, Addendum to Volume 2, Health Criteria and Other Supporting Information. World Health Organization, Geneva.
3. FALCONER, I., BARTRAM, J., CHORUS, I., KUIPER-GOODMAN, T., UTKILEN, H., BURCH, M., CODD, J. Safe levels and safe practices. In *Toxic Cyanobacteria in Water: A Guide to their Public Health Consequences, Monitoring and Management*. J. Bartram & I. Chorus (Eds.) London, New York: Published on behalf of WHO by E&FN Spon, 1999, p.155-178.
4. WHO 1998. Guidelines for Safe Recreational Water Environments: Coastal and Fresh Waters (draft EOS-draft-98.14). World Health Organization, Geneva
5. KUIPER-GOODMAN, T., FALCONER, I., FITZGERALD, J. Human Health Aspects. In *Toxic Cyanobacteria in Water: A Guide to their Public Health Consequences, Monitoring and Management*. J. Bartram & I. Chorus (Eds.) London, New York: Published on behalf of WHO by E&FN Spon, 1999, p.113-153.
6. PILOTTO, L.S., DOUGLAS, R.M., BURCH, M.D., CAMERON, S., BEERS, M., ROUCH, G.R., ROBINSON, P., KIRK, M., COWIE, C.T., HARDIMAN, S., MOORE, C., ATTEWELL R.G. 1997. Health effects of recreational exposure to cyanobacteria (blue-green algae) during recreational water-related activities. *Aust. N. Zealand J. Public Health* 21: 562-566.
7. CHORUS, I. Comunicazione personale.
8. CHORUS I., KLEIN, G., FASTNER, J., ROTARD, W. 1993 Off-flavors in surface waters, how efficient is bank filtration for their abatement in drinking water? *Wat. Sci. Technol.* 25(2): 251-258.
9. CODD, J., CHORUS, I., BURCH, M. Design of monitoring programmes. In: *Toxic Cyanobacteria in Water: A Guide to their Public Health Consequences, Monitoring and Management*. J. Bartram & I. Chorus (Eds.) London, New York: Published on behalf of WHO by E&FN Spon, 1999, p.313-328.
10. MOUCHET, P. & BONNÉLYE, V. 1998. Solving algae problems: French expertise and world-wide applications. *J. Water SRT, Aqua* 47: 125-141.
11. HART, J., FAWELL, J.K., CROLL, B. The fate of both intra and extracellular toxins during drinking water treatment. IWSA World Congress, Blackwell Science, Oxford 1997 (Special subject No: 18, SS1816).
12. ROSITANO, J., NICHOLSON, B.C., PIERONNE, P. Destruction of cyanobacterial toxins by ozone. In: Proceedings of the First Australasian Conference of the International Ozone Association, Sydney, Australia, 1996.
13. ROSITANO, J. & NICHOLSON, B.C. Water Treatment Techniques for Removal of Cyanobacterial Toxins from Water. Australian Centre for Water Quality Research. Salisbury, South Australia, 1994.

14. NICHOLSON, B.C., ROSITANO, J., BURCH, M.D. 1994. Destruction of cyanobacterial peptide hepatotoxins by chlorine and chloramine. *Wat. Res.* 28: 1297-1303.
15. CARLILE, P.R. Further studies to Investigate Microcystin-LR and Anatoxin-a removal from water. Foundation for Water Research, Marlow, UK, 1994 (Report No 0458).
16. DONATI, C.D., DRIKAS, M., HAYES, R., NEWCOMBE, G. 1993. Adsorption of microcystin-LR by powdered activated carbon. *Wat. J. AWWA* 20(suppl 3): 25-28

USO DELLE TECNICHE DI TELERILEVAMENTO

Giorgio Catena

Laboratorio di Igiene Ambientale, Istituto Superiore di Sanità, Roma

Le tecniche di Telerilevamento, soprattutto da bordo di satelliti, hanno assunto un'importanza crescente nello studio delle condizioni ambientali grazie alle caratteristiche della piattaforma satellitare (economicità, ripetitività nel tempo, ripresa quasi contemporanea di grandi estensioni di territorio, ecc.) ed alla varietà di immagini che è in grado di fornire (visibili, multispettrali, termiche, radar, ecc.). Queste tecniche sono sempre più usate anche nello studio delle acque, sia marine che interne [1, 2], permettendo la determinazione della qualità e l'individuazione di fonti d'inquinamento ed alla difesa in caso di presenza di inquinanti di qualsiasi natura.

Le immagini, sia visibili che termiche, ottenibili dai satelliti finora in orbita, sono anche utilizzate nello studio delle fioriture algali (inclusi cianobatteri e fitoplancton [3-5]) sia in mare che nelle acque interne, a causa dell'espansione del fenomeno in quasi tutti gli angoli del pianeta e date le sue ripercussioni sull'ambiente (e quindi sull'uomo). Queste fioriture, infatti, possono provocare, direttamente o più spesso a causa delle tossine che producono, la morte di animali marini, la distruzione degli impianti di ittiocoltura presenti e l'insorgenza di malattie di vario tipo e gravità nell'uomo, dovute al consumo di prodotti ittici inquinati o all'uso, per scopo potabile o ricreativo, delle acque interessate dal fenomeno. L'individuazione precoce delle fioriture, il controllo nel tempo del loro andamento e la previsione dei loro spostamenti (noto l'andamento dei venti e delle correnti predominanti nella zona di interesse) forniscono informazioni vitali per attenuare l'impatto (sanitario ed economico) di questo fenomeno che negli ultimi anni sta conoscendo una diffusione spazio - temporale mai raggiunta in precedenza. Le immagini usate sono quelle visibili, a colori, e quelle termiche che, rilevando la differente temperatura esistente tra le acque dove è presente la fioritura e quelle ancora indenni, permettono di individuare la presenza e l'estensione del fenomeno.

E' ovvio che, data la bassa risoluzione delle immagini finora disponibili (10-30 m e 1 km per quelle visibili e 60 m-1 km per quelle termiche - a seconda del satellite) esse possono essere usate con profitto solo per aree di studio molto ampie mentre, ad esempio, sono inutilizzabili per gran parte dei bacini di captazione di acqua potabile presenti sul territorio italiano, i quali presentano pure problemi rilevanti per quanto riguarda le fioriture di cianobatteri (si vedano, a tale proposito, gli altri articoli del Rapporto).

Cominciano però ad essere finalmente disponibili (dal marzo del 2000) delle immagini visibili di risoluzione eccezionale per riprese satellitari destinate ad usi civili (1 m per quelle in bianco e nero e 4 m per quelle a colori) che, anche ad un costo relativamente basso (circa 5-6 milioni di lire per una scena di 121 km²), possono essere

scaricate direttamente da Internet nel proprio computer dove possono essere esaminate e gestite (con programmi appositi, di facile apprendimento e di basso costo, 3-6 milioni di lire) a proprio piacimento.

E' di recente apparso sul mercato un termografo portatile, poco più grande di una telecamera amatoriale, in grado di rilevare differenze di temperatura superficiale con una sensibilità di 0,1 °C, con il quale è possibile seguire, da bordo di un elicottero ad esempio, l'andamento nel tempo di una fioritura algale onde poter intervenire con tempestività per salvaguardare le opere di captazione delle acque per uso potabile, gli impianti di ittiocoltura e quant'altro presente nelle acque dei bacini interessati.

Questo strumento è stato di recente usato in uno studio sui movimenti delle masse d'acqua nella Laguna di Orbetello nel corso del quale ha anche messo in luce la presenza di una fioritura batterica e la sua distribuzione all'interno del bacino.

I risultati di questo studio saranno presto inviati per la pubblicazione ad una rivista scientifica internazionale.

Bibliografia

1. CATENA, G. Uso di uno scanner termico per lo studio del tratto di mare antistante la tenuta di San Rossore (PI). *Linea Ecologica* 1994, 5: 26-32.
2. CATENA, G., PALLA., L. Remote sensing techniques complementary to chemical and microbiological determinations in coastal water studies. In: *V^{es} journées d'études sur les pollutions marines en Méditerranée*, CIESM-UNEP, Cagliari: 1980. p. 959-962
3. ANDERSON, D.M. Toxic red tides and harmful algal blooms: a practical challenge in coastal oceanography. *Reviews of Geophysics, Supplement* 1995, july: 1189-1200
4. KAHRU, M. Using satellites to monitor large-scale environmental change: a case study of cyanobacteria blooms in the Baltic sea. In *Monitoring algal blooms. New techniques for detecting large-scale environmental change*. M. Kahru, C.W. Brown (Eds). Berlin: Springer, 1997, 178 p.
5. KONONEN, K., LEPPÄNEN, J.-M. Patchiness, scales and controlling mechanisms of cyanobacterial blooms in the Baltic sea: application of a multiscale research strategy. In *Monitoring algal blooms. New techniques for detecting large-scale environmental change*. M. Kahru, C.W. Brown (Eds). Berlin: Springer, 1997, 178 p.

BLOOM DI CIANOBATTERI NEI LAGHI SICILIANI

Rossella Barone e Luigi Naselli Flores

Dipartimento di Scienze Botaniche, Università di Palermo

Introduzione e problematica

Nelle ultime due decadi è stata rilevata con maggiore frequenza la comparsa di bloom algali dannosi (HABs), probabilmente in relazione alla crescente antropizzazione del territorio [1]. L' "inquinamento biologico" causato da HABs è particolarmente problematico perché, a differenza dell'inquinamento chimico ha il potenziale di riprodursi e pertanto di aumentare in intensità ed incidenza.

La produzione di tossine da parte di Cianobatteri è oggi un fenomeno globale [2]. Come recentemente proposto dall'OMS [3] il verificarsi di bloom a Cianobatteri in acque superficiali destinate ad uso potabile e/o ricreazionale rappresenta un serio problema per la salute umana. Infatti, secondo la specie responsabile dei bloom, può realizzarsi lo sviluppo di ceppi produttori di cianotossine.

La Sicilia, soggetta ad un clima semiarido, ricade nell'ambito delle aree geografiche in cui l'utilizzo delle acque sotterranee è limitato e, pertanto, l'approvvigionamento idrico è in gran parte basato sull'uso di acque invase in laghi artificiali. Ne consegue la necessità di efficaci controlli e di eventuali interventi gestionali, mirati essenzialmente all'ottimizzazione della qualità delle acque in funzione del loro uso, in prevalenza irriguo e potabile.

Fra le numerose problematiche connesse alla qualità delle acque superficiali insulari, quella relativa all'eventuale verificarsi di bloom a Cianobatteri tossici risulta del tutto trascurata. Peraltro, nell'ambito di una serie di indagini limnologiche condotte dal 1979 ad oggi [4] è stato possibile:

- accertare la presenza, in alcuni laghi, di specie potenzialmente tossiche;
- evidenziare, in alcuni invasi, il verificarsi di bloom e seguirne la dinamica di sviluppo;
- ipotizzare quali fattori abbiano maggiormente influenzato l'insorgere e l'evolversi dei fenomeni.

Distribuzione dei cianobatteri nei laghi

I corpi idrici siciliani soggetti ad indagini limnologiche comprensive di analisi fitoplanctonica sono 32 (Figura 1). Nella maggior parte dei laghi (25) è stato effettuato uno studio annuale con prelievi stagionali [5]. In 7 invasi sono state compiute indagini più approfondite con frequenza di campionamento mensile [6-11] o settimanale [12].

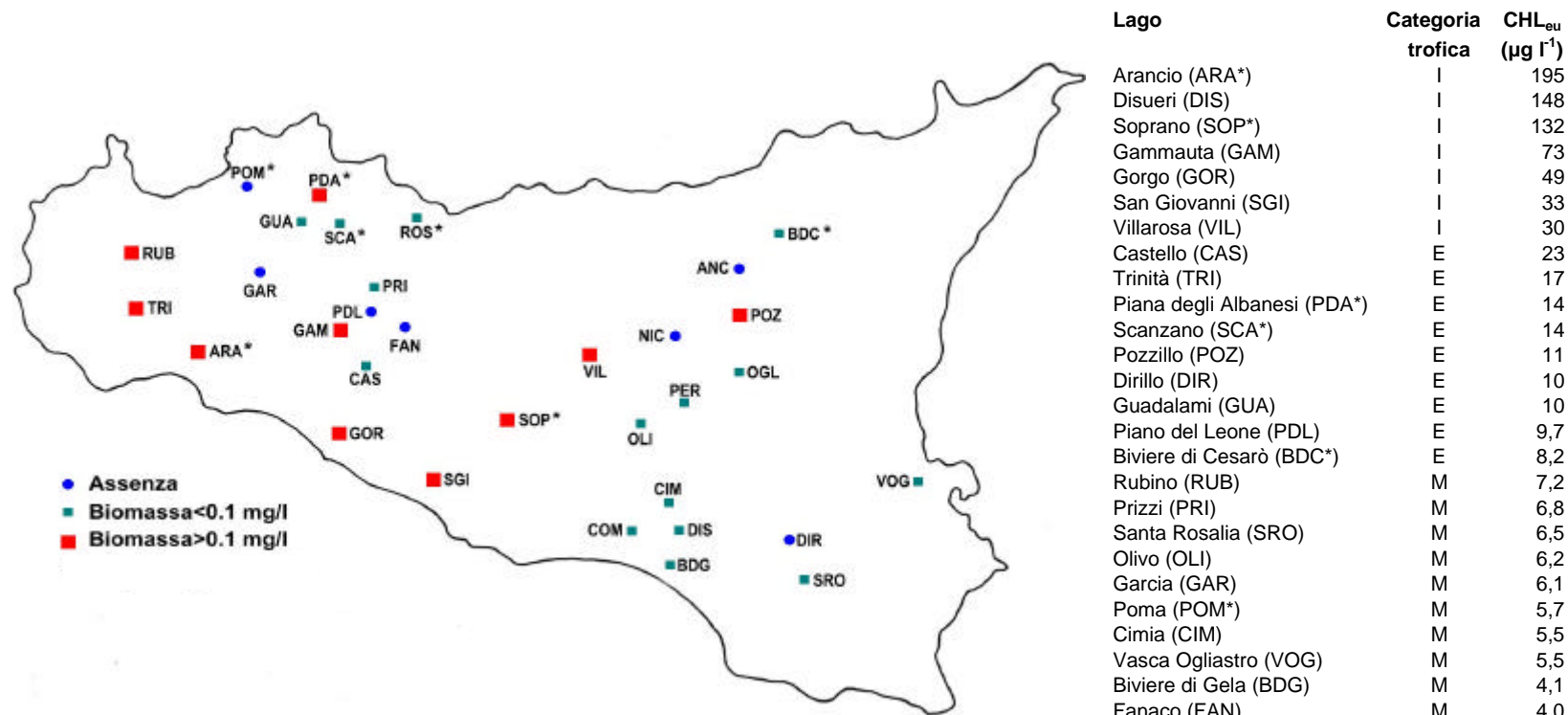


Figura 1. - Distribuzione dei Cianobatteri nei laghi siciliani e scala trofica degli invasi
 I=Ipertrofia; E=Eutrofia; M=Mesotrofia; O=Oligotrofia; U-O=Ultraoligotrofia
 *=indagini approfondite

Nel 22% dei laghi i Cianobatteri sono assenti, nel 47% la loro biomassa è $< 0.1 \text{ mg l}^{-1}$, e nel 31 % superiore a tale valore. In figura 1 è riportata la scala trofica dei laghi esaminati, basata sulle concentrazioni medie annuali di clorofilla *a* [5] adottando le categorie trofiche proposte dall'OCDE [13]. In particolare, il 22 % degli invasi manifesta condizioni ipertrofiche, il 28 % eutrofiche, il 38 % mesotrofiche ed il 6 % oligotrofiche ed ultraoligotrofiche.

I Cianobatteri, in accordo con i dati riportati in letteratura [14], evidenziano comunemente una biomassa maggiore nei laghi più eutrofici.

Nel complesso sono stati identificati 28 *taxa* (Tabella 1). I generi più comuni sono *Anabaena*, *Anabaenopsis*, *Microcystis* e *Planktothrix*. Ceppi di specie ascritte a questi generi possono manifestare produzione di cianotossine [3].

Adottando la suddivisione dei Cianobatteri in gruppi caratterizzati da differenti ecostrategie [3], nei laghi siciliani sono più comuni le ecostrategie che formano schiume (*e. g. Anabaena*, *Microcystis*), le fissatrici di N (*e. g. Anabaena*, *Anabaenopsis*), e le ecostrategie omogeneamente disperse (*e. g. Planktothrix*). In particolare le ecostrategie che formano schiume sono caratterizzate dalla capacità di migrare verticalmente, peculiarità adattativa in ambienti dove si manifesta un elevato rapporto fra zona di mescolamento e zona eufotica ($Z_{\text{mix}}/Z_{\text{eu}}$). Le ecostrategie fissatrici di N sono in grado di fissare l'N atmosferico disciolto in ambienti dove si manifestano basse concentrazioni dell'elemento. Le ecostrategie omogeneamente disperse caratterizzano comunemente laghi poco profondi eutrofici ed ipertrofici.

Nella maggior parte dei casi i laghi siciliani evidenziano queste caratteristiche e, pertanto, soprattutto nella stagione estiva, sono suscettibili ad un eventuale manifestarsi di bloom tossici.

Caratterizzazione dei bloom e principali fattori implicati nel loro sviluppo

Fra i 10 laghi che hanno manifestato una biomassa di Cianobatteri $> 0.1 \text{ mg l}^{-1}$, in 8 sono stati rilevati, prevalentemente nei mesi estivi, bloom potenzialmente tossici (Tabella 2). Di particolare rilievo è l'utilizzo a scopo potabile del lago di Piana degli Albanesi e l'uso ricreativo del lago Arancio. Quest'ultimo bacino artificiale è stato oggetto di studi approfonditi con prelievi settimanali nell'arco di 3 anni [15, 16]. Nel 1990, in tarda estate, si sono verificate fioriture a *Microcystis aeruginosa* e *Microcystis wesenbergii* che hanno, rispettivamente, raggiunto densità pari a 109 e 15×10^6 cellule l^{-1} (Figura 2). L'anno successivo, nei mesi di Agosto e Settembre, è stata osservata un bloom ad *Anabaena solitaria* f. *smithii* (34×10^6 cellule l^{-1}). La stessa specie ha evidenziato una fioritura (38×10^6 cellule l^{-1}) nella primavera del 1993 ed una densità significativa durante il periodo estivo. Da un punto di vista morfometrico il lago, nell'estate del 1990, ha manifestato una profondità media $< 3 \text{ m}$ con stratificazioni giornaliere, condizioni che favoriscono lo sviluppo di specie ascrivibili al genere coccale coloniale *Microcystis* [14]. Gli altri anni il volume si è mantenuto più elevato ed ha dominato la specie tricomatosa *Anabaena solitaria* f. *smithii*, ecostratega capace di migrazioni verticali, come la precedente, e di fissazione di N.

Tabella 1. - Distribuzione dei taxa nei laghi

LAGO	ANAAPH	ANANOD	ANASOP	ANASOS	ANASPI	ANASPC	ANASPP	ANBELE	ANBELC	APCSP	APHSP	CHR	COEKUE	LIMSP	LYNSPP	MERSPP	MICAER	MICFLO	MICWES	MICSPP	OSCSPP	OSC	PHOSP	PLAAGA	PLASPP	PSESP	RAPMED	SPISP	WORNAE				
ARA*	x			x		x	x						x				x		x			x				x	x		x				
DIS												x										x											
SOP*								x		x								x			x	x											
GAM				x		x					x																						
GOR							x		x													x											
SGI							x		x												x	x		x									
VIL												x									x												
CAS																																	
TRI														x																			
PDA*			x			x		x									x						x										
SCA*					x		x														x	x											
POZ		x																			x	x											
GUA			x			x						x										x											
BDC*																					x												
RUB							x															x											
PRI								x																									
SRO							x																x										
OLI		x																															
CIM																	x																
VOG							x														x												
BDG																					x												
ROS*											x																						
OGL																						x											
PER												x										x											
COM																								x									

Nomi dei cianobatteri

ANAAPH	=	<i>Anabaena aphanizomenoides</i>
ANANOD	=	<i>Anabaena nodularioides</i>
ANASOP	=	<i>Anabaena solitaria</i> f. <i>planctonica</i>
ANASOS	=	<i>Anabaena solitaria</i> f. <i>smithii</i>
ANASPI	=	<i>Anabaena spiroides</i>
ANASPC	=	<i>Anabaena spiroides</i> f. <i>crassa</i>
ANASPP	=	<i>Anabaena</i> spp.
ANBELE	=	<i>Anabaenopsis elenkinii</i>
ANBELC	=	<i>Anabaenopsis elenkinii</i> f. <i>circularis</i>
APCSP	=	<i>Aphanotece</i> sp.
APHSP	=	<i>Aphanizomenon</i> sp.
CHR	=	Chroococcales
COEKUE	=	<i>Coelosphaerium kuetzingianum</i>
LIMSP	=	<i>Limnothrix</i> sp.
LYNSPP	=	<i>Lyngbya</i> spp.
MERSPP	=	<i>Merismopedia</i> spp.
MICAER	=	<i>Microcystis aeruginosa</i>
MICFLO	=	<i>Microcystis flos aquae</i>
MICWES	=	<i>Microcystis wesenbergii</i>
MICSPP	=	<i>Microcystis</i> spp.
OSCSPP	=	<i>Oscillatoria</i> spp.
OSC	=	Oscillatoriales
PHOSP	=	<i>Phormidium</i> sp.
PLAAGA	=	<i>Planktothrix agardhii</i>
PLASPP	=	<i>Planktothrix</i> sp.
PSESP	=	<i>Pseudoanabaena</i> sp.
RAPMED	=	<i>Raphidiopsis mediterranea</i>
SPISP	=	<i>Spirulina</i> sp.
WORNAE	=	<i>Woronichinia naegeliana</i>

Sigle dei Laghi

ARA*	=	Arancio
DIS	=	Disueri
SOP*	=	Soprano
GAM	=	Gammauta
GOR	=	Gorgo
SGI	=	San Giovanni
VIL	=	Villarosa
CAS	=	Castello
TRI	=	Trinità
PDA*	=	Piana degli Albanesi
SCA*	=	Scanzano
POZ	=	Pozzillo
GUA	=	Guadalami
BDC*	=	Biviere di Cesarò
RUB	=	Rubino
PRI	=	Prizzi
SRO	=	Santa Rosalia
OLI	=	Olivo
CIM	=	Cimia
VOG	=	Vasca Ogliastro
BDG	=	Biviere di Gela
ROS*	=	Rosamarina
OGL	=	Ogliastro
PER	=	Pergusa
COM	=	Comunelli

* = Indagini approfondite

Tabella 2. - Laghi interessati da bloom

Lago	Specie	10 ⁶ cellule l ⁻¹
Arancio*	<i>Microcystis aeruginosa</i>	109
	<i>Anabaena solitaria f. planctonica</i>	38
	<i>Planktothrix agardhii</i>	17
	<i>Microcystis wesenbergii</i>	15
Gammauta	<i>Anabaena solitaria f. smithii</i>	10
Piana degli Albanesi*	<i>Anabaena spiroides f. crassa</i>	28
	<i>Microcystis aeruginosa</i>	15
	<i>Anabaena solitaria f. planctonica</i>	13
Rubino	<i>Anabaena spp.</i>	21
San Giovanni	<i>Planktothrix agardhii</i>	79
Soprano*	<i>Anabaenopsis elenkinii f. circularis</i>	57
Trinità	<i>Planktothrix agardhii</i>	14
Villarosa	<i>Microcystis spp.</i>	11

*=Indagini approfondite

Queste osservazioni lasciano ipotizzare l'importanza del ciclo idrologico nel determinare la composizione e la dinamica delle comunità fitoplanctoniche nei bacini artificiali siciliani.

Un modello di successione stagionale, ottenuto mediante analisi multivariata (CCA) ha confermato questa ipotesi [17]. Il ciclo idrologico ed il rapporto Z_{mix}/Z_{eu} sono stati identificati come i fattori responsabili della maggiore percentuale di varianza nel sistema (Figura 3). In particolare, è possibile evidenziare che il significativo prelievo estivo di acqua riduce notevolmente il volume invasato e, di conseguenza, la profondità. Questo fenomeno si traduce nell'impossibilità, da parte dei corpi idrici, di mantenere un termoclino stabile e quindi un'anticipata perdita della stratificazione termica. Le conseguenze di questa anticipata rottura del termoclino possono essere:

- la reimmissione in circolo di una quantità di nutrienti tale da promuovere la crescita del fitoplancton;
- l'alterazione delle condizioni luminose subacquee del corpo idrico che, in particolare, determina un incremento del rapporto fra la zona di mescolamento e la zona eufotica.

Entrambi questi fattori favoriscono lo sviluppo di Cianobatteri [17]. Infatti, questi organismi sono in grado di regolare attivamente la loro capacità di galleggiamento e spesso risultano competitivamente avvantaggiati, rispetto ad altri organismi fitoplanctonici, a vivere in laghi otticamente profondi.

Inoltre, essendo organismi coloniali, come *Microcystis*, o tricomatosi, come *Anabaena*, sono in grado di ottimizzare le loro dimensioni in relazione alle condizioni idroclimatiche [11]. Ne deriva che anche i bacini artificiali mesotrofici possono essere potenziali sedi di bloom a Cianobatteri durante la stagione estiva.

Diventa pertanto di primaria importanza al fine di ridurre eventuali rischi di contaminazione da cianotossine, l'attuazione di un monitoraggio limnologico mirato essenzialmente al rilevamento dei Cianobatteri.

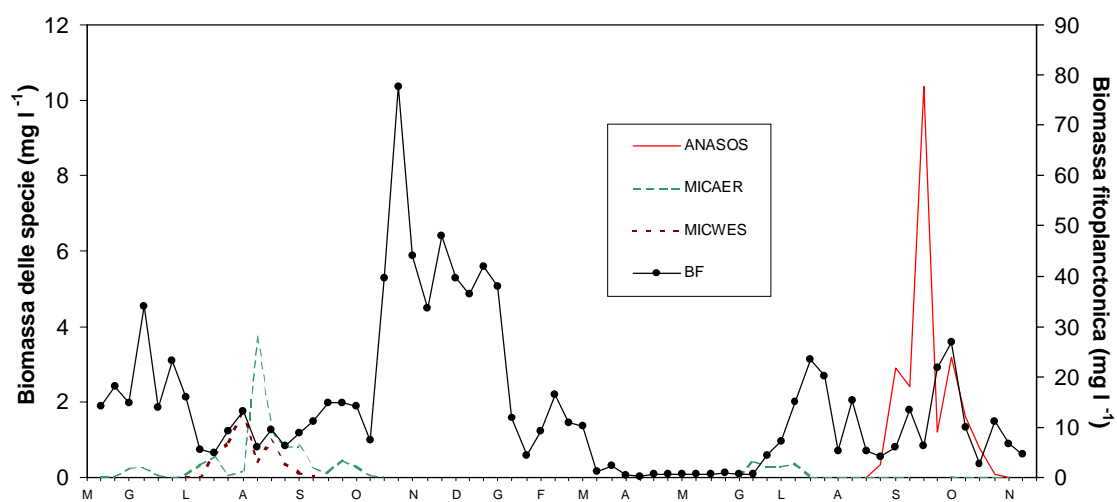
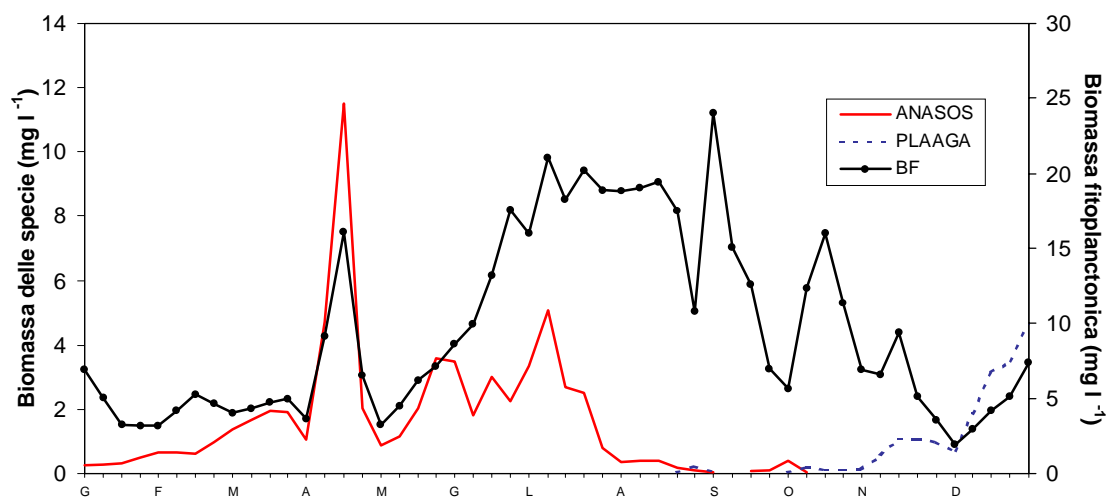


Figura 2. - Distribuzione stagionale dei Cianobatteri nel lago Arancio

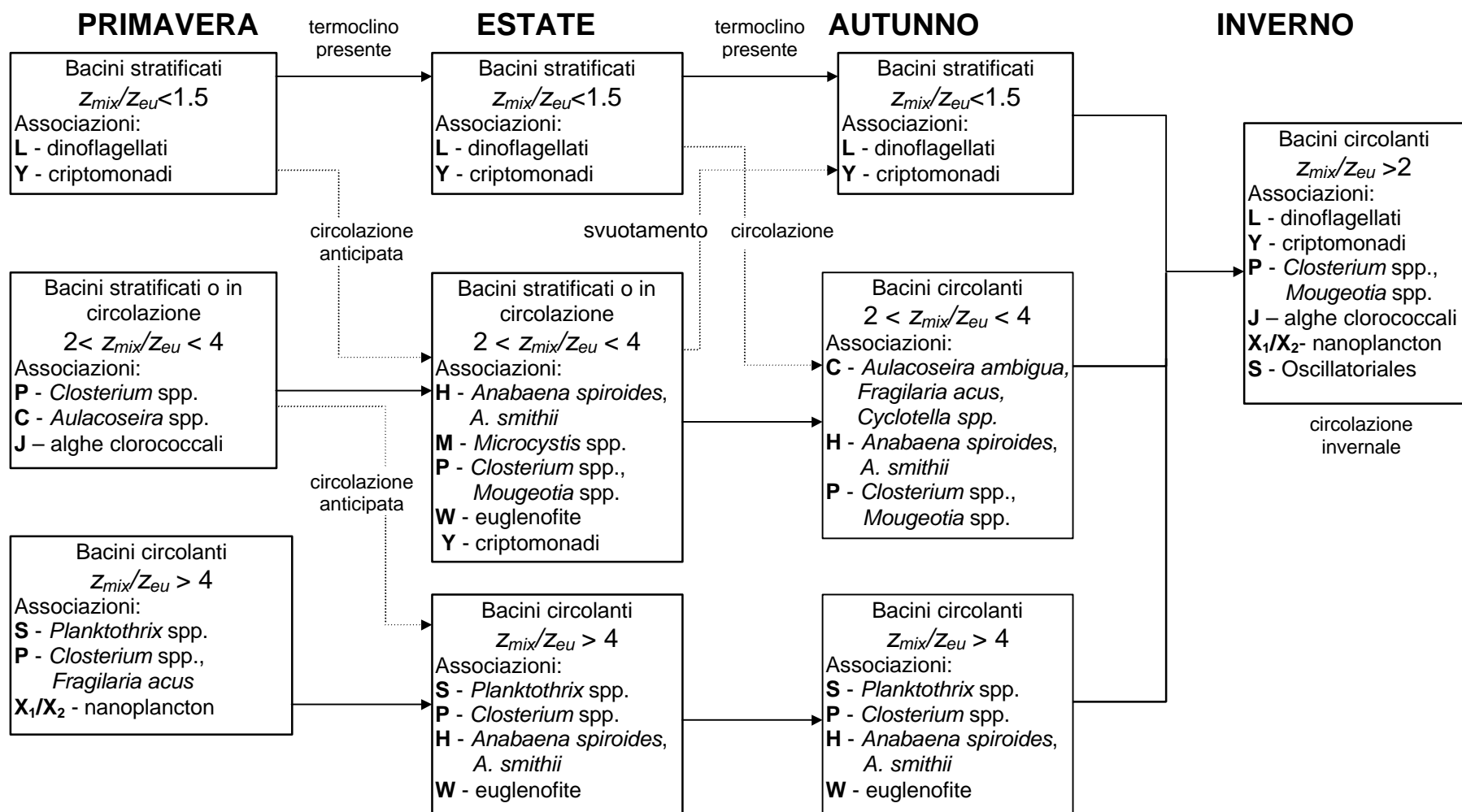


Figura 3. – Modello di successione stagionale del fitoplancton nei bacini artificiali siciliani. z_{mix}/z_{eu} = zona di mescolamento/zona eufotica

Bibliografia

1. MILLIE, D.F., DIONIGI, C.P., SCHOFIELD, O., KIRKPATRICK, G.J., TESTER, P.A. The importance of understanding the molecular cellular, and ecophysiological bases of harmful algal blooms. *J. Phycol.* 1999, 35: 1353-1355.
2. CODD, G.A., BELL, S.G., KAYA, K., WARD, C.J., BEATTIE, K.A., METCALF., J.S. Cyanobacterial toxins, exposure routes and human health. *Eur. J. Phycol.* 1999, 34: 405-415.
3. CHORUS, I., BARTRAM J. Toxic cyanobacteria in water: a guide to public health, consequences, monitoring and management. Chorus I. and Bartram J. (Eds.) London, New York: Published on behalf of WHO by E&FN Spon, 1999, 416 p.
4. NASELLI FLORES L. Limnological Aspects of Sicilian Reservoirs: a Comparative, Ecosystemic Approach. In: *Theoretical Reservoir Ecology and its Applications*. J. G. Tundisi and M. Straškraba, (Eds.), Leiden: Backhuys Publishers, 1999, 283-311 pp.
5. CALVO, S., BARONE, R., NASELLI FLORES, L., FRADÀ ORESTANO, C., DONGARRÀ, G., LUGARO, A., GENCHI, G. Limnological studies on lakes and reservoirs of Sicily. *Naturalista Sicil.* 1993, S. IV, 17 (Suppl.): 1-292.
6. BARONE R. Il fitoplancton e lo stato trofico del lago Poma (Sicilia nord-occidentale). Atti V Congresso A.I.O.L. Stresa IL 19-22 Maggio 1982. R. Bertoni & R. de Bernardi, Pallanza, 1983, 177-188 pp.
7. BARONE R. Fitoplancton e stato trofico del lago di Piana degli Albanesi (Sicilia). *Boll. Acc. Gioenia Sci. Nat. Catania* 1985, 18(326): 485-498.
8. BARONE R., CALVO, S., OLIVERI, R., DI BENEDETTO, M., CASUCCIO, A. AJELLO, M.. Indagini ecologiche su due bacini artificiali siciliani: Piana degli albanesi e Poma. *Giornale di Igiene e Medicina preventiva* 1982, 23(4): 10-41.
9. BARONE R., L. NASELLI FLORES, S. CALVO. Fitoplancton e livello trofico del lago Biviere di Cesarò (Messina). *Naturalista Sicil.* 1989, S. IV, 13 (1-2): 1-22.
10. CALVO, S., BARONE, R., GENCHI, G. Lo stato trofico del lago Scanzano (Palermo). Atti VI Congresso A.I.O.L. Livorno 12-14 Aprile 1984. F. Cinelli & M. Fabiano (Eds), Livorno: 20 Miglia Edizioni, 1985, 249-256 pp.
11. NASELLI FLORES, L. & BARONE, R. Phytoplankton dynamics and structure: a comparative analysis along trophic gradients in natural and man-made water bodies. *Hydrobiologia* (in stampa).
12. NASELLI FLORES L., BARONE R. Phytoplankton dynamics in two reservoirs with different trophic state (Lake Rosamarina and Lake Arancio, Sicily, Italy). *Hydrobiologia* 1998, 369/370: 163-178.
13. O.C.D.E. Eutrophisation des eaux. Méthodes de surveillance, d'évaluation et de lutte. OCDE 1982, Paris, 164 pp.
14. REYNOLDS C. S. 1997 Vegetation processes in the pelagic: a model for ecosystem theory. Ecology Institute, Oldendorf/Luhe. 371 pp.

LA STRUTTURA ALGALE E LO STATO TROFICO DEI LAGHI DELLA SARDEGNA

Nicola Sechi

Dipartimento di Botanica ed Ecologia vegetale, Università di Sassari

Introduzione

La Sardegna presenta, a causa delle sue caratteristiche geomorfologiche un unico lago naturale (Lago di Baratz) e per quanto riguarda il clima, in termini schematici, un semestre umido ed uno arido; le risorse idriche superficiali, disponibili normalmente per meno di sei mesi l'anno, si riducono ulteriormente nelle frequenti annate siccitose. Al fine di disporre di risorse idriche nell'arco dell'intero anno e di accumulare quantità tali da fronteggiare i periodi di prolungata siccità per soddisfare le necessità crescenti della popolazione (dalla produzione di energia elettrica, all'irrigazione, all'uso potabile ed industriale), sono stati realizzati numerosi laghi artificiali, mediante sbarramento dei principali corsi fluviali [1]. La loro progettazione è stata finalizzata alla creazione serbatoi capaci di accumulare i volumi necessari alle richieste senza nessuna considerazione sulla qualità delle acque invasate.

Attualmente i laghi artificiali con volume d'invaso superiore a $0,5 \times 10^6 \text{ m}^3$ sono 36 (Tabella 1).

Per quanto riguarda lo stato trofico, la composizione e densità dei popolamenti fitoplanctonici, le conoscenze ecologiche di base sono progressivamente aumentate a partire dal 1977 con i primi studi sul Lago Coghinas, Omodeo e Liscia e la preliminare definizione del livello trofico di 20 laghi sulla base di alcuni parametri (nutrienti e fitoplancton) rilevati in due campionamenti annuali (alla circolazione ed alla stratificazione), che hanno permesso di avere un primo quadro della situazione trofica dei laghi della Sardegna, evidenziando la necessità di procedere con analisi più dettagliate [1-6].

Da allora vari laghi sono stati studiati sia su cicli annuali (Cuga, Bunnari, Gusana, Pattada, Bidighinzu, Monteleone, Baratz) che pluriennali (Mulargia, Liscia, S. Canales, Alto Flumendosa, Medio Flumendosa, Cixerri, Simbirizzi, Is Barrocos) [7-12].

Le indagini pluriennali hanno preso avvio nel 1985 quando, un'improvvisa e prolungata fioritura di *Oscillatoria rubescens* DC. nei laghi M. Flumendosa e Mulargia, aveva determinato una colorazione rosso mattone delle acque lacustri, una scarsa efficienza nel funzionamento degli impianti di potabilizzazione e la conseguente presenza rilevante di tricomi nell'acqua potabilizzata, con tutta una serie di problemi [13,14]. I risultati pluriennali hanno permesso di constatare che gli stati trofici e gli assetti fitoplanctonici di questi due laghi sono molto variabili, in particolare nel L. Mulargia dove l'eutrofia va da una situazione incipiente ad una molto spinta [15-17].

Tabella 1. – *Elenco dei laghi con volume superiore a $0,5 \times 10^6 \text{ m}^3$, area e profondità media*

	Volume $\text{m}^2 \times 10^6$	Area $\text{m}^2 \times 10^6$	Profondità media m
A. Flumendosa	61,4	3,2	19,2
B. Pressiu	6,2	0,2	31
Baratz	2,5	0,46	5,5
Benzone	1,08	0,27	4
Bidighinzu	12,2	1,67	7,3
Bunnari alto	1,2	0,08	15,4
Casteldoria	8,3	0,4	20,8
Cedrino	30	1,13	26,5
Cixerri	25,3	4,2	6
Coghinas	258,7	17,2	15
Corongiu II	0,6	0,15	4
Corongiu III	4,3	0,27	16,1
Cucchinadorza	17,5	1,1	15,9
Cuga	35	3,1	11,3
Flumineddu	2	0,16	12,5
Govossai	2,8	0,27	10,4
Gusana	59,5	2,6	22,9
Is Barroccus	11,9	1,1	10,9
Leni	20	1,13	17,7
Liscia	33,9	1,32	25,7
M. Flumendosa	100	4,2	23,8
M. Roccadoria	55,4	3,5	15,8
M. Zirimilis	5	0,55	9,1
Monte Pranu	50	5,3	9,4
Monteponi	1	0,1	10,1
Mulargia	250	10,5	23,8
N. P. Antoni	9,1	1,2	7,6
Omodeo	148,6	13,5	11
P. Gennarta	9,8	0,62	15,8
Pattada	65,5	4,4	14,9
Posada	27,8	3	9,3
S. Lucia	3,7	0,43	8,6
Simbirizzi	28,5	5	5,7
Sos Canales	4,3	0,33	13,2
Surigheddu	2,1	0,53	4
Torrei	3	0,17	17,6

Nel 1994, a diciassette anni dalla prima campagna di studio, è stato effettuato un ulteriore controllo su tutti i laghi, sulla base di quattro campionamenti a cadenza stagionale, per verificare se lo stato trofico avesse subito dei cambiamenti.

Questa relazione si propone di dare un quadro generale, sintetico ma aggiornato.

Quadro generale del fitoplancton in relazione allo stato trofico

Nella Tabella 2 viene riportato un quadro sintetico di una parte dei risultati ottenuti finora su 36 laghi artificiali, riferendo il fosforo totale come media nella colonna d'acqua e la clorofilla *a*, insieme alla densità della specie fitoplanctoniche come medie nella zona fotica.

Dei 36 laghi controllati, in base al contenuto del fosforo medio [18], 1 può essere considerato, al maggior livello probabilistico, oligotrofico (L. Leni), 15 mesotrofici (L. Corongiu II, L. Corongiu III, L. Cucchinadorza, L. Govossai, L. Mulargia, L. Benzzone, L. Torrei, L. P. Gennarta, L. M. Flumendosa, L. Gusana, L. Barzolu, L. Bau Pressiu, L. A Flumendosa, L. S. Canales, L. Flumineddu), 15 eutrofici (L. Pattada, L. M. Zirimilis, L. Monteponi, L. Simbirizzi, L. Surigheddu, L. Posada, L. Is Barrocos, L. Cixerri, L. Coghinas, L. Liscia, L. M. Pranu, L. S. Lucia, L. Casteldoria, L. Cedrino, L. Bunnari Alto) e 5 ipertrofici (L. Omodeo, L. Bidighinzu, L. Cuga, L. N. Pranu Antoni, L. M. Roccadoria). In base al contenuto medio di clorofilla *a*, 5 laghi possono essere considerati oligotrofici (L. Leni, L. Corongiu II, L. Corongiu III, L. Torrei, L. M. Zirimilis), 5 mesotrofici (L. Govossai, L. Mulargia, L. M. Flumendosa, L. Barzolu, L. Bau Pressiu), 18 eutrofici (L. Cucchinadorza, L. Benzzone, L. P. Gennarta, L. Gusana, L. A Flumendosa, L. S. Canales, L. Flumineddu, L. Pattada, L. Surigheddu, L. Posada, L. Is Barrocos, L. Coghinas, L. Casteldoria, L. Bunnari Alto, L. M. Roccadoria, L. Omodeo, L. Cuga, L. N. Pranu Antoni) e 8 ipertrofici (L. Liscia, L. Simbirizzi, L. Monteponi, L. Cixerri, L. M. Pranu, L. S. Lucia, L. Cedrino, L. Bidighinzu). In sostanza la clorofilla *a* colloca un maggior numero di laghi nel livello di oligotrofia ma riduce notevolmente quelli di presumibile mesotrofia tanto che l'insieme di questi due livelli passa da 16 a 10; risulta quindi un quadro della situazione trofica sensibilmente peggiore di quello dedotto sulla base del fosforo totale, con un incremento del 17% del numero dei laghi eutrofici e del 38% di quelli ipertrofici. In tutti i casi solo un lago, presunto eutrofico in base al fosforo totale, viene indicato mesotrofico in base alla clorofilla *a* (L. M. Zirimilis). Di seguito verranno indicati come laghi di incerta classificazione (tra meso ed eutrofici) gli 8 laghi (L. M. Zirimilis, L. Flumineddu, L. Gusana, L. P. Gennarta, L. Benzzone, L. Cucchinadorza, L. S. Canales, L. A. Flumendosa) per i quali non si è verificata coincidenza nell'indicazione di stato trofico da parte dei due parametri.

Nella stessa tabella sono riportate, per ogni lago, le sei specie dominanti in termini di densità, disposte in ordine gerarchico. Si può notare che, in generale, ad uno stato eutrofico o ipertrofico corrisponde una dominanza di specie appartenenti alle Cyanophyceae mentre ad un stato mesotrofico od oligotrofico corrisponde una dominanza di specie appartenenti alle Chlorophyceae o alle Diatomee.

Tabella 2. - Valori medi del fosforo totale (P) e della clorofilla *a* (CHL) (mg m^{-3}) e taxa algali più importanti in ordine gerarchico rispetto alla densità (codifica delle specie in calce)

N O M E	[P]	[CHL]	Taxa algali più importanti					
			1°	2°	3°	4°	5°	6°
Nuraghe Pranu Antoni	203	9	Mic aer	Chl sp.	Dic sp.	Ana spi	Rho sp.	Cyc spp
Cuga	169	15	Mic aer	Aph fqu	Pse muc	Ana pla	Ana fqu	Cyc spp
Bidighinzu	166	28	Ooc spp	Apc sp.	Mic fqu	Ste spp	Coe spp	Ana fqu
Omodeo	160	13	Mic aer	Mic fqu	Mer pun	Apt spp	Ana spi	Mel amb
Monteleone Roccadoria	148	9	Mic aer	Ana spi	Pse muc	Apc sp.	Gom apo	Cyc spp
Bunnari alto	98	9	Mer pun	Apc sp.	Ooc spp.	Sce spp	Coe spp	Sph pla
Cedrino	91	22	Ana pla	Mic aer	Ste han	Cyc spp	Aph fqu	Chl sp.
Casteldoria	90	15	Mic aer	Ana fqu	Mic fqu	Ana spp.	Pse muc	Mel dis
Santa Lucia	89	70	Mic aer	Apt spp	Fra cro	Osc spp	Gom apo	Ank spp
Monte Pranu	79	37	Osc spp	Clo gra	Ana pla	Chl sp.	Mic aer	Rho sp.
Liscia	78	20	Mic aer	Gom apo	Apc sp.	Mel dis	Mel amb	Rho min
Coghinas	76	11	Mic fqu	Ana fqu	Mic aer	Aph fqu	Apc sp.	Mel dis
Cixerri	75	45	Osc spp	Mic aer	Ped sim	Cer hir	Ana pla	Pse muc
Is Barroccus	71	8	Aph fqu	Apt spp.	Ooc spp.	Chl sp.	Coe pse	Apc sp.
Posada	65	17	Gom apo	Mel dis	Mic aer	Apc sp.	Aph fqu	Osc spp
Surigheddu	61	7	Aph fqu	Mic aer	Gom spp	Cyc oce	Pse muc	Chr acu
Simbirizzi	56	20	Aph fqu	Cos sp.	Osc spp	Ped sim	Tet min	Chl sp.
Monteponi	49	21	Apc sp.	Tet min	Chl sp.	Cyc oce	Sce qua	Did sp.
Medau Zirimilis	43	3	Cyc oce	Cyc spp	Chl sp.	Ooc spp	Osc spp	Sph pla
Pattada	35	15	Mic aer	Apc sp.	Gom spp	Mel dis	Ooc spp	Vov aur
Flumineddu	33	7	Syn tab	Mon spp	Sce spp	Per sp.	Tet min	Chl sp.
Sos Canales	33	19	Ana spp	Ank fal	Apc ela	Gym lim	Eut pla	Rho min
Alto Flumendosa	33	13	Osc spp	Gom apo	Apt spp	Cyc spp	Rho min	Ooc spp
Bau Pressiu	32	6	Apc sp.	Chl sp	Cyc spp	Ank spp	Cru qua	Cru tet
Barzolu	30	5	Fot sp.	Ana spp.	Mal akr	Mon min	Ank fal	Cos ten
Gusana	29	8	Mel spp	Chl sp.	Mel gra	Vov sp.	Sta gra	Mic aer

Tabella 2 (segue)

N O M E	[P]	[CHL]	Taxa algali più importanti					
			1°	2°	3°	4°	5°	6°
Medio Flumendosa	28	4	Osc spp	Sta spp	Ped sim	Mel gra	Cyc oce	Fra cro
Punta Gennarta	27	8	Sph pla	Cyc oce	Chl sp.	Rad sp.	Mic aer	Ela sp.
Torrei	27	3	Ank fal	Cen sp	Cyc oce	Dyn div	Ooc lac	Rho min
Benzone	25	10	Mel amb	Ela sp.	Fra cro	Ank spp	Osc spp	Dyn div
Mulargia	25	4	Osc spp	Ped dup	Chl sp.	Aph fqu	Cyc spp	Mic aer
Govossai	24	4	Ank spp	Apt spp	Chl sp.	Apc sp.	Rhi sp.	Dic sp.
Cucchinadorza	22	10	Sce spp	Mel amb	Chl sp.	Ank spp	Fra cro	Ana sp.
Corongiu II	21	2	Gom apo	Ank spp	Chl sp.	Sph sp.	Vov aur	Cyc spp
Corongiu III	21	2	Cyc spp	Chl sp.	Ank spp	Vov aur	Apc sp.	Rho min
Leni	15	3	Apc sp.	Cyc oce	Ank fal	Chl sp.	Sph pla	Ooc spp

Codifica delle specie di cui alla tabella 2

Cyanophyceae	Ana fqu = <i>Anabaena flos-aquae</i> (Lyngb.) Bréb.
Ana pla = <i>Anabaena planctonica</i> Brunth.	Ana spi = <i>Anabaeana spiroides</i> Kleb.
Ana spp = <i>Anabaena</i> species	Aph fqu = <i>Aphanizomenon flos-aquae</i> (L.) Ralfs
Apc sp. = <i>Aphanocapsa</i> sp.	Apt spp = <i>Aphanothece</i> species
Mic aer = <i>Microcystis aeruginosa</i> Kg.	Mic fqu = <i>Microcystis flos-aquae</i> (Wittr.) Kichn.
Gom apo = <i>Gomphospaeria aponina</i> Kg.	Osc spp = <i>Oscillatoria</i> species
Gom spp = <i>Gomphospaeria</i> species	Mer pun = <i>Merismopedia punctata</i> Meyen
Pse muc = <i>Pseudoanabaena mucicola</i> (Hub.-Pestal et Naum.) (Bourr.) Chang	
Chlorophyceae	Ank fal = <i>Ankistrodesmus falcatus</i> (Corda) Ralfs
Ank spp. = <i>Ankistrodesmus</i> species	Chl sp. = <i>Chlorella</i> sp.
Cen sp. = <i>Coenococcus</i> sp.	Coe pse = <i>Coelastrum pseudomicroporum</i> Kors.
Cru qua = <i>Crucigenia quadrata</i> Morr.	Coe spp = <i>Coelastrum</i> species
Cru tet = <i>Crucigenia tetrapedia</i> (Kirchn.) W. & G.S. West	Dic sp. = <i>Dictyosphaerium</i> sp.
Did sp. = <i>Didymocystis</i> sp.	Ela sp. = <i>Elakatotrix</i> sp.
Eut pla = <i>Eutetramorus planctonicus</i> (Kors.) Bourr.	Fot sp. = <i>Fotterella</i> sp.
Mon min = <i>Monoraphidium minutum</i> (Näg.) Kom.-Legn.	Mon spp = <i>Monoraphidium</i> species
Ooc spp = <i>Oocystis</i> species	Ped dup = <i>Pediastrum duplex</i> Meyen
Ped sim = <i>Pediastrum simplex</i> Meyen	Rad. sp. = <i>Radiococcus</i> sp.
Sce qua = <i>Scenedesmus quadricauda</i> (Turp.) Bréb. sensu Chod.	Sce spp = <i>Scenedesmus</i> species
Sph pla = <i>Sphaerocystis planctonica</i> (Kors.) Bourr.	Sph sp. = <i>Sphaerocystis</i> sp.

Codifica delle specie di cui alla tabella 2 (segue)

Tet min = Tetradron minimum (A. Br.) Hansg.	Vol sp. = Volvox sp.
Vol aur = Volvox aureus Ehrenbg.	
Diatomeae	Cyc oce = Cyclotella ocellata Pantocs.
Mel amb = Melosira ambigua (Grun.) O. Müller	Mel sp. = Melosira sp.
Cyc spp = Cyclotella species	Rhi sp. = Rhizolenia sp.
Fra cro = Fragilaria crotonensis Kitton	Mel dis = Melosira distans
Mel gra = Melosira granulata (E.) Ralfs	Mel sp. = Melosira sp.
Syn tab = Synedra tabulata Agardh	Ste han = Stephanodiscus hantzschii Grun.
Ste spp = Stephanodiscus species	
Dinophyceae	Cer hir = Ceratium hirundinella (O.F. Müller) Schrank
Gym lim = Gymnodinium limneticum Wol.	Per sp. = Peridinium sp.
Cryptophyceae	
Chr acu = Chroomonas acuta Utermöhl	Rho min = Rhodomonas minuta Skuja
Rho sp. = Rhodomonas sp.	
Conjugatophyceae	Clo gra = Closterium gracile Bréb. ex Ralfs
Clo sp. = Cosmarium sp.	Cos ten = Cosmarium tenue Archer
Sta spp = Staurastrum species	Sta gra = Staurastrum gracile Ralfs
Chrysophyceae	
Dyn div = Dynobryon divergens Imhof	Mal akr = Mallomonas akrokomos Ruttner

Analizzando in termini specifici la presenza delle classi nei differenti livelli trofici risulta che:

- tra le Cyanophyceae le specie *Microcystis aeruginosa* Kg., *Microcystis flos-aquae* (Wittr.) Kirchn., *Aphanizomenon flos-aquae* (L.) Ralfs e *Anabaena flos-aquae* (Lyngb.) Bréb. sono, insieme o singolarmente, presenti ad uno dei sei livelli gerarchici in 20 dei 36 laghi studiati e questi coincidono, con quelli presunti eutrofici o ipertrofici in base alla clorofilla *a* in 19 casi (pari al 73%), con quelli eutrofici o ipertrofici in base al fosforo totale in 17 casi (pari all'85%). Queste specie sono tra le più tipiche rappresentanti di situazione eutrofiche e pertanto la loro presenza dominante o subdominante è una conferma di questo stato. La posizione gerarchica di questa classe nei laghi di incerta collocazione trofica è abbastanza variabile: sono dominanti solo in 2 laghi ma con specie diverse da quelle riportate in precedenza (*Anabaena planctonica* Brunth. ed *Anabaena elliptica* Lemm. (riportate cumulativamente come Ana spp.) e *Aphanocapsa elachista* W. et G.S. West nel L. S. Canales e *Oscillatoria* spp., *Gomphosphaeria aponina* kg. ed *Aphanothece* spp. nel L. A. Flumendosa); quando queste sono invece presenti si inseriscono solo nelle ultime posizioni gerarchiche ed il

fitoplancton è dominato da Diatomeae e Chlorophyceae; anche in altri 3 laghi di questo stesso gruppo, dominati da Diatomeae e Chlorophyceae, le Cyanophyceae compaiono negli ultimi livelli gerarchici con specie dei generi *Oscillatoria* (laghi M. Zirimilis e Benzone) ed *Anabaena* (L. Cucchinadorza); solo nel L. Flumineddu non compaiono Cyanophyceae. Nei laghi oligotrofici e mesotrofici le Cyanophyceae possono essere dominanti o subdominanti con specie dei generi *Aphanocapsa*, *Aphanothece*, *Gomphosphaeria* ed *Oscillatoria*, ritrovabili anche nei livelli trofici più alti.

- Le Chlorophyceae assumono maggiore rilevanza con il diminuire del livello trofico sebbene alcuni rappresentanti, soprattutto dei generi *Oocystis* e *Chlorella*, possano risultare dominanti o codominanti anche in eutrofia o ipertrofia; *Coelastrum* viene osservato solo nei livelli trofici più alti. Nei laghi mesotrofici ed oligotrofici le Chlorophyceae hanno spesso il predominio, per lo più con specie dei generi *Ankistrodesmus* e *Chlorella* mentre nei laghi di incerta classificazione trofica, insieme alle precedenti, possono essere frequenti anche *Sphaerocystis planctonica* e *Tetraedron minimum* (anche in situazioni di bassa eutrofia).
- Le Diatomeae hanno un comportamento simile a quello delle Chlorophyceae, risultando nei primi ordini gerarchici solo nei laghi mesotrofici ed oligotrofici (con specie dei generi *Cyclotella* e *Melosira*) ed occupando posizioni inferiori in quelli eutrofici ed ipertrofici. *Stephanodiscus* è l'unico genere osservato solo ai livelli di trofia più elevati.
- Rappresentanti delle Chrysophyceae, con le specie *Mallomonas akrokomos* (L. Barzolu) e *Dynobryon divergens* (laghi Torrei e Benzone, sebbene per quest'ultimo la clorofilla *a* indichi eutrofia) vengono riscontrati solo nei laghi oligotrofici o mesotrofici.
- Meno definito è il comportamento delle Cryptophyceae, il cui inserimento nei livelli gerarchici più bassi (per lo più con *Rhodomonas minuta*) viene riscontrato in tutte le condizioni trofiche; delle Conjugatophyceae che con specie dei generi *Staurastrum* e *Cosmarium* possono essere importanti nei laghi oligotrofici o mesotrofici ma che in situazioni di eutrofia (con i generi *Closterium* e *Cosmarium*) possono essere codominanti con le Cyanophyceae; dei Dinoflagellati che compaiono in termini rilevanti per la densità solo in due laghi d'incerta collocazione trofica (con *Gymnodinium limneticum* e *Peridinium* sp.) ed in un lago eutrofico (con *Ceratium hirundinella*).

L'analisi dei dati relativi ai 16 laghi (15 artificiali ed uno naturale) nei quali sono state effettuate indagini prolungate conferma lo stato trofico di quasi tutti i casi considerati. Va però rimarcato che i valori medi del fosforo totale e della clorofilla *a* sono a volte molto diversi. In base al fosforo totale risulta oligotrofico un solo lago (L. M. Flumendosa), mesotrofici 4 (laghi Mulargia, Torrei, A. Flumendosa e S. Canales), eutrofici 6 (laghi Gusana, Is Barrocos, Baratz, Pattada, Cuga, Liscia) ed ipertrofici 6 (laghi Simbirizzi, Cixerri, Coghinas, M. Roccadoria, Omodeo e Bidighinzu); in base alla clorofilla *a* risulta oligotrofico il solo L. Torrei e mesotrofico il L. M. Flumendosa, eutrofici 10 (laghi Mulargia, A. Flumendosa, S. Canales, Gusana, Is Barrocos, Pattada, Cuga, Coghinas, M. Roccadoria, Omodeo) ed ipertrofici 5 (laghi Baratz, Liscia, Simbirizzi, Cixerri, e

Bidighinzu). Anche in questo caso si ottiene quindi un quadro peggiore in base alla clorofilla *a* piuttosto che al fosforo totale, con un incremento del numero di laghi eutrofici ed ipertrofici da 12 a 15. Nella tabella sono riportati, sempre in ordine gerarchico, i taxa più significativi in termini di biomassa. Viene confermata l'importanza delle specie di Cyanophyceae già segnalate in precedenza in situazioni di eutrofia o ipertrofia e la progressiva dominanza di specie di altre classi col diminuire dello stato trofico. Rispetto a quanto ottenuto dai dati della densità assumono un ruolo di maggior rilievo le Dinophyceae e le Conjugatophyceae a discapito soprattutto delle Chlorophyceae e delle Diatomeae. Questo dipende dal fatto che la densità esalta il ruolo di specie piccole ma abbondanti mentre la biomassa rivaluta le specie con grandi volumi cellulari anche se presenti con densità non elevate. In particolare si può notare che *Ceratium hirundinella* e *Closterium aciculare* sono presenti in tutti i livelli di trofia, occupando posizioni più o meno importanti, mentre *Gymnodinium limneticum* si osserva soprattutto in situazioni di mesotrofia o eutrofia incipiente.

In termini generali si può inoltre osservare che il numero di taxa si riduce sensibilmente, da 34 a circa una decina, quando si vanno ad individuare quelli che veramente caratterizzano la biomassa di più laghi. La maggiore o minore presenza di questi 9 taxa determina il livello trofico dei 16 laghi.

Conclusioni

In termini generali si può dire che l'eutrofia è situazione dominante nei laghi della Sardegna; questo comporta una composizione algale di tipo eutrofico nel quale le Cianoficee o Cianobatteri hanno un ruolo dominante. Da questo punto di vista i laghi della Sardegna presentano un quadro quasi "standard", cioè molto simile a quello che si può rilevare su qualunque lago di medesima trofia, anche naturale e di aree climatiche diverse. Queste Cianoficee sono molto abbondanti nel semestre caldo ma talvolta, in alcuni laghi, si ritrovano, a livelli di densità rilevanti, anche nella restante parte dell'anno. Considerato che, in Sardegna, le acque per il consumo umano sono derivate, per oltre il 90%, da questi laghi ed in particolare da quelli eutrofici, si intuisce il rischio potenziale di esposizione della popolazione alle sostanze tossiche prodotte dalle Cianoficee.

Bibliografia

1. SECHI N. & LUGLIÈ A. Limnological studies on man-made lakes in Sardinia (Italy). In: P. Guilizzoni, G. Tartari & G. Giussani (eds). *Limnology in Italy. Mem. Ist. Ital. Idrobiol.* 1992, 50: 365-381.
2. SECHI N. Struttura e biomassa dei popolamenti fitoplanctonici del Lago Omodeo (Sardegna centrale). *Giorn. Bot. Ital.* 1978, 112: 347-360.
3. SECHI N. 1989 - L'eutrofizzazione dei laghi artificiali della Sardegna. In: Provincia di Cagliari (ed.). *Atti Conv. Intern. "La qualità dell'acqua in Sardegna. Eutrofizzazione: cause, conseguenze, rimedi"*, p. 71-82.
4. SECHI N. & COSSU A. 1979. Prime valutazioni sui livelli trofici di alcuni bacini artificiali della Sardegna. *Mem. Ist. ital. Idrobiol.* 1979, 37: 259-276.
5. SECHI N., COSSU A. & MANCA M. Il Lago Omodeo: caratteristiche fisiche e chimiche. *Bol. Soc. Sarda Sci. Nat.* 1979, 18: 169-190.
6. MARCHETTI R., BARONE R., CALVO S., LUGLIÈ A., NASELLI FLORES L. & SECHI N., . Studies on Italian reservoirs. In: P. Guilizzoni, G. Tartari & G. Giussani (eds). *Limnology in Italy. Mem. Ist. ital. Idrobiol.* 1992, 50: 337-363.
7. VIRDIS T. & LUGLIÈ A., Sechi N. 1998 - Osservazioni limnologiche sul Lago Simbirizzi dal 1989 al 1993, con particolare riferimento alla dinamica del fitoplancton. *Atti XII Congr. A.I.O.L.*, Isola di Vulcano 18-21 settembre 1996. p. 183-192.
8. SECHI N., BUSCARINU P. & LUGLIÈ A., 1994. Limnologia del nuovo invaso del Cixerri nei primi due anni di esistenza. In: *Atti X Congr. A.I.O.L.*, G. Albertelli, R. Cattaneo - Vietti & M. Piccazzo (Eds.). p. 201-208.
9. MURA M., SECHI N. & LUGLIÈ A., 1992 – L'evoluzione trofica del Lago Simbirizzi dal primo anno d'invaso (1986) al 1989. In: *Atti IX Congr. A.I.O.L.* G. Albertelli, W. Ambrosetti, M. Piccazzo & T.R. Riva (Eds.). p. 513-520.
10. LUGLIÈ A., MAMELI G. & SECHI N., 1996. Indagine limnologica pluriennale (dal 1991 al 1993) sul lago artificiale Sos Canales (Sardegna settentrionale). In: *Atti XI Congr. A.I.O.L.* G. Albertelli, A. De Maio & M. Piccazzo (Eds.). p. 479-489.
11. LUGLIÈ A., MANCA G. & SECHI N. Studi limnologici sul Lago Alto Flumendosa (Sardegna centrale): stato trofico e fitoplancton. *Boll. Soc. Sarda Sci. Nat.* 1996, 31: 83-100.
12. SECHI N., BUSCARINU P., PILO E., LUGLIÈ A. 1998. Il fitoplancton del Lago Cixerri nei primi cinque anni di esistenza. *Atti XII Congr. A.I.O.L.*, Isola di Vulcano 18-21 settembre 1996.
13. LOIZZO A., SECHI N., VOLTERRA L., CONTU A. Some features of a bloom of *Oscillatoria rubescens* D.C. registered in two italian reservoirs. *Water, Air and Soil Pollution* 1988, 38: 263-271.
14. LOIZZO A., CONTU A., SECHI N., VOLTERRA L.. 1989. Studi tossicologici eseguiti dopo episodi di fioriture di alghe in Sardegna. Atti del Convegno "La qualità dell'acqua in Sardegna. Il problema dell'eutrofizzazione: cause, conseguenze rimedi"- Cagliari-Quartu, 15-16 maggio 1986: 217-224.

15. LUGLIÈ A. & SECHI N., 1992. L'evoluzione trofica del Lago Mulargia dal 1985 al 1989. *Atti IX Congr. A.I.O.L.*, p. 475-482.
16. SECHI N. & LUGLIÈ A., 1987 - Le alghe planctoniche dell'invaso del Mulargia (Sardegna centro meridionale) con particolare riferimento ad una fioritura prolungata di *Oscillatoria rubescens* DC. in rapporto alle condizioni chimiche e fisiche. In: D. Bregant & S.F. Umani (eds). *Atti VII Congr. A.I.O.L.*, p. 435-440.
17. SECHI N. & LUGLIÈ A., 1989 - Lo stato trofico dei laghi Mulargia e Flumendosa. In: Provincia di Cagliari (ed.). *Atti Conv. Intern. "La qualità dell'acqua in Sardegna. Eutrofizzazione: cause, conseguenze, rimedi"*, p. 131-145.
18. OCDE 1982. Eutrophication of waters. Monitoring, Assessment and Control. OCDE. Paris. 154p.

I CIANOBATTERI NEI LAGHI TARENTINI

Giovanna Flaim e Virgilio Pinamonti

Istituto Agrario, San Michele all'Adige, Trento

Introduzione

Già a partire dai primi anni '70 l'Istituto Agrario di San Michele (ex Stazione Sperimentale Agraria Forestale) si occupa di limnologia compreso il monitoraggio dei più importanti laghi trentini. Dal 1995 il lavoro viene divulgato attraverso la pubblicazione annuale del volume *Caratteristiche limnologiche dei laghi nel Trentino* [1-5].

La determinazione del quadro fitoplanctonico di ogni lago è una parte importante del lavoro svolto. Infatti la densità del fitoplancton è il fattore principale che determina la "qualità visiva" di un bacino lacustre. I cianobatteri (in senso lato), più d'ogni altro gruppo algale, determinano una "qualità visiva" negativa di un corpo d'acqua quando superano certi limiti di presenza in quanto sono spesso protagonisti di vistosi bloom algali che possono avere ripercussioni tossicologiche. Precedentemente noti come alghe azzurre, i cianobatteri (ex Myxophyceae o Cyanophyta) secondo gli ultimi trattati tassonomici sono cianoprocaroti [6]. In questo lavoro si prendono in esame i cianobatteri rinvenuti nei laghi trentini da noi esaminati durante il periodo 1995 - 1999.

Materiale e Metodi

La frequenza dei campionamenti (Tabella 1) è in rapporto con l'importanza naturalistica ed economica del bacino lacustre nonché con il suo stato trofico. In ogni caso nell'arco della singola annata, per ottenere un quadro sufficientemente rappresentativo di ciascun ambiente i campionamenti sono stati effettuati almeno in corrispondenza dei due momenti più significativi per la fisiologia di un lago, cioè il periodo del rivolgimento primaverile e quello della stratificazione estiva. Per due laghetti (Roncone e Lagolo) è stato eseguito un unico campionamento a fine estate.

Tutti i campionamenti sono stati eseguiti da natante in corrispondenza del punto di massima profondità di ogni lago. Per l'analisi fitoplanctonica il prelievo d'acqua integrata sulla colonna è stato fatto con bottiglia Schroeder, cercando di rispettare dove possibile la profondità di due volte la trasparenza al Disco Secchi.

Tabella 1. - *Elenco dei laghi del Trentino oggetto di indagini nel periodo 1995-1999*

Bacino	Lago	altitudine m s.l.m.	Superficie lago m ²	prof. max m	stato trofico	prelievi 1995-1999 estivi / totali
Adige	Cei	918	39 000	7	mesotrofico	1/3
	Santo M. Terlago	713	68 900	13	mesotrofico	1/2
	Terlago nord	414	118 530	10	eutrofico	6/14
	Lamar	714	40 200	16	mesoligotrofico	1/2
Avisio	Colbricon inf.	1916	17 000	7	oligomesotrofico	3/5
	Colbricon sup.	1926	27 000	12	oligomesotrofico	6/11
	Lagorai	1868	82 525	29	oligotrofico	2/4
	Santo di Cembra	1194	192 000	15	mesotrofico	2/10
Brenta	Caldonazzo	449	5 627 000	49	mesoeutrofico	12/32
	Lavarone	1100	51 610	17	mesoeutrofico	6/20
	Levico	440	1 164 000	38	mesotrofico	6/11
Chiese	Campo	1943	87 000	27	oligotrofico	2/4
	Roncone	782	27 500	4	eutrofico	1/1
Fersina	Canzolino	540	70 800	15	eutrofico	12/35
	Erdemolo	1994	15 500	10	oligotrofico	1/1
	Lases	632	115 000	26	mesotrofico	1/7
	Madrano	548	20 000	8	eutrofico	5/12
	Piazze	1025	229 000	19	mesotrofico	3/6
	S. Colomba	922	21 800	8,7	mesotrofico	1/2
	Serraia	974	444 000	18	eutrofico	11/34
	Valle	625	18 000	8	mesotrofico	1/2
Noce	Malghette	1891	95 400	11	oligotrofico	5/10
	Tovel	1178	382 500	39	oligotrofico	10/26
Sarca	Cavedine	241	1 010 000	50	mesotrofico	1/2
	Cornisello sup.	2112	59 260	22	oligotrofico	2/4
	Lagolo	929	26 000	7	mesotrofico	1/1
	Ledro	655	2 177 000	48	mesoligotrofico	5/10
	Molveno	823	3 272 000	124	oligomesotrofico	1/2
	Nambino	1767	39 800	5	oligotrofico	2/5
	S. Massenza	245	280000	13	mesotrofico	1/2
	Tenno	570	195 190	48	mesotrofico	1/2
	Toblino	242	670 000	14	mesotrofico	2/4
	Valagola	1595	13 000	4	mesoligotrofico	2/4

Il conteggio algale è stato eseguito secondo il metodo descritto da APHA [7] sul campione d'acqua conservato con soluzione di Lugol acetico; il biovolume algale, espresso in mm^3/m^3 , è stato calcolato secondo Rott [8].

Fra i tanti fattori che determinano la sensibilità del metodo, influisce la quantità di acqua lasciata sedimentare (dai 5 ai 50 mL) ed il numero di prelievi effettuati. Ovviamente per la buona riuscita dell'analisi è fondamentale la preparazione e l'esperienza dell'analista.

Per ognuno dei 33 laghi esaminati, la somma del biovolume di cianobatteri nei prelievi estivi è stata divisa per il numero di campionamenti estivi. È stato scelto questo periodo in quanto la fioritura dei cianobatteri è un fenomeno tipicamente estivo. Sono stati considerati campionamenti estivi quelli eseguiti durante la stratificazione termica e precisamente a luglio, agosto e settembre e limitatamente per i laghi di Levico e Ledro ottobre. Per quei laghi dove il numero di campioni estivi è sufficiente è stata calcolata la deviazione standard fra i campioni.

Risultati e Discussione

La presenza dei cianobatteri è comune a quasi tutti i laghi, la quantità del loro biovolume è invece legata soprattutto allo stato trofico del bacino: nel periodo estivo i cianobatteri diventano competitivi rispetto ad altri gruppi del fitoplancton. Come si vede nella Figura 1, dei 33 laghi esaminati 24 presentano valori medi di biovolume estivo dovuto ai cianobatteri al di sotto dei $10 \text{ mm}^3/\text{m}^3$. Valori così bassi non hanno una rilevanza trofica ma si limitano ad un interesse naturalistico. Nessuno dei laghi di questo gruppo è sottoposto a deroga per quanto riguarda la balneazione (legge n. 185 del 12.6.1993).

Nell'intervallo compreso tra 10 a $100 \text{ mm}^3/\text{m}^3$ di biovolume medio estivo si trovano tre laghi: Lavarone, S. di Monte Terlago e S. Colomba. Tutti e tre sono piccoli laghetti fra la meso- e la mesoeutrofia dominati da Diatomee dove la presenza di cianobatteri si è sempre rilevata abbastanza contenuta. Anche tra questi laghi, nessuno è sottoposto a deroga per la balneazione.

Fra i 100 e i $1000 \text{ mm}^3/\text{m}^3$ di biovolume medio si collocano Canzolino e Caldonazzo. Il primo è un piccolo lago eutrofico sottoposto da più anni a deroga per la balneazione; nonostante la sua elevata trofia il lago non sviluppa vistose fioriture da cianobatteri, ma presenta piuttosto una comunità fitoplanctonica dominata da Chlorophyta. Generalmente i cianobatteri si presentano a tarda estate soprattutto con *Microcystis aeruginosa*, ma mai con biovolume elevato. Anche il lago di Caldonazzo entra in questa fascia di biovolume, però un'analisi più approfondita mostra che solamente nell'estate 1995 si è avuta una elevata presenza di cianobatteri ($>1000 \text{ mm}^3/\text{m}^3$ di *Microcystis aeruginosa*); nel periodo 1996-1999 il biovolume medio estivo dovuto a cianobatteri è di circa $62 \text{ mm}^3/\text{m}^3$ con picchi estivi di *Aphanizomenon flos-aquae* presente in alcune annate. Il lago di Caldonazzo sta lentamente evolvendo da una situazione di ipertrofia degli anni '70 verso una situazione di mesotrofia, il suo naturale stato trofico. Nel 1994

nel lago vi è stato un episodio di fioritura localizzata causata da *Anabaena princeps*, durata qualche settimana.

I laghi che superano i 1000 mm³/m³ di biovolume di cianobatteri sono quattro: Ledro, Levico, Terlago e Serrai. I primi due sono laghi mesotrofici medio - grandi con fasce di *Planktothrix rubescens* in profondità dove l'alga trova acque fredde. Nel primo lago, *P. rubescens* ha dato problemi di vistose fioriture anche in superficie (primaverili) che sono scomparse dopo la messa in funzione della circumlacuale e la conseguente eliminazione dello scarico diretto di fognature nel lago. Nel lago di Levico spesso è presente anche *Aphanizomenon flos-aquae* anche se non si sono mai osservate fioriture superficiali. Sia Levico che Ledro non sono sottoposti a deroga per la balneazione.

Terlago è un piccolo lago molto eutrofico con una comunità estiva dominata dalle Chlorophyta ma nel quale si nota un'importante presenza di *Microcystis* e *Oscillatoria*. Da anni il lago è sottoposto a saltuarie deroghe che vietano la balneazione; il suo stato trofico è in gran parte imputabile allo scarico di un depuratore civile in uno dei suoi immissari. Serrai, un lago eutrofico con seri problemi di fioritura algale, è sottoposto a divieto di balneazione dal 1997. Negli ultimi anni, subito dopo il disgelo il lago è spesso caratterizzato da pesanti fioriture di diatomee. Dalla tarda primavera fino al rivolgimento autunnale invece, Serrai manifesta una continua fioritura di cianobatteri (*Anabaena spiroides*, *Microcystis aeruginosa* e *Aphanizomenon flos-aquae*) che coinvolge l'intera superficie lacustre con aspetti visivi deleteri.

Conclusioni

Dei 33 laghi esaminati solamente il lago di Serrai manifesta vistosi bloom algali da cianobatteri che si ripetono da più anni; il lago di Terlago altrettanto "ricco" come trofia non è così vistosamente compromesso. Altri due laghi Ledro e Levico, presentano delle fioriture di *Planktothrix rubescens* localizzate in profondità. Un approfondimento della biologia di questo cianobatterio sarebbe interessante. Il lago di Caldonazzo sta lentamente ritornando al suo naturale stato trofico: la mesotrofia. Alcuni laghi come Canzolino e specialmente Madrano mostrano uno stato eutrofico pronunciato con elevati biovolume algali senza tuttavia mostrare un forte sviluppo di cianobatteri; i fattori che favoriscono lo sviluppo di altri gruppi algali rispetto ai cianobatteri sarebbero degni di attenzione.

Negli ultimi anni fioriture algali localizzate (di solito in anse protette dove l'effetto brezza tende a concentrare le alghe) hanno riguardato soprattutto le Dinophyceae.

Gli autori ringraziano Nanna Buesing (EAWEG - CH) per le utili discussioni.

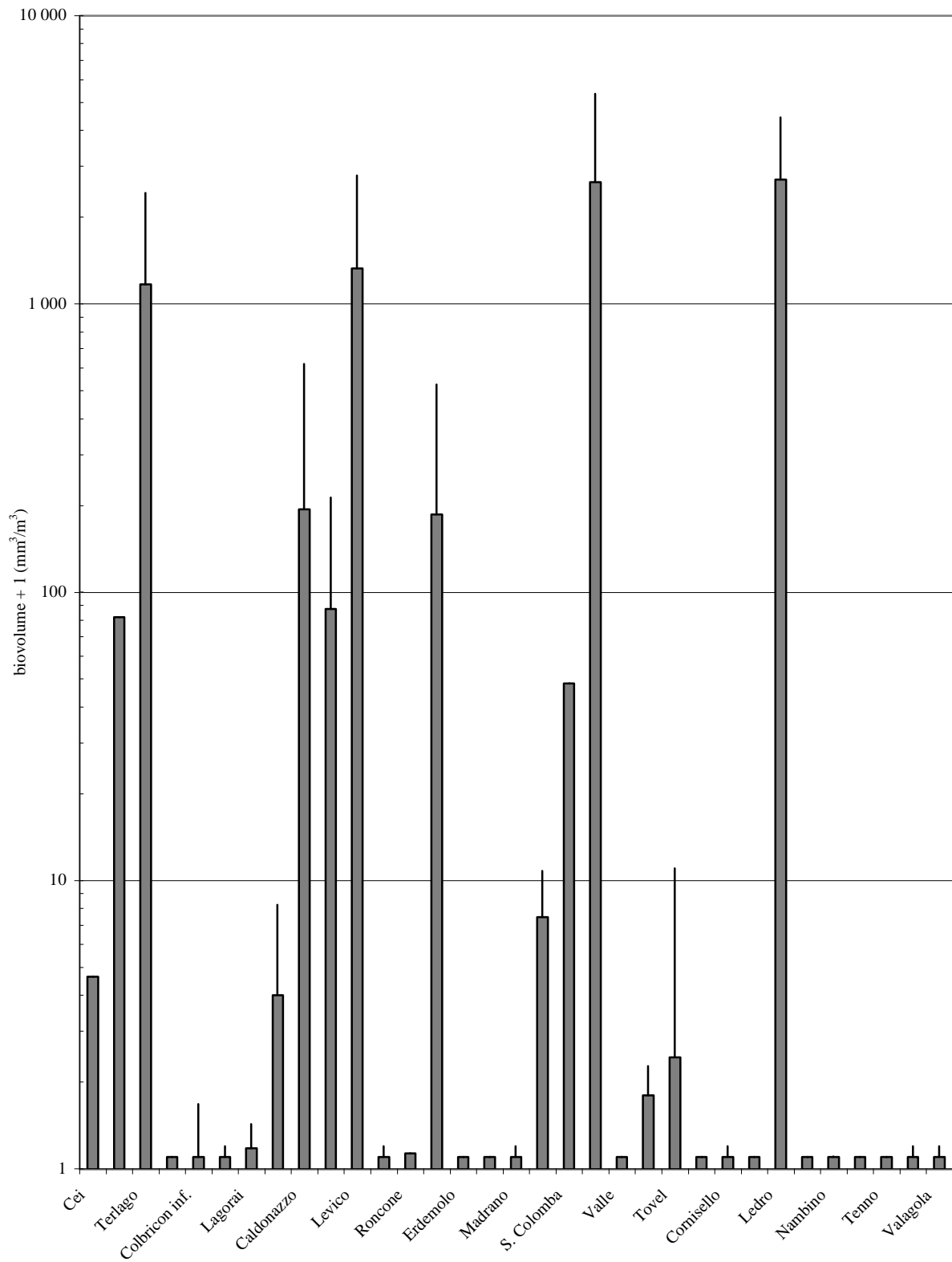


Figura 1. - Biovolume medio estivo (biovolume totale luglio, agosto, settembre / numero di prelievi estivi) di cianobatteri nei laghi trentini monitorati nel periodo 1995-1999 (la barra indica la SD)

Bibliografia

1. ISMA, 1996. *Caratteristiche limnologiche dei laghi del Trentino - Rapporto 1995*. Istituto Agrario di S. Michele all'Adige (Trento). p.112.
2. ISMA, 1997. *Caratteristiche limnologiche dei laghi del Trentino - Rapporto 1996*. Istituto Agrario di S. Michele all'Adige (Trento). p.176.
3. ISMA, 1998. *Caratteristiche limnologiche dei laghi del Trentino - Rapporto 1997*. Istituto Agrario di S. Michele all'Adige (Trento). p.139.
4. ISMA, 1999. *Caratteristiche limnologiche dei laghi del Trentino - Rapporto 1998*. Istituto Agrario di S. Michele all'Adige (Trento) p. 137.
5. ISMA, 2000. *Caratteristiche limnologiche dei laghi del Trentino - Rapporto 1999*. Istituto Agrario di S. Michele all'Adige (Trento) *in stampa*.
6. KOMÁREK, J., ANAGNOSTIDIS K. *Cyanoprokaryota: I Teil Chroococcales*. Gustav Fischer Verlag Jena 1998, 548 p.
7. APHA 1992. *Standard methods for the examination of water and wastewater*. 18th ed., APHA, AWWA, WEF. Washington D.C. , 18th Ed.
8. ROTT, E. Some results from phytoplankton counting intercalibration. *Schweiz. Z. Hydrol.* 1981, 43: 34-63.

I CIANOBATTERI FITOPLANCTONICI DEI LAGHI PROFONDI DELL'ITALIA SETTENTRIONALE

Letizia Garibaldi(a), Fabio Buzzi(b), Giuseppe Morabito(c), Nico Salmaso(d), Marco Simona(e)

(a) Dipartimento di Scienze dell'Ambiente e del Territorio, Università degli Studi di Milano-Bicocca

(b) Presidio Multizonale di Igiene e Prevenzione di Lecco

(c) CNR, Istituto italiano di Idrobiologia, Pallanza

(d) Dipartimento di Biologia dell'Università di Padova

(e) Laboratorio Studi Ambientali del Canton Ticino, Svizzera

Caratteristiche dei laghi profondi sudalpini

Nel distretto lacustre sudalpino, al margine meridionale dell'arco alpino, al limite con la pianura padana, sono collocati i maggiori laghi profondi, in ordine da ovest verso est: il Lago Maggiore, il Ceresio (Lago di Lugano), il Lario (Lago di Como), il Sebino (Lago d'Iseo) e il Lago di Garda (Figura 1).

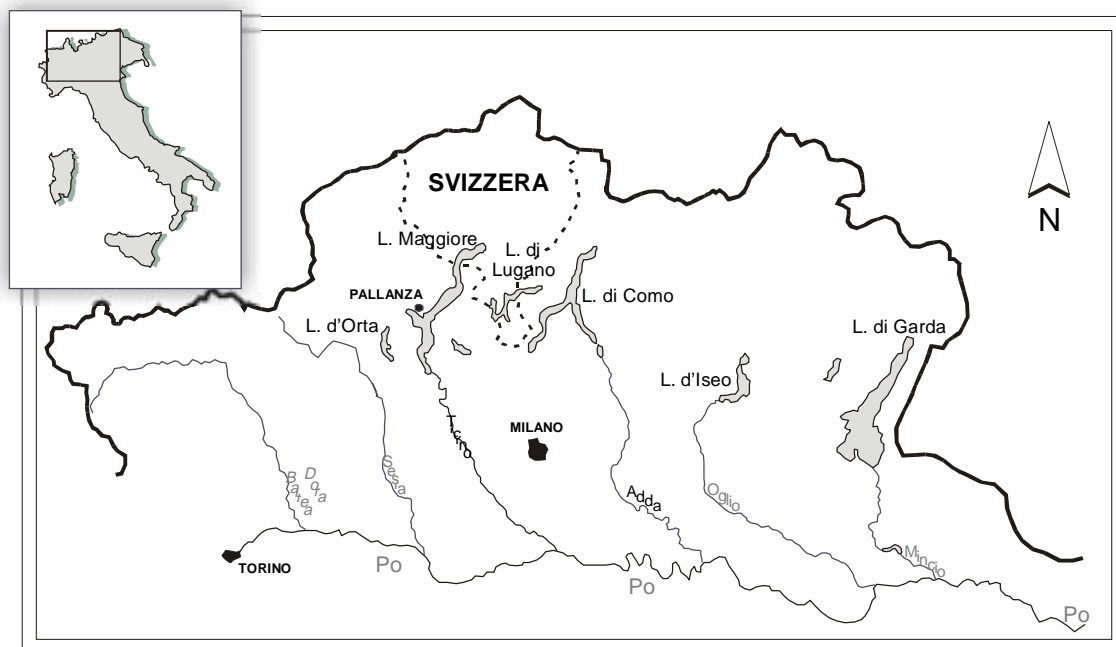


Figura 1. - Laghi profondi sudalpini.

I cinque bacini lacustri hanno una comune origine legata al modellamento glaciale che si è sovrapposto ad una precedente escavazione fluviale [1]. La posizione al margine della catena delle Alpi ha provocato delle forme vallive uniformi, strette e allungate in direzione nord-sud. Sono laghi olo-oligomittici con eventuale mescolamento delle acque in febbraio-marzo, quando si instaura l'omoterminia su tutta la colonna di acqua. Il mescolamento dell'intera massa d'acqua non è annuale ma si verifica solo in anni particolarmente freddi e ventosi. Un'altra caratteristica che accomuna questi grandi laghi è la vastità dei bacini imbriferi che li contengono, fatta eccezione per il Ceresio che fa parte del bacino del Maggiore e che di conseguenza ha il proprio bacino piuttosto limitato [2].

A partire dagli anni '50 è iniziato, per gran parte di laghi un processo di progressivo aumento della trofia delle acque con conseguente deterioramento della qualità. Questo fenomeno si è dapprima evidenziato nei piccoli laghi mentre, nei grandi laghi, a causa della loro enorme capacità di diluizione, ha tardato alcuni anni a mostrarsi. In alcune situazioni sono state intraprese misure di risanamento atte a limitare l'immissione nei corpi idrici di fosforo, principale causa dell'eutrofia. L'attuale situazione trofica dei 5 maggiori laghi insubrici è evidenziata in Figura 2. Mentre si può constatare il netto miglioramento del Lago Maggiore che ha invertito la tendenza alla metà degli anni '80, il Lago d'Iseo sta muovendosi inesorabilmente verso valori di trofia troppo elevati.

Una conseguenza delle alterazioni della trofia spesso è evidenziata da fioriture, più o meno localizzate nel tempo e nello spazio, di cianobatteri, la cui presenza in numero elevato può rappresentare notevoli rischi per la salute pubblica in quanto molte specie possono produrre ceppi altamente tossici. Il rischio è particolarmente elevato se l'acqua del lago è utilizzata per approvvigionamento idropotabile oltre che per la balneazione ed attività ludiche.

I cianobatteri nel Lago Maggiore (1979-1998). - I cianobatteri, insieme alla diatomee, sono sicuramente il gruppo algale più rappresentato nel fitoplancton del Lago Maggiore. Nel corso del ventennio 1979-'98 il loro contributo percentuale alla abbondanza complessiva del fitoplancton si è attestato, mediamente, attorno al 32 %, anche se, come logico attendersi, le fluttuazioni stagionali sono state molto forti, passando da valori superiori al 90 % a percentuali prossime allo zero.

Nell'analizzare la serie storica dei dati non bisogna tuttavia dimenticare che, nell'ultimo ventennio, il Lago Maggiore è andato incontro a modificazioni trofiche significative, passando da una fase di meso-eutrofia ad una di oligo-mesotrofia, seguendo un processo i cui primi effetti a carico delle comunità algali sono stati evidenti a partire dalla fine degli anni '80 [3].

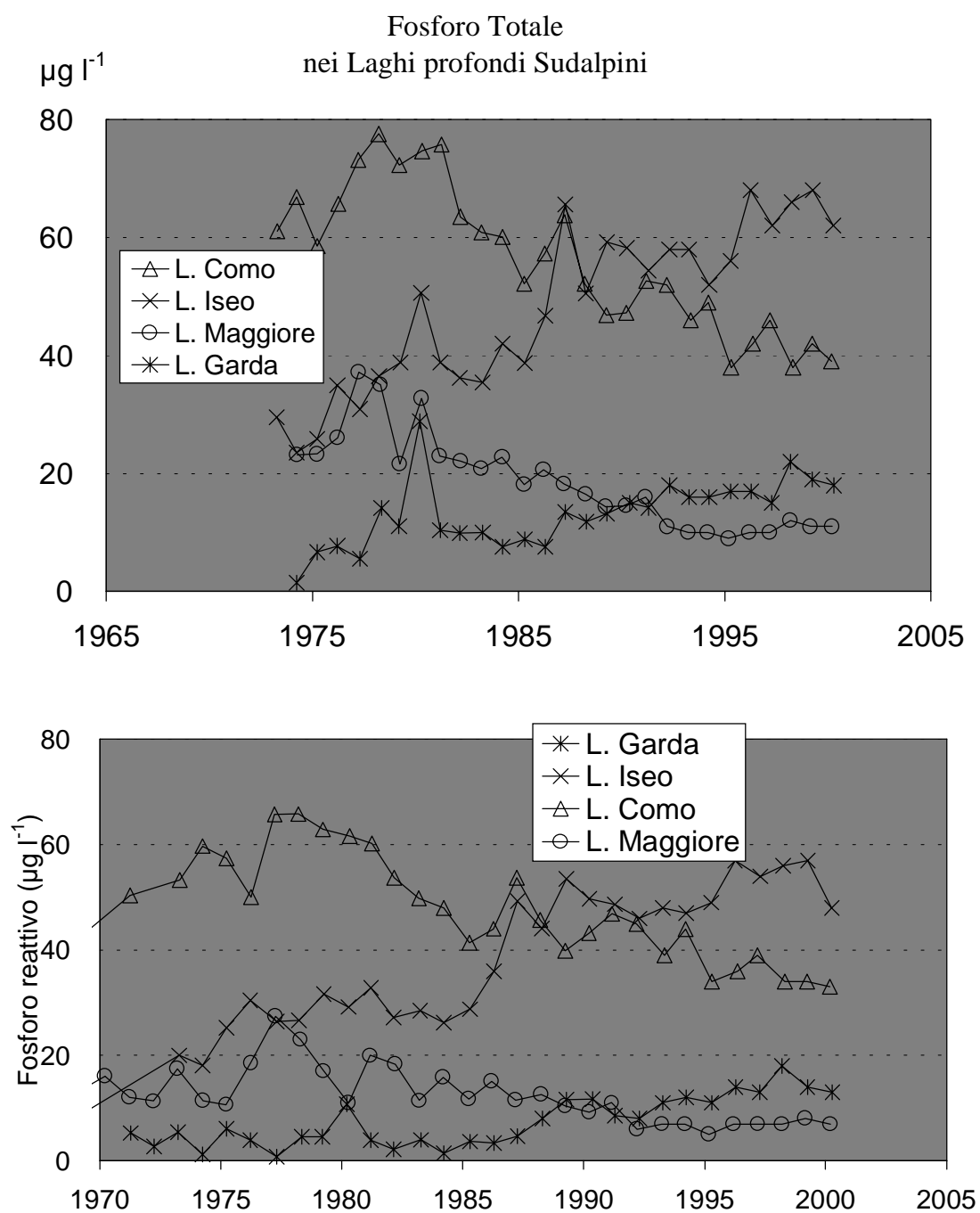


Figura 2. - Situazione trofica dei 5 maggiori laghi insubrici

Per tenere conto del decorso temporale dell'evoluzione trofica, i dati disponibili sui cianobatteri (sempre riferiti allo strato 0-20 m ed alla stazione di massima profondità) sono stati suddivisi in due periodi, il primo comprendente gli anni dal 1979 al 1988, il secondo relativo alla fase 1989-1998.

Analizzando quello che è stato il contributo percentuale medio dei cianobatteri in termini di densità, è comunque interessante osservare che, nel primo periodo, tale valore era pari al 33 %, pressoché identico a quello misurato nel secondo periodo (32 %), segno che l'importanza numerica di questi organismi è rimasta invariata.

Ciò non toglie che gli effetti del migliorato stato trofico siano comunque stati profondi anche a carico della comunità a cianobatteri. Nel periodo 1979-'88, infatti, il loro popolamento era costituito quasi esclusivamente da *Planktothrix* (precedentemente *Oscillatoria*) *rubescens* (Figura 3), classicamente presa come indicatrice di mesotrofia nei laghi profondi subalpini europei [4]. Sporadicamente *Oscillatoria* spp., *Gomphosphaeria lacustris* e *Microcystis aeruginosa* contribuivano alla composizione del popolamento, la cui diversità risultava, nel complesso, piuttosto scarsa.

Durante la seconda fase temporale (1989-1998) viene meno la stabilità che aveva caratterizzato i popolamenti algali del decennio precedente, emergono e si consolidano cambiamenti significativi, tra i quali vale la pena ricordare un aumento generale del numero di specie rinvenute ed una tendenza alla riduzione del biovolume medio della comunità [3].

Nell'ambito dei cianobatteri tali modificazioni si manifestano con la fortissima riduzione numerica di *Planktothrix rubescens* e con un chiaro aumento della diversità del gruppo (Figura 4). La specie dominante, in questa seconda fase, è *Aphanothece clathrata*, le cui piccole dimensioni hanno sicuramente contribuito a far diminuire il biovolume medio della comunità. Le filamentose sono rappresentate da *Oscillatoria limnetica* e *Limnothrix* sp., le cui densità restano comunque piuttosto contenute per tutto il periodo.

Da notare, infine, che, nell'arco del ventennio esaminato le densità raggiunte dai cianobatteri nel Lago Maggiore non hanno mai dato luogo a fioriture, se si eccettua il picco fatto registrare da *Aphanothece clathrata* nell'estate del 1997. In quella occasione i dati fisici, chimici e biologici disponibili non consentirono di fornire una adeguata interpretazione del fenomeno [5]: l'eccezionalità dell'evento è comunque confermata dal fatto che negli anni successivi fioriture analoghe non sono più state osservate.

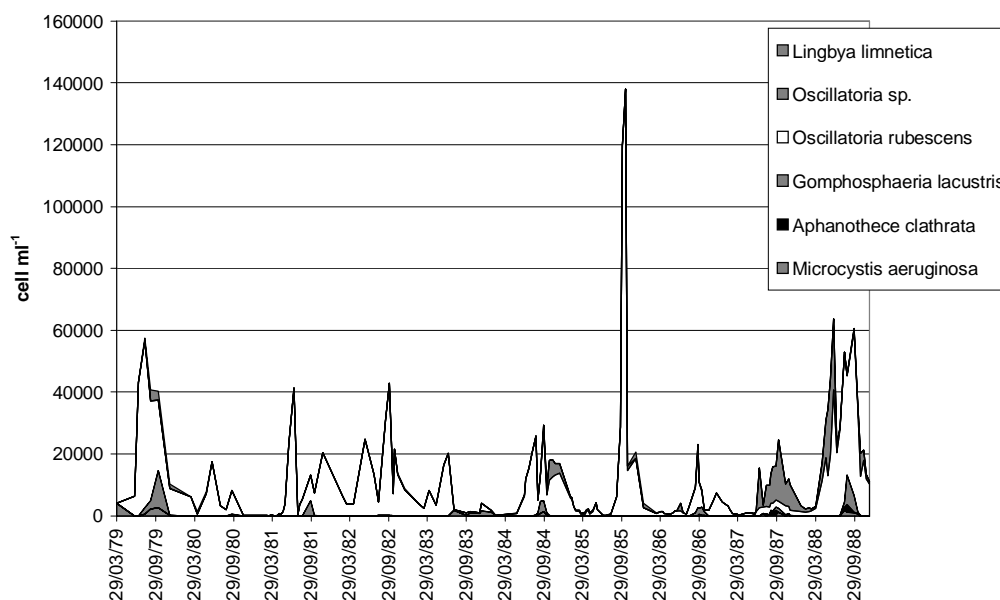


Figura 3. - Evoluzione temporale della comunità a cianobatteri del lago Maggiore nel periodo 1979-1988

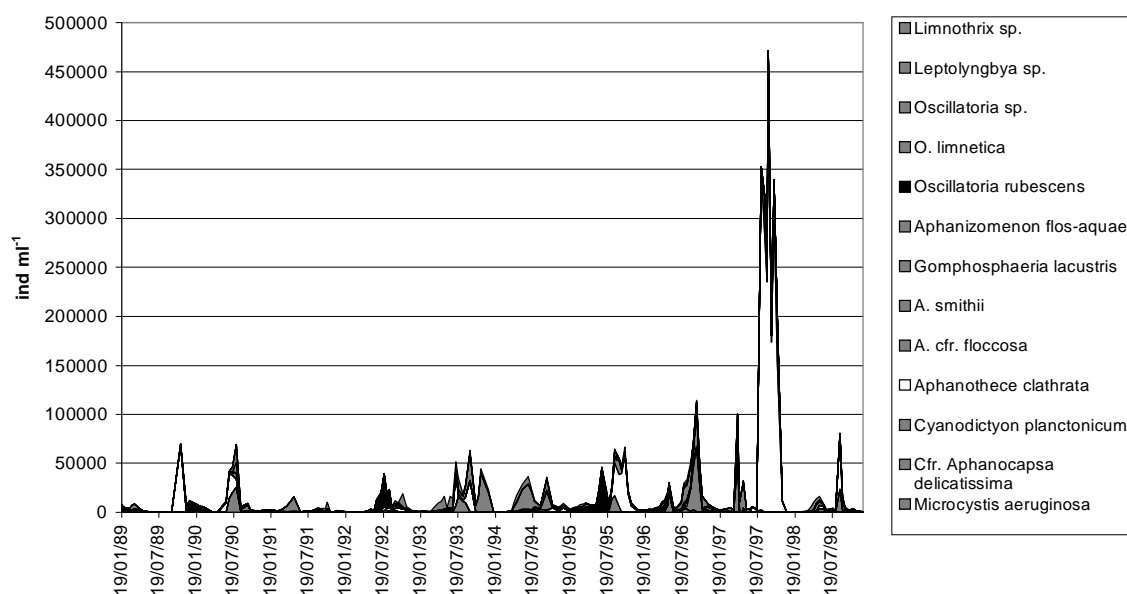


Figura 4. - Evoluzione temporale della comunità a cianobatteri del Lago Maggiore nel periodo 1989-1998

Sviluppo dei cianobatteri nel Ceresio (1980-1998). - I dati quantitativi più recenti sui popolamenti di cianobatteri autotrofi nel Lago di Lugano (Figura 5) sono stati raccolti nell'ambito delle indagini svolte dal Laboratorio Studi Ambientali del Canton Ticino (CH) per conto della Commissione Internazionale per la Protezione delle Acque Italo-Svizzere, e provengono da una serie ininterrotta di campionamenti sull'arco dell'ultimo ventennio, con frequenza per lo meno mensile [6].

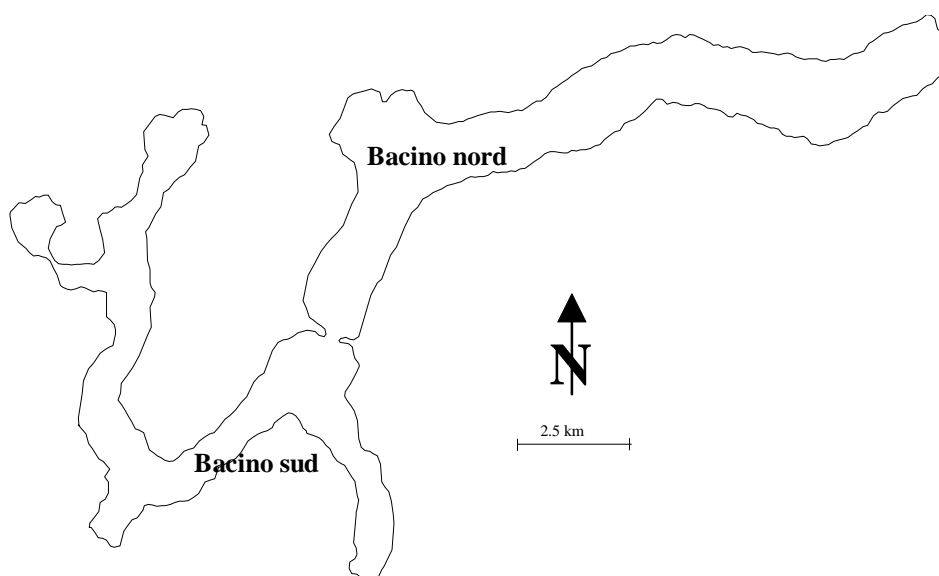


Figura 5. Lago di Lugano (Ceresio)

Durante questo periodo sul Lago di Lugano sono state attuate importanti misure di risanamento, rivolte in particolare alla riduzione dei carichi esterni di fosforo: dall'inizio degli anni '80 ad oggi le concentrazioni epilimniche di questo elemento eutrofizzante si sono ridotte sensibilmente sia nello strato superficiale del bacino nord, (0-100 m) sia sull'intera colonna di quello sud (0-95 m), passando da 140-150 a 50-60 mg P m⁻³. [7]. In generale gli effetti del risanamento sono risultati più evidenti nelle acque epilimniche del bacino nord, in quanto il carico residuo della depurazione delle sue acque luride viene riversato nel bacino sud.

La risposta del popolamento planctonico al progressivo mutamento delle condizioni trofiche ha provocato una modifica della composizione tassonomica a livello delle specie predominanti: per quanto riguarda i cianobatteri (Tabella 1), inizialmente il principale gruppo fitoplanctonico, si possono distinguere in successione temporale le seguenti fasi:

- **1980-1983:** predominanza assoluta di *Oscillatoria/Planktothrix rubescens*, fioriture con punte di densità fino a 200 milioni di cellule per litro d'acqua (strato 0-20 m);

- **1984-1988:** riduzione di *O. rubescens* (punte massime < 50 milioni cell./l) e sviluppo massiccio di forme a filamenti sottili del gruppo *Oscillatoria/Limnothrix* (*O./L. redeckeii*, *O./L. sp.*), con punte vicine a 300 milioni cell./l;
- **1987:** comparsa a livelli di rilievo di *Aphanizomenon flos-aquae* (fino a 30 milioni cell./l);
- **dal 1988:** drastica riduzione dei popolamenti di cianobatteri: ancora alcuni momenti isolati di forte sviluppo soprattutto nel bacino sud;
- *Lyngbya limnetica* presenta uno sviluppo massiccio nel **1985** e nel **1995**, con punte vicine a 300 milioni cell./l;

forme di Chroococcales coloniali che presentano occasionalmente elevati valori di densità: *Microcystis*, *Gomphosphaeria*.

Tabella 1. – Principali punte di sviluppo dei cianobatteri fitoplanctonici osservate nel Lago di Lugano nello strato 0 –20 m. In parentesi la densità in cell ml⁻¹

	Bacino nord	Bacino sud
1981	<i>Oscillatoria (Planktothrix) rubescens</i> (124)	<i>Oscillatoria (Planktothrix) rubescens</i> (200)
	<i>Lyngbya limnetica</i> (17)	<i>Lyngbya limnetica</i> (58)
1982	<i>Oscillatoria (Planktothrix) rubescens</i> (149)	<i>Oscillatoria (Planktothrix) rubescens</i> (93)
	<i>Oscillatoria (Limnothrix) sp.</i> (36)	<i>Oscillatoria (Limnothrix) sp.</i> (23)
		<i>Lyngbya limnetica</i> (13)
1983	<i>Oscillatoria (Planktothrix) rubescens</i> (142)	<i>Oscillatoria (Planktothrix) rubescens</i> (109)
		<i>Oscillatoria (Limnothrix) sp.</i> (275)
1984	<i>Oscillatoria (Planktothrix) rubescens</i> (12)	<i>Oscillatoria (Planktothrix) rubescens</i> (44)
	<i>Oscillatoria (Limnothrix) redeckeii</i> (110)	<i>Oscillatoria (Limnothrix) redeckeii</i> (53)
	<i>Oscillatoria (Limnothrix) sp.</i> (270)	<i>Microcystis (flos-aquae)</i> (77)
1985	<i>Lyngbya limnetica</i> (285)	<i>Lyngbya limnetica</i> (240)
	<i>Oscillatoria (Limnothrix) sp.</i> (52)	<i>Oscillatoria (Limnothrix) sp.</i> (90)
1986	<i>Oscillatoria (Limnothrix) redeckeii</i> (177)	<i>Oscillatoria (Limnothrix) redeckeii</i> (112)
1987	<i>Oscillatoria (Limnothrix) redeckeii</i> (130)	<i>Oscillatoria (Limnothrix) redeckeii</i> (146)
	<i>Aphanizomenon flos-aquae</i> (28)	
1988	<i>Oscillatoria (Limnothrix) redeckeii</i> (288)	<i>Oscillatoria (Limnothrix) redeckeii</i> (176)
	<i>Oscillatoria (Planktothrix) rubescens</i> (29)	<i>Oscillatoria (Planktothrix) rubescens</i> (22)
	<i>Aphanizomenon flos-aquae</i> (22)	<i>Aphanizomenon flos-aquae</i> (31)

Tabella 1 (continua)

	Bacino nord	Bacino sud
		<i>Oscillatoria (Limnothrix) sp.</i> (110)
1989		
1990	<i>Oscillatoria (Limnothrix) sp.</i> (58)	<i>Oscillatoria (Limnothrix) sp.</i> (191)
1991		
1992	<i>Oscillatoria (Planktothrix) rubescens</i> (43)	<i>Oscillatoria (Planktothrix) rubescens</i> (55)
1993	<i>Oscillatoria (Planktothrix) rubescens</i> (26)	<i>Oscillatoria (Planktothrix) rubescens</i> (37)
	<i>Gomphosphaeria lacustris</i> (18)	<i>Lyngbya limnetica</i> (87)
		<i>Aphanizomenon flos-aquae</i> (10)
1994	<i>Aphanizomenon flos-aquae</i> (24)	
	<i>Gomphosphaeria lacustris</i> (18)	
1995	<i>Lyngbya limnetica</i> (283)	<i>Lyngbya limnetica</i> (165)
	<i>Aphanizomenon flos-aquae</i> (35)	<i>Aphanizomenon flos-aquae</i> (23)
1996	<i>Oscillatoria (Limnothrix) redeckeii</i> (87)	<i>Oscillatoria (Limnothrix) redeckeii</i> (139)
	<i>Lyngbya limnetica</i> (93)	<i>Lyngbya limnetica</i> (140)
1997	<i>Oscillatoria (Planktothrix) rubescens</i> (24)	<i>Oscillatoria (Planktothrix) rubescens</i> (23)
	<i>Oscillatoria (Limnothrix) redeckeii</i> (53)	<i>Oscillatoria (Limnothrix) redeckeii</i> (63)
1998		<i>Oscillatoria (Limnothrix) sp.</i> (174)

Le fioriture di cianobatteri nel Lario (1997-1999). - Sul Lario è stata campionata la comunità fitoplanctonica dal settembre del 1997 all'agosto del 1999 in due stazioni, una sul ramo di Como, in prossimità della città omonima e una sul ramo di Lecco, in prossimità di Abbadia Lariana.

Sono state classificate 8 specie di cianobatteri, alcuni con potenziale tossicità. Nella stazione di Como i cianobatteri nel 1997 hanno raggiunto valori estremamente elevati e se ne è osservato il loro dominio da settembre a dicembre con la presenza massiccia di *Oscillatoria rubescens* (Tabella 2). Già dal mese di settembre, con *Oscillatoria rubescens*, *Oscillatoria limnetica* e *Limnothrix sp.* si sono raggiunti valori di densità e biovolume totale pari a 33600 cell. ml⁻¹ e 2386 mm³m⁻³ valori che rappresentano circa il 98% della densità e del biovolume dell'intera comunità algale fitoplanctonica (Tabella 3).

A gennaio del 1998 si assiste a un drastico calo del popolamento di cianobatteri e perdura la sola specie *Oscillatoria rubescens* con valori contenuti nel tempo fino al

controllo del mese di luglio. Ad agosto si ha un nuovo sviluppo con tutte le 8 specie presenti e con valori elevati di *Gomphosphaeria lacustris*, *Limnothrix* sp., *Oscillatoria rubescens* e *Aphanotece* sp.. Valori di non notevole entità per *Oscillatoria limnetica*, *Aphanotece clathrata* e *A. nidulans*, pur tuttavia nell'insieme contribuiscono ampiamente alla densità dell'intera comunità del fitoplancton. A settembre i valori più elevati di densità cellulare sono dovuti allo sviluppo di *Gomphosphaeria lacustris* con 748 cell. ml⁻¹. Questa specie è sempre accompagnata dalla presenza di *Oscillatoria rubescens*, che successivamente diventerà dominante e si svilupperà incontrastata per il resto dell'anno, fino a raggiungere, nell'agosto del 1999, una densità di 29828 cell. ml⁻¹ e un biovolume di 2178 mm³m⁻³.

Tabella 2. - Specie dominante, ad ogni mese, nel Lario nel corso dell'indagine. In parentesi valore della densità in cellule ml⁻¹

Lario 1997-1999	Como	Abbadia
Settembre 1997	<i>Oscillatoria rubescens</i> (31700)	<i>Oscillatoria rubescens</i> (7600)
Ottobre	<i>Oscillatoria rubescens</i> (22823)	<i>Oscillatoria rubescens</i> (12440)
Novembre	<i>Oscillatoria rubescens</i> (13577)	<i>Oscillatoria rubescens</i> (2577)
Dicembre	<i>Limnothrix</i> sp. (4657)	<i>Oscillatoria rubescens</i> (5507)
Gennaio 1998	<i>Oscillatoria rubescens</i> (25)	<i>Oscillatoria rubescens</i> (133)
Febbraio	<i>Oscillatoria rubescens</i> (134)	<i>Oscillatoria rubescens</i> (16)
Marzo	<i>Oscillatoria rubescens</i> (104)	<i>Oscillatoria rubescens</i> (24)
Aprile	<i>Oscillatoria rubescens</i> (116)	assenti
Maggio	<i>Oscillatoria rubescens</i> (1035)	assenti
Giugno	assenti	<i>Lyngbya limnetica</i> (3)
Luglio	<i>Oscillatoria rubescens</i> (68)	<i>Oscillatoria rubescens</i> (21)
Agosto	<i>Gomphosphaeria lacustris</i> (7435)	<i>Gomphosphaeria lacustris</i> (7728)
Settembre	<i>Gomphosphaeria lacustris</i> (748)	<i>Gomphosphaeria lacustris</i> (7435)
Ottobre	<i>Oscillatoria rubescens</i> (609)	<i>Oscillatoria rubescens</i> (1344)
Novembre	<i>Oscillatoria rubescens</i> (1647)	<i>Limnothrix</i> sp. (423)
Dicembre	<i>Limnothrix</i> sp. (596)	<i>Oscillatoria rubescens</i> (676)
Gennaio 1999	<i>Oscillatoria rubescens</i> (313)	<i>Oscillatoria rubescens</i> (468)
Febbraio	<i>Oscillatoria rubescens</i> (303)	<i>Oscillatoria rubescens</i> (43)
Marzo	<i>Oscillatoria rubescens</i> (241)	<i>Oscillatoria rubescens</i> (399)
Aprile	<i>Oscillatoria rubescens</i> (11176)	<i>Limnothrix</i> sp. (244)
Maggio	<i>Oscillatoria rubescens</i> (714)	<i>Oscillatoria rubescens</i> (1557)
Giugno	<i>Oscillatoria rubescens</i> (649)	<i>Oscillatoria rubescens</i> (937)
Luglio	<i>Oscillatoria rubescens</i> (2722)	<i>Aphanotece clathrata</i> (7922)
Agosto	<i>Oscillatoria rubescens</i> (29828)	<i>Oscillatoria rubescens</i> (13165)

Nella stazione di Abbadia Lariana i cianobatteri hanno un andamento stagionale simile a quello osservato nella stazione di Como, dal settembre 1997 fino al luglio dell'anno successivo con valori di densità e di biovolume generalmente inferiori. Ad agosto 1998, sia *Gomphosphaeria lacustris*, che *Oscillatoria rubescens* hanno un notevole sviluppo anche in questa stazione di campionamento e con valori molto più elevati di quelli riscontrati a Como, in contraddizione con il fatto che ad Abbadia lariana il tasso di trofia

delle acque sia più contenuto, ma il campionamento è avvenuto con uno sfasamento di 15 giorni e questo può giustificare la discrepanza. Lo stesso vale per i successivi mesi di settembre e ottobre. Solo nel luglio 1999 si osserva una nuova fioritura di *Oscillatoria rubescens* associata a colonie di *Aphanotece clathrata* e *A. nidulans* e *Aphanocapsa* sp., con densità superiori a quelle riscontrate a Como. Ad agosto, mentre a Como la sola *Oscillatoria rubescens* è rappresentata da una grande quantità di colonie filamentose, ad Abbadia Lariana oltre a *Oscillatoria rubescens*, presente con 16165 cell. ml⁻¹, è presente in abbondanza il genere *Limnothrix* sp., con 12906 cell. ml⁻¹ pari al biovolume di 547 mm³m⁻³.

Tabella 3. – Densità e biovolumi mensili dei cianobatteri nelle stazioni di Como e di Abbadia lariana

Como/Abbadia	cell ml ⁻¹	mm ³ m ⁻³	cell ml ⁻¹	mm ³ m ⁻³
Settembre 1997	33614	2386	11533	657
Ottobre	23858	1706	13242	938
Novembre	13744	998	2590	189
Dicembre	4678	341	5523	403
Gennaio 1998	26	2	113	8
Febbraio	143	10	17	1
Marzo	109	8	40	2
Aprile	154	11	0	0
Maggio	1056	76	0	0
Giugno	0	0	3	0
Luglio	104	6	32	2
Agosto	3363	114	10172	332
Settembre	1048	36	9552	304
Ottobre	680	47	1503	155
Novembre	2337	150	493	21
Dicembre	778	39	962	62
Gennaio 1999	514	31	601	40
Febbraio	434	28	48	3
Marzo	361	23	433	31
Aprile	16943	1060	374	20
Maggio	729	53	1557	114
Giugno	987	72	1876	82
Luglio	3673	300	19857	502
Agosto	31722	2222	41160	1751

I cianobatteri nel fitoplancton del Lago d'Iseo (Sebino) nel periodo 1993-1999. –

Studi sulla comunità fitoplanctonica risalenti agli inizi degli anni '70 [8], su campioni prelevati a centro lago e sulla colonna 0-12 metri, evidenziarono la poca importanza dei Cianobatteri. Le specie più frequenti, presenti da luglio a dicembre e in marzo erano *Microcystis aeruginosa*, *M. stagnalis* e *Chroococcus minimus*. Nel corso dell'indagine limnologica erano state notate e classificate *Oscillatoria tenuis* e *Anabaena catenula*, che non avevano mai raggiunto concentrazioni ragguardevoli. Nel 1978 Ambrosetti *et al.* [2] segnalano per la prima volta la comparsa di *Oscillatoria rubescens* nel Sebino, presente in tutti i campioni esaminati e con densità e biomassa di notevole entità,

soprattutto nei campioni della tarda circolazione del 1980 e del 1982. Dall'esame di campioni prelevati a centro lago, con cadenza mensile dall'aprile 1993 a tutt'oggi, [9,10] si è notato che i cianobatteri hanno vieppiù acquistato importanza sia come densità numerica che come valori di biovolume (Tabella 4). La specie dominante è *Oscillatoria rubescens*, sempre presente in ogni campione, spesso con notevole densità (Tabella 5). In aprile e maggio 1993, mesi di massima abbondanza e dominanza dei cianobatteri, il biovolume di 1886 e 1157 mm^3m^{-3} corrisponde al 35 e 40% del biovolume totale della comunità, valori molto elevati anche in considerazione delle esigue dimensioni cellulari di questi organismi. Con il passaggio dalla primavera all'estate compaiono i generi *Microcystis*, *Chroococcus* e *Gomphosphaeria* che si sovrappongono ad *Oscillatoria*, conquistando la dominanza e sono però di nuovo sostituiti da settembre in poi.

Tabella 4. - Densità e biovolume, su campioni integrati 0 – 10 m, del popolamento di cianobatteri planctonici nel corso del 1993/94 nel Sebino

Sebino	cell ml^{-1}	mm^3m^{-3}
Aprile 1993	19479	1886
Maggio	17531	1157
Giugno	9863	942
Luglio	19231	864
Agosto	4599	169
Settembre	14588	885
Ottobre	6878	442
Novembre	6651	434
Dicembre	4500	297
Gennaio 1994	1630	101
Febbraio	1683	91
Marzo	5535	365

Tabella 5. – Specie dominante, ad ogni mese, nel Sebino nel corso dell'indagine. In parentesi valore della densità in cellule ml^{-1}

Sebino 1993/94	
Aprile 1993	<i>Oscillatoria rubescens</i> (19479)
Maggio	<i>Oscillatoria rubescens</i> (17531)
Giugno	<i>Oscillatoria rubescens</i> (8859)
Luglio	<i>Chroococcus minutus</i> (10576)
Agosto	<i>Gomphosphaeria lacustris</i> (2087)
Settembre	<i>Oscillatoria rubescens</i> (9740)
Ottobre	<i>Oscillatoria rubescens</i> (6150)
Novembre	<i>Oscillatoria rubescens</i> (6335)
Dicembre	<i>Oscillatoria rubescens</i> (4500)
Gennaio 1994	<i>Oscillatoria rubescens</i> (1500)
Febbraio	<i>Chroococcus minimus</i> (1245)
Marzo	<i>Oscillatoria rubescens</i> (5535)

A partire dalla fine di luglio del 1997, lungo tutto il perimetro del lago e per una fascia di circa 20 metri, si verificò una fioritura di *Anabaena lemmermannii* che durò fino a fine settembre e con il massimo dello sviluppo tra fine agosto e l'inizio di settembre, evidenziandosi con marezzature verdi-azzurre sulla superficie dell'acqua lungo costa e particolarmente evidente nei porticcioli e in zone sottovento. Dopo le analisi per la verifica della tossicità dell'alga, eseguite presso l'Istituto Superiore di Sanità, furono immediatamente vietate sia la balneazione, sia l'utilizzo dell'acqua per l'irrigazione degli orti e il consumo del pescato se non previa eviscerazione e abbondanti lavaggi. Per contro, i campioni prelevati a centro lago, non evidenziarono valori di densità della specie particolarmente elevati. Il fenomeno si ripresentò lungo costa, anche se in maniera decisamente più contenuta, nell'anno successivo, mentre a centro lago si ha l'alternarsi di *Oscillatoria rubescens*, *Lyngbya limnetica*, *Aphanotece clathrata*, *Microcystis aeruginosa*, *Chroococcus minimus* e *Gomphosphaeria lacustris* (Tabella 6).

Tabella 6. - Densità e biovolume, su campioni integrati 0 – 10 m, del popolamento di cianobatteri planctonici nel corso del 1998 nel Sebino

Sebino 1998	cell ml ⁻¹	mm ³ m ⁻³
Gennaio	5047	224
Febbraio	3694	119
Marzo	2818	197
Aprile	4325	356
Maggio	2713	239
Giugno	7176	404
Luglio	8213	298
Agosto	18769	534
Settembre	14483	454
Ottobre	15062	1168
Dicembre	3788	112

Tabella 7. – Specie dominante, ad ogni mese, nel Sebino nel corso dell'indagine. In parentesi valore della densità in cellule ml⁻¹

Sebino 1998	
Gennaio	<i>Lyngbya limnetica</i> (2884)
Febbraio	<i>Lyngbya limnetica</i> (2648)
Marzo	<i>Oscillatoria rubescens</i> (2193)
Aprile	<i>Oscillatoria rubescens</i> (4013)
Maggio	<i>Oscillatoria rubescens</i> (2713)
Giugno	<i>Oscillatoria rubescens</i> (4143)
Luglio	<i>Microcystis aeruginosa</i> (4400)
Agosto	<i>Aphanotece clathrata</i> (6460)
Settembre	<i>Aphanotece clathrata</i> (7310)
Ottobre	<i>Oscillatoria rubescens</i> (12897)
Dicembre	<i>Lyngbya limnetica</i> (2843)

All'inizio dell'estate del 1999 le Unità Sanitarie Locali decisero di vietare nuovamente la balneazione, dapprima solo sulla sponda bergamasca e in un secondo tempo anche sulla zona bresciana, a causa di una ingente fioritura di *Oscillatoria rubescens*. Lungo la costa, per tutto il perimetro del lago, la fioritura durò per tutta l'estate e l'inizio dell'autunno, con valori di densità molto elevati (Tabella 8).

Tabella 8. – Entità della fioritura di *Oscillatoria rubescens* in campioni di acqua di superficie. Valore della densità in milioni di cellule ml^{-1}

Località sulla costa bergamasca	10 luglio 1999	3 agosto 1999
Costa Volpino - Bersaglio	66	30
Lovere - Circolo nautico	45	25
Riva di Solto – Bogn	64	77
Riva di Solto – Camping	39	31
Parzanica – Punta la Pietra	52	29
Tavernola – Foce del Rino	53	29
Predore – Punta del Corno	43	20
Sarnico – Camping Nettuno	22	19

Nella zona di campionamento a centro lago i cianobatteri pur essendo sempre presenti con notevoli valori di densità, non raggiungono i livelli numerici di un vero e proprio 'bloom' (Tabella 9).

Tabella 9. - Densità e biovolume, su campioni integrati 0 – 10 m, del popolamento di cianobatteri planctonici nel corso del 1999 nel Sebino

Sebino 1999	cell ml^{-1}	$mm^3 m^{-3}$
Febbraio	3099	191
Marzo	1052	54
Aprile	1928	300
Maggio	2891	6
Giugno	5624	206
Luglio	12906	209
Agosto	20842	1709
Settembre	15829	2610
Ottobre	28890	4362
Novembre	12877	2247
Dicembre	4596	779

Le specie che si avvicinano nelle stagioni sono sempre le stesse che ormai da alcuni anni caratterizzano la comunità di cianobatteri del Sebino, il genere *Oscillatoria* costituito da almeno 5 specie diverse, tra cui sicuramente *O. rubescens*, *O. tenuis*, *O. redekei*, *O. limnetica* ecc., *Lyngbya limnetica*, *Aphanotece clathrata*, *Microcystis aeruginosa*, *Chroococcus minimus* e *Gomphosphaeria lacustris*. Le specie dominanti nei campioni mensili sono riportate nella Tabella 10 .

Tabella 10. – Specie dominante, ad ogni mese, nel Sebino corso dell'indagine. In parentesi valore della densità in cellule ml^{-1} . *Oscillatoria* spp. comprende le tre specie più frequenti: *O. rubescens*, *O. tenuis*, *O. redekei*

Sebino 1999		
Febbraio	<i>Oscillatoria</i> spp.	(2057)
Marzo	<i>Lyngbya limnetica</i>	(602)
Aprile	<i>Oscillatoria rubescens</i>	(1496)
Maggio	<i>Oscillatoria rubescens</i>	(2865)
Giugno	<i>Oscillatoria</i> spp.	(5624)
Luglio	<i>Oscillatoria</i> spp.	(12906)
Agosto	<i>Oscillatoria</i> spp.	(11605)
Settembre	<i>Oscillatoria</i> spp.	(15649)
Ottobre	<i>Oscillatoria</i> spp.	(28071)
Novembre	<i>Oscillatoria</i> spp.	(11276)
Dicembre	<i>Oscillatoria</i> spp.	(3890)

Dal confronto degli eventi di fioritura dei cianobatteri, dall'entità della densità e del biovolume, si evidenzia come il Sebino sia tendente al peggioramento nel corso degli anni, tendenza anche confermata dalle analisi chimiche e fisiche che dimostrano come sia sempre più difficile, in tali condizioni, che l'intera massa di acqua possa rimescolare completamente, come la riserva di ossigeno sul fondo sia da tempo (Agosto 1994) esaurita e notevole sia l'accumulo di sali nutritivi a livello dei sedimenti.

Le fioriture di cianobatteri nel Lago di Garda (1990-1998). - Nel Lago di Garda i cianobatteri più abbondanti sono rappresentati dalle Oscillatoriales del complesso *Planktothrix agardhii-rubescens* [11]. I sottili filamenti di questi organismi si possono comunemente ritrovare in tutte le stagioni dell'anno, ma con minimi stagionali di densità nei mesi tardo primaverili e massimi metalimnetici in estate (cui possono contribuire anche *Planktothrix limnetica* e colonie filamentose ascrivibili alle Limnotrichoideae indeterminate, *sensu*) [12]. Con l'approssimarsi dei mesi invernali le colonie di *Planktothrix* subiscono una progressiva omogeneizzazione e diluizione in profondità, conseguenza del progressivo sprofondamento dell'epilimnio dovuto al raffreddamento della colonna d'acqua.

L'addensamento metalimnetico di *Planktothrix* nel corso dell'estate, al limite inferiore della zona eufotica, è un fenomeno ben conosciuto e osservato in molti laghi [13,14], indicando l'adattamento di questo genere a condizioni di bassa energia luminosa. In

generale, come osservato da Reynolds [15], le specie ascrivibili a *Planktothrix*, *Limnothrix* e *Planktolyngbya* sembrano rispondere a simili processi selettivi; esse sono infatti caratterizzate da elevate capacità di sviluppo in condizioni di bassa illuminazione, riuscendo a mantenere, nel contempo, una densità cellulare tale da garantire un efficace controllo della posizione verticale.

Nel complesso, tra il 1995 e il 1999, *Planktothrix* è stata rinvenuta con densità fino a 8800 cell./ml.

Un'altro cianobatterio che ha assunto una particolare importanza nell'ultimo decennio è costituito da una Nostocales, *Anabaena lemmermannii*. Questa specie, in particolare, è stata osservata anche sotto forma di estese fioriture individuabili come sottili strati e strie giallo-verdi alla superficie dell'acqua (tra ca. 0-2 cm) nei mesi tra luglio e settembre [16]. I fenomeni sono stati osservati in particolar modo nel bacino orientale (Figura 6) nel 1991 (luglio), 1992 (luglio e agosto) e 1996 (luglio). Ulteriori casi, di minore entità, sono stati segnalati anche nei mesi di luglio del 1993 (su indicazione del PMP, ora ARPAV, di Verona) e 1995 e nell'agosto del 1997. Prima del periodo preso in esame, nell'autunno del 1990, è stata rilevata anche una estesa fioritura di *Microcystis aeruginosa*, cianobatterio che ha mostrato un discreto sviluppo, con colonie visibili ad occhio nudo, anche in occasione di alcune delle fioriture di *A. lemmermannii*.

Gli episodi osservati erano caratterizzati da una regolare evoluzione diurna, con la massima estensione durante il mattino e la completa scomparsa nelle ore pomeridiane. Questo comportamento è consistente con i meccanismi, controllati dal regime di luce e dall'attività fotosintetica, regolanti il galleggiamento delle cellule attraverso il controllo della sintesi e collassamento dei gas-vacuoli e cambiamenti nel contenuto di "zavorra" organica intracellulare (quest'ultimo meccanismo, però, è di minore importanza nel controllo del galleggiamento delle colonie di *Anabaena*) [17-20].

Le fioriture sono causate da un rapido accumulo sulla superficie di popolazioni già presenti nella colonna d'acqua. Una tale localizzazione può dare una falsa impressione di abnorme sviluppo algale e di accumulo di sostanza organica [21]. Questa osservazione può trovare conferma anche nei valori di densità non eccessivamente alti rilevati nei campioni raccolti in diverse profondità del bacino orientale nel corso delle ore pomeridiane, dopo la scomparsa della fioritura del 23 luglio 1996 (948, 15 e 3 cell/ml negli strati tra 0-2, 9-11 e 19-21 m, rispettivamente). Comunque, nei campioni di routine questa specie è stata osservata solo raramente con densità prossime o di poco superiori a 1000 cell./ml.

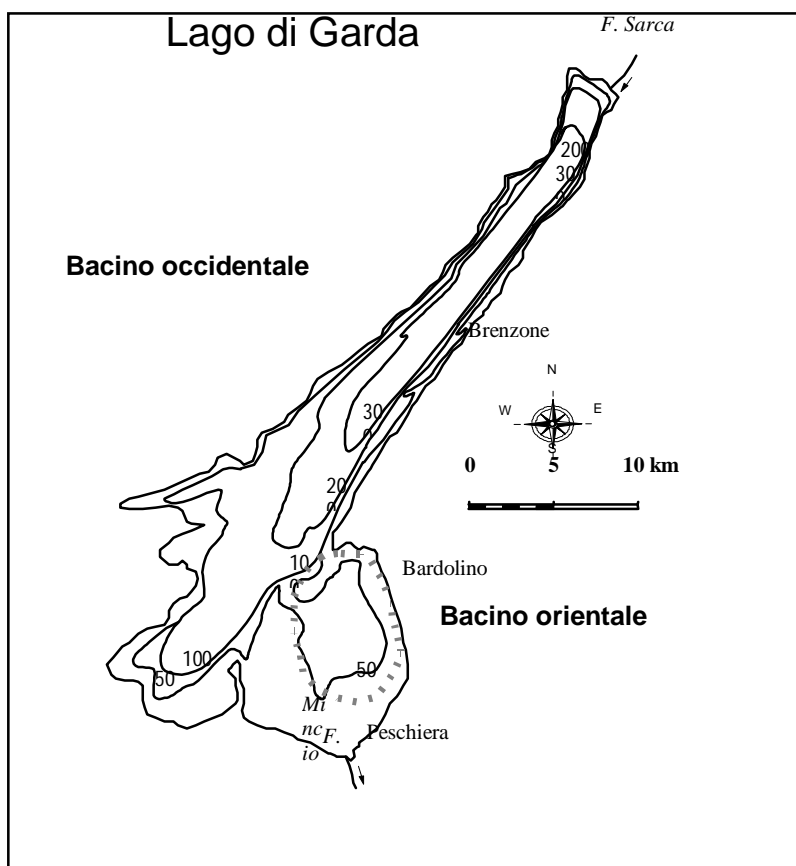


Figura 6: - *Mapa del Lago di Garda. Con la linea tratteggiata spessa è stata indicata la zona del lago dove sono state osservate le fioriture di Anabaena a partire dal 1990; tali fioriture non sono mai state segnalate nel bacino più profondo, mentre non esistono indicazioni per il bacino sud-occidentale.*

La formazione di una fioritura richiede, oltre alla presenza di una popolazione preesistente e ad un aumento della galleggibilità delle colonie, la presenza di una colonna d'acqua stratificata e stabile [21], condizione tipica dei mesi più caldi. In un regime turbolento i meccanismi di controllo del galleggiamento diventerebbero infatti

rapidamente inefficaci. Questa condizione potrebbe spiegare il motivo per cui le fioriture sono state osservate solo nel bacino orientale durante assenza di vento e forte stratificazione termica, con lago piatto e senza increspature alla superficie. Questa stretta localizzazione contrasta con l'assenza di ogni sorta di fenomeno visibile nel bacino occidentale (Figura 6). D'altra parte, la forma allungata di questa parte del lago, incassata tra rilievi montuosi, favorisce l'azione di forti venti i quali costituiscono una tipica (e rinomata) caratteristica del Lago di Garda. Nel corso di alcune delle fioriture localizzate nel bacino orientale è stato osservato che l'azione del moto ondoso nel bacino occidentale poteva costituire, anche in presenza di un discreto numero di cellule di *Anabaena* nella colonna d'acqua (p. es. ca. 1300 cell/ml nel primo metro nel mese di luglio 1991), un fattore sufficiente per prevenire una completa migrazione verticale delle colonie verso i primi centimetri della superficie [16]. Il solo elemento discriminante in questa distribuzione disomogenea sembra essere costituito dalla morfometria del lago e da fattori climatici agenti su scala locale. In questa prospettiva, una interpretazione acritica delle fioriture, come indicazione di un netto peggioramento dello stato trofico, avrebbe portato a valutazioni contraddittorie rispetto a quelle che si possono dedurre da valutazioni complessive (indicanti condizioni di oligo-mesotrofia [11,22]. D'altra parte, se si considera la potenziale tossicità di *Anabaena* per l'uomo e per gli animali, gli accumuli superficiali osservati nel Garda non devono assolutamente essere sottovalutati, richiedendo una stretta e qualificata sorveglianza.

Nelle condizioni attuali lo sviluppo dei cianobatteri (e della componente algale in genere) appare fortemente condizionato dalle limitate concentrazioni di fosforo negli strati produttivi superficiali. D'altra parte, le elevate concentrazioni ipolimnetiche di questo nutriente devono indurre però, considerati gli effetti della circolazione sulla qualità delle acque superficiali [23], a monitorare in modo continuo i principali indici di stato trofico, ed in modo particolare la componente algale. Questo impegno diviene prioritario anche alla luce di un possibile rischio connesso a un maggiore sviluppo di specie potenzialmente tossiche a seguito di un aumento del livello trofico delle acque; tale rischio diviene tanto più evidente se si prendono in considerazione i risultati di studi recenti, che indicano un progressivo e significativo incremento del contenuto di fosforo del Garda a partire dal 1970 [22].

Conclusioni

Il problema dei cianobatteri tossici sembra strettamente legato alla trofia delle acque, oltre che a condizioni climatiche favorevoli che possono più o meno favorire l'enorme sviluppo della biomassa algale. Tra i laghi profondi sudalpini si possono evidenziare diversi gradi di trofia e quindi diversi comportamenti del popolamento di cianobatteri autotrofi planctonici. Decisamente positiva la condizione del Lago Maggiore con acque oligotrofe, del Ceresio in continuo miglioramento, meno soddisfacenti le condizioni del Lario e del Garda, con densità di cianobatteri al limite dell'accettabilità, decisamente

preoccupanti i valori che si evidenziano nelle ricerche sulla qualità delle acque del Sebino.

Allo stato attuale degli studi non si intravedono possibilità d'intervento diverse rispetto a quella dell'eliminazione dei carichi di fosforo provenienti dal bacino imbrifero.

Bibliografia

1. BINI, A., M.B.CITA AND M.GAETANI. Southern Alpine lakes-Hipotesis of an erosional origin related to the Messinian entrenchement. *Mar. Geol.* 1978, 27: 271-288.
2. AMBROSETTI, W., L. BARBANTI, R. MOSELLO, A. ROLLA E D.RUGGIU.. Mescolamento, caratteristiche chimiche, fitoplancton e situazione trofica nei laghi profondi sudalpini. C.N.R. *AQ* 1983, 2/20 : 1-151.
3. RUGGIU, D., G. MORABITO, P. PANZANI E A.PUGNETTI. Trends and relations among basic phytoplankton characteristics in the course of the long-term oligotrophication of Lake Maggiore (Italy). *Hydrobiologia*, 1998, 369/370: 243-257.
4. REYNOLDS, C.S. What factors influence the species composition of phytoplankton in lakes of different trophic status? *Hydrobiologia* 1998, 369/370: 11-26.
5. MORABITO, G. E P. PANZANI. Popolamenti planctonici. Indagini sul fitoplancton. In C.N.R. Istituto Italiano di Idrobiologia, Ricerche sull'evoluzione del Lago Maggiore. Aspetti limnologici. Programma quinquennale 1993-1997. Campagna 1997 e relazione finale. Commissione Internaz. per la protezione delle acque italo-svizzere (Ed.), 1998. p. 48-51.
6. LSA - Laboratorio Studi Ambientali (1980-1998) *Ricerche sull'evoluzione del Lago di Lugano. Aspetti limnologici.* Rapporti annuali delle campagne limnologiche. Edite dalla Commissione internazionale per la protezione delle acque italo-svizzere
7. BARBIERI A. E M. SIMONA. Evoluzione trofica recente del Lago di Lugano in relazione agli interventi di risanamento. *Documenta Ist. Ital. Idrobiol.* 1997, 61: 73-91.
8. Trevisan, R., A.Paganelli, P.Cordella, E.M.Cappelletti e F.Ascensi. Ricerche idrobiologiche sul Lago d'Iseo. *Riv. Idrobiol.* 1979, 18: 271-307.
9. GARIBALDI L., M.C.BRIZZIO, V. MEZZANOTTE, A. VARALLO AND R. MOSELLO. The counting of Lago Iseo (N.Italy): the appearance of anoxia. *Mem. Ist. ital Idrobiol.* 1995, 53:191-212.
10. GARIBALDI L., M.C.BRIZZIO, V.MEZZANOTTE,A.VARALLO AND R.MOSELLO. Evoluzione idrochimica e trofica del Lago d'Iseo. *Documenta Ist. Ital. Idrobiol.* 1997, 61: 135-151.
11. SALMASO, N., F. DECET, M. MANFRIN E P. CORDELLA. Ricerche limnologiche sul Lago di Garda (1991-1996). *Documenta Ist. ital. Idrobiol.* 1997, 61: 173-199.

12. ANAGNOSTIDIS, K. & J. KOMÁREK. Modern approach to the classification system of Cyanophytes. 3-Oscillatoriales. Arch. Hydrobiol. Suppl. 80, *Algological Studies* 1988, 50-53: 327-472.
13. KLEMER, A.R.. The vertical distribution of *Oscillatoria agardhii* var. *isothrix*. Arch. Hydrobiol. 78: 343-362. Allison, E.M. & A.E. Walsby . The role of potassium in the control of turgor pressure in a gas-vacuolate blue-green alga. *J. exp. Bot.* 1976, 32: 241-249.
14. RAMÓN, G. & G. MOYÁ. Seasonal variations in the vertical distribution of *Oscillatoria rubescens* D.C. in the Gorg Blau reservoir, Spain. *Verh. int. Ver. Limnol.* 1984, 22: 1546-1549.
15. REYNOLDS, C.S. The long, the short and the stalled: on the attributes of phytoplankton selected by physical mixing in lakes and rivers. *Hydrobiologia* 1994, 289: 9-21.
16. SALMASO, N., F. CAVOLO E P. CORDELLA. Fioriture di *Anabaena* e *Microcystis* nel Lago di Garda. Eventi rilevati e caratterizzazione dei periodi di sviluppo. *Acqua Aria* 1994, 1: 17-28.
17. GRANT, N.G. & A.E. WALSBY. The contribution of photosynthate to turgor pressure rise in the planktonic blue-green alga *Anabaena flos-aquae*. *J. exp. Bot.* 1977, 28: 409-415.
18. ALLISON, E.M. & A.E. WALSBY. The role of potassium in the control of turgor pressure in a gas-vacuolate blue-green alga. *J. Exp. Bot.* 1981, 32: 241-249.
19. OLIVER, R.L. & A.E. WALSBY. Direct evidence for the role of light-mediated gas vesicle collapse in the buoyancy regulation of *Anabaena flos-aquae* (cyanobacteria). *Limnol. Oceanogr.* 1984, 29: 879-886.
20. KROMKAMP, J. & A.E. WALSBY. A computer model of buoyancy and vertical migration in cyanobacteria. *J. Plankton Res.* 1990, 12: 161-183.
21. REYNOLDS, C.S. & A.E. WALSBY. Water-blooms. *Biol. Rev.* 1975, 50: 437-481.
22. SALMASO, N., F. DECET & R. MOSELLO. Chemical characteristics and trophic evolution of the deep subalpine Lake Garda (Northern Italy). *Mem. Ist. Ital. Idrobiol.* 1997, 56: 51-76.
23. SALMASO, N., F. DECET, S. CONSOLARO E P. CORDELLA. Caratteristiche chimiche e situazione trofica del Lago di Garda nel corso dell'episodio di mescolamento delle acque della primavera del 1999. *Acqua Aria* 1999, 9: 83-89.

SITUAZIONE TROFICA DEI LAGHI ITALIANI E INFLUENZA SULLE FIORITURE DA CIANOBATTERI

Gianni Tartari, Diego Copetti, Giorgio Abenante

Reparto di Idrobiologia Applicata, IRSA-CNR, Brugherio

Introduzione

Gli ambienti lacustri in molte aree della Terra rappresentano per milioni di persone l'unica sorgente di approvvigionamento di acqua. Le informazioni sulla qualità delle loro acque sono però ancora troppo scarse, specialmente nei Paesi meno sviluppati [1], ed inadeguate per una gestione incisiva nel contenimento dei fenomeni di degrado. Una ricognizione del tutto generale nell'unica banca mondiale della qualità delle acque lacustri attualmente disponibile, realizzata a partire dal 1988 dall'ILEC (International Lake Environment Committee, www.ilec.or.jp/e_index.html) in collaborazione con l'UNEP (United Nations Environment Programme), che raccoglie informazioni ambientali e socio-economiche sui circa 500 principali ambienti lacustri di 73 Paesi, porta alla constatazione che essi sono in condizioni eutrofe in misura oscillante tra il 30 e il 50% [2].

La scarsa conoscenza dello stato complessivo della qualità delle acque lacustri è un problema anche per l'Italia [3], non esiste ancora, infatti, una raccolta completa ed aggiornata. Diversi tentativi di tracciare un quadro nazionale risalgono agli anni settanta ed ottanta [4,5], mentre l'ultimo è stato realizzato all'inizio degli anni novanta [6]. Ciò ha spinto recentemente ad avviare la realizzazione, da parte dell'Istituto di Ricerca Sulle Acque e dell'Istituto Italiano di Idrobiologia, di una banca dati (Progetto LIMNO) [7] che raccolga le informazioni disponibili riguardanti i circa 400 ambienti lacustri italiani.

Come è ormai ben noto da molti anni [8] la "fertilizzazione delle acque", causata dall'aggiunta di nutrienti (principalmente fosforo ed azoto) di origine urbana ed agricola, le maggiori sorgenti di queste specie [9], costituisce la causa primaria dello sviluppo di alghe e determina il degrado dell'intero corpo lacustre con impoverimento della catena trofica, diminuzione complessiva dell'ossigenazione delle acque, anossia ipolimnica durante la stratificazione termica, rilascio di nutrienti e metalli dai sedimenti ecc.

La classificazione delle acque lacustri in base allo stato trofico effettuata dall'OECD [10] consente una prima sommaria valutazione della qualità in relazione alle concentrazioni di fosforo considerate dannose per l'ecosistema lacustre. In base alla concentrazione di fosforo alla circolazione (il periodo di massimo rimescolamento termico delle acque), che distingue tra acque ultra-oligotrofiche ($[P] < 4 \mu\text{gP/l}$), oligotrofiche ($< 10 \mu\text{gP/l}$), mesotrofiche ($10\text{-}35 \mu\text{gP/l}$), eutrofiche ($35\text{-}100 \mu\text{gP/l}$) ed infine iper-eutrofiche ($> 100 \mu\text{gP/l}$), è infatti possibile formulare alcune ipotesi generali sullo sviluppo algale nel periodo di massima stratificazione [11], ma non è possibile

definire se i bloom algali saranno o meno costituiti da un determinato tipo di alghe, ad esempio cianobatteri.

Numerosi sono i fattori che controllano la crescita delle alghe. Una variabile largamente usata fin dagli anni sessanta [12], per la definizione della biomassa algale in funzione del contenuto di nutrienti, è la clorofilla *a*. Con questa variabile le classificazioni trofiche vengono condotte, come indicato da Premazzi e Chiaudani [13], in base alle seguenti classi di concentrazione: acque ultra-oligotrofiche ($[Chl. a] < 2,5 \mu g/l$), oligotrofiche ($< 2,5-10 \mu g/l$), mesotrofiche ($10-30 \mu g/l$), eutrofiche ($30-110 \mu g/l$) ed infine iper-eutrofiche ($> 110 \mu g/l$). L'incremento di abbondanza di cianobatteri è strettamente correlato all'aumento dello stato trofico dei laghi. Vi è, infatti, una nota tendenza di queste specie algali ad essere dominanti rispetto alle altre specie a causa di numerosi fattori, come ad esempio la maggiore efficienza di utilizzo dei nutrienti, la capacità di accumulo di nutrienti ecc. Benché esistano profonde differenze morfologiche tra le specie di cianobatteri, essi possiedono notevoli similarità fisiologiche, che si evidenziano in particolare nella risposta alle azioni di recupero delle acque attraverso il controllo dei nutrienti. I cianobatteri tendono a scomparire con la diminuzione delle concentrazioni di fosforo [14], ma la scomparsa avviene attraverso stadi successivi, nei quali un'importante influenza è data dalle caratteristiche fisiche lacustri. La diminuzione delle popolazioni di cianobatteri nei laghi profondi richiede, ad esempio, il raggiungimento di concentrazioni di fosforo minori che negli altri casi, anche se nella generalizzazione di queste conclusioni applicate alle specie dominanti (ad esempio *Oscillatoria*) occorre porre la massima cautela [14]. Recentemente, infatti, sono stati segnalati aumenti delle fioriture anche in casi di fasi di riduzione dei nutrienti, spiegate con la maggiore importanza del picoplancton rispetto al macroplancton autotrofo, con conseguente allungamento della catena alimentare durante le fasi di oligotrofizzazione. A questo fenomeno vanno incontro molti ambienti lacustri a seguito del diffondersi, nei Paesi più industrializzati, degli interventi di contenimento delle immissioni di acque reflue non trattate. Recentemente, però, sembrano aggiungersi tra le cause indirette di sviluppo dei cianobatteri anche i cambiamenti climatici [15].

I fattori che favoriscono lo sviluppo delle fioriture di cianobatteri sono quindi essenzialmente due: i nutrienti e la temperatura. La luce, il ricambio delle acque e la stabilità delle popolazioni algali sono invece i principali fattori che ne sfavoriscono la crescita [16]. Naturalmente le situazioni che modificano questi fattori sfavorevoli, come ad esempio intense fioriture di alghe verdi che portano ad un aumento della torbidità con conseguente riduzione della luce, le condizioni che favoriscono l'instabilità delle popolazioni algali, come l'eutrofizzazione, ed infine la stagnazione delle acque, situazione tipica degli invasi destinati all'accumulo di risorse idropotabili, divengono a loro volta fattori che favoriscono l'insorgenza di fioriture di cianobatteri.

Il quadro che emerge porta a considerare di centrale importanza il controllo dello stato trofico lacustre, quale causa prima del rischio di insorgenza di fioriture da cianobatteri. Il controllo dei nutrienti per questa problematica ha quindi un fondamentale effetto sinergico con l'insieme degli obiettivi di risanamento delle acque lacustri, rivalutandoli in un nuovo orizzonte in cui la migliore fruibilità della risorsa

idrica non è solo misurabile con il raggiungimento di una accettabile qualità ecologica, ma anche un modo per garantire una qualità accettabile ai fini potabili e ricreativi.

Obiettivi

Obiettivo di questa nota è quello di definire il quadro delle conoscenze dello stato trofico dei laghi italiani utilizzando le informazioni preliminari raccolte nel corso del 1999 nell'ambito del Progetto LIMNO. La valutazione dello stato trofico rappresenterà la base per una prima ricognizione dei rischi potenziali da cianobatteri a cui sono soggette le acque lacustri italiane, ma anche un punto di riferimento delle necessità di conoscenza richieste per un corretto approfondimento di questo problema.

Il Progetto LIMNO: obiettivi e applicazioni

Considerando il costo e le conseguenze sociali di azioni sia tecniche sia normative volte a prevenire, contenere o ridurre la degradazione delle acque lacustri, è di primaria importanza e utilità disporre di informazioni di base che permettano di caratterizzarne lo stato trofico ed anche di accertare l'eventuale esistenza di fenomeni particolari di inquinamento. Queste conoscenze potrebbero indicare già oggi le priorità di intervento e, in prospettiva, la linea più corretta per la gestione su scala regionale e nazionale delle risorse idriche lacustri [7].

Nonostante queste premesse, se si prescindono da pochi ambienti per altro ben studiati (tra i quali il Lago Maggiore, il Lago di Garda e i laghi briantei), l'attuale conoscenza delle acque lacustri italiane, che racchiudono un importante patrimonio idrico valutabile in circa 151 km³, appare ancora incompleta per il basso numero di ambienti monitorati e del tutto frammentaria come copertura dell'evoluzione temporale dello stato trofico. E' pertanto evidente la forte esigenza di colmare queste carenze sfruttando l'occasione data dalla applicazione della nuova normativa sulla tutela delle acque dall'inquinamento (Decreto Legislativo 152/99), proponendo la realizzazione di una raccolta che riassume, in modo unitario, la situazione dell'intero comparto lacustre nazionale e che sia anche strutturata in modo da acquisire le informazioni che permettono di seguire i cambiamenti della qualità delle acque nel corso degli anni.

Queste esigenze hanno portato nel 1997 alla nascita del progetto LIMNO che si prefigge di produrre una banca dati aggiornata delle principali caratteristiche geografiche, morfometriche, idrologiche, chimiche e limnologiche dei laghi interni distribuiti sul territorio nazionale, eliminando le problematiche (incompletezza territoriale, qualità dei dati, database unicamente cartacei, ecc.) che hanno contraddistinto i precedenti catasti nazionali. In particolare il Progetto prevede di tracciare un quadro dello stato della qualità delle acque attraverso: l'esame completo ed il più ampio possibile delle variabili limnologiche, la ricostruzione dell'evoluzione temporale della trofia, la valutazione critica dei dati di qualità dell'ultimo quinquennio

ecc. Il database si propone, quindi, come strumento scientifico adatto a scopi di ricerca e come mezzo utilizzabile ai fini gestionali e legislativi.

La distribuzione dei laghi in Italia

Volendo affrontare in modo generale dal punto di vista gestionale il quadro del problema del contenimento dei fenomeni delle fioriture da cianobatteri, adottando ad esempio sistemi di prevenzione dell'apporto di nutrienti, occorre in primo luogo conoscere la natura prevalente degli utilizzi delle acque lacustri e l'analisi dei dati disponibili dovrebbe privilegiare quelli destinati all'approvvigionamento potabile ed agli scopi ricreativi. Questi utilizzi rappresentano infatti le due principali sorgenti a rischio per la popolazione in presenza di fioriture da cianobatteri [17].

Sulla base della classificazione degli ambienti lacustri in riferimento alla normativa vigente (D.Lgs 152/99), alle informazioni disponibili all'Istituto di Ricerca sulle Acque, che nel 1984 aveva già raccolto le informazioni di 222 laghi dell'Italia settentrionale [5], ed alla attività dell'Istituto Italiano di Idrobiologia, che da molti anni si occupa dei laghi della regione alpina [18] e dei grandi laghi insubrici [19], i laghi di acqua dolce italiani classificati dal Progetto LIMNO sono complessivamente 400 (121 naturali, 279 invasi).

Il numero maggiore di laghi si ritrova nel Nord Italia (228) mentre nel Sud della penisola se ne contano solo 37. Questa distribuzione è in relazione alla natura geomorfologica del suolo, alle condizioni climatiche e alla politica di gestione delle risorse idriche. Le isole, ad esempio, presentano un numero di laghi (67) confrontabile con il centro Italia (69) in virtù dell'alto numero di laghi artificiali presenti sul loro territorio.

La regione con più ambienti lacustri (68) è la Lombardia mentre nel Molise ve ne sono solo 2. La Lombardia, con il 42% di superficie lacustre (Figura 1) e il 50% circa di volume rispetto a quello nazionale (Figura 2), costituisce il distretto lacustre più importante d'Italia.

La Sardegna risulta essere la regione con più invasi. L'unico ambiente naturale, tra i 37 presenti nel suo territorio, è il Lago Baratz. Nella Puglia, nella Calabria e nelle Marche non sono presenti laghi naturali censibili secondo i criteri del Progetto LIMNO [7]. La regione, invece, con il minor numero di invasi (37%) è il Lazio a cui segue l'Alto Adige (Provincia di Bolzano) con il 50%.

La distribuzione dei laghi rispetto alla quota vede la massima frequenza nella fascia compresa tra i 100 e i 400 metri. Meno frequenti sono i laghi compresi nella fascia collinare e di media montagna, mentre si ha una leggera crescita della frequenza tra i 1.700 e i 2.100 metri, a sottolineare la natura montana del territorio italiano, confermata anche dalla altitudine media dei 400 Laghi LIMNO di 864 metri.

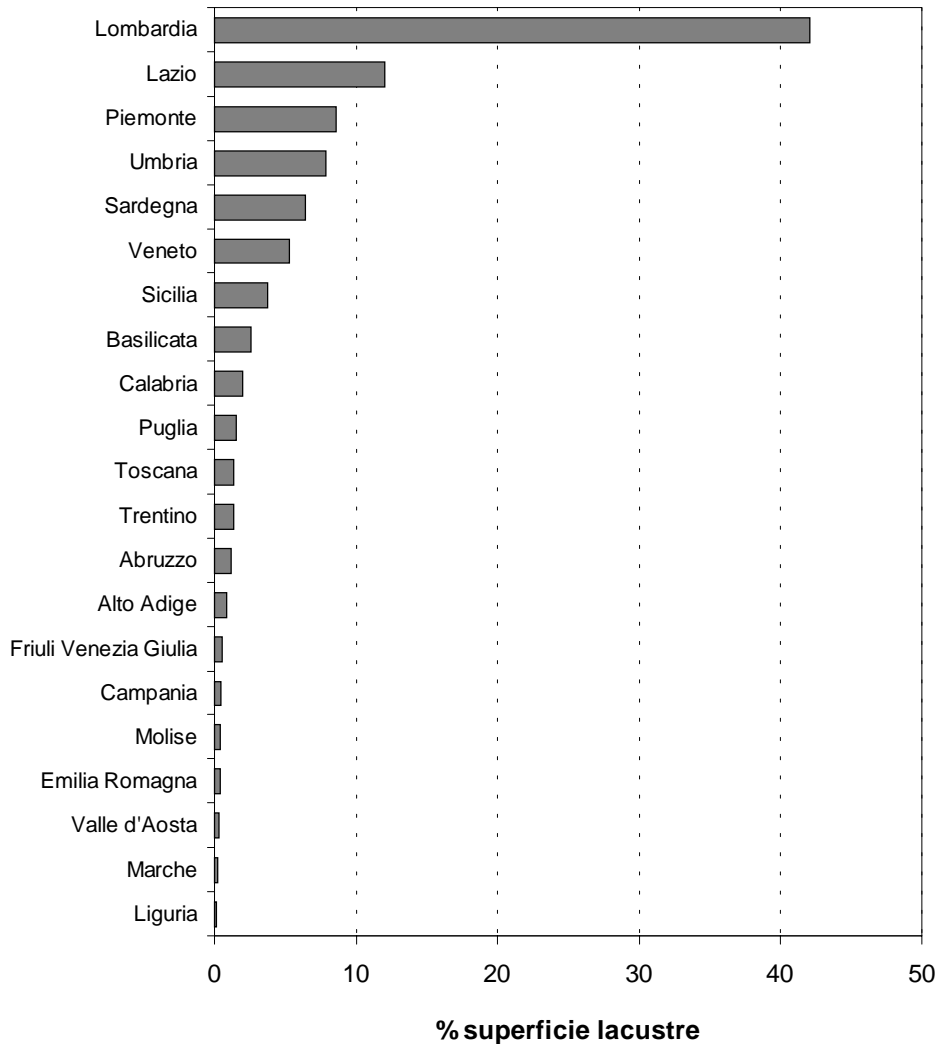


Figura 1. – Ripartizione regionale delle superfici dei laghi considerati dal Progetto LIMNO.

Per quanto riguarda la superficie dei singoli ambienti considerati da LIMNO la frequenza maggiore si ha al di sotto di $0,5 \text{ km}^2$, limite inferiore di riferimento per i laghi naturali significativi secondo la Legge 152/99, valore che sale ad 1 km^2 per gli invasi. La diversa scelta censoria, rispetto alla nuova Legge per la tutela delle acque, è da ascrivere al fatto che il criterio considerato dal Progetto LIMNO nella scelta dei laghi fa riferimento alla vecchia normativa Legge 319/76 (Merli), sostituita in corso d'opera del Progetto LIMNO. In LIMNO la scelta è orientata più ad una valutazione generale delle caratteristiche limnologiche dei corpi lacustri, che ad una individuazione di criteri gestionali, ed è quindi data particolare attenzione anche ad ambienti lenticci minori, ma di rilevante interesse dal punto di vista scientifico.

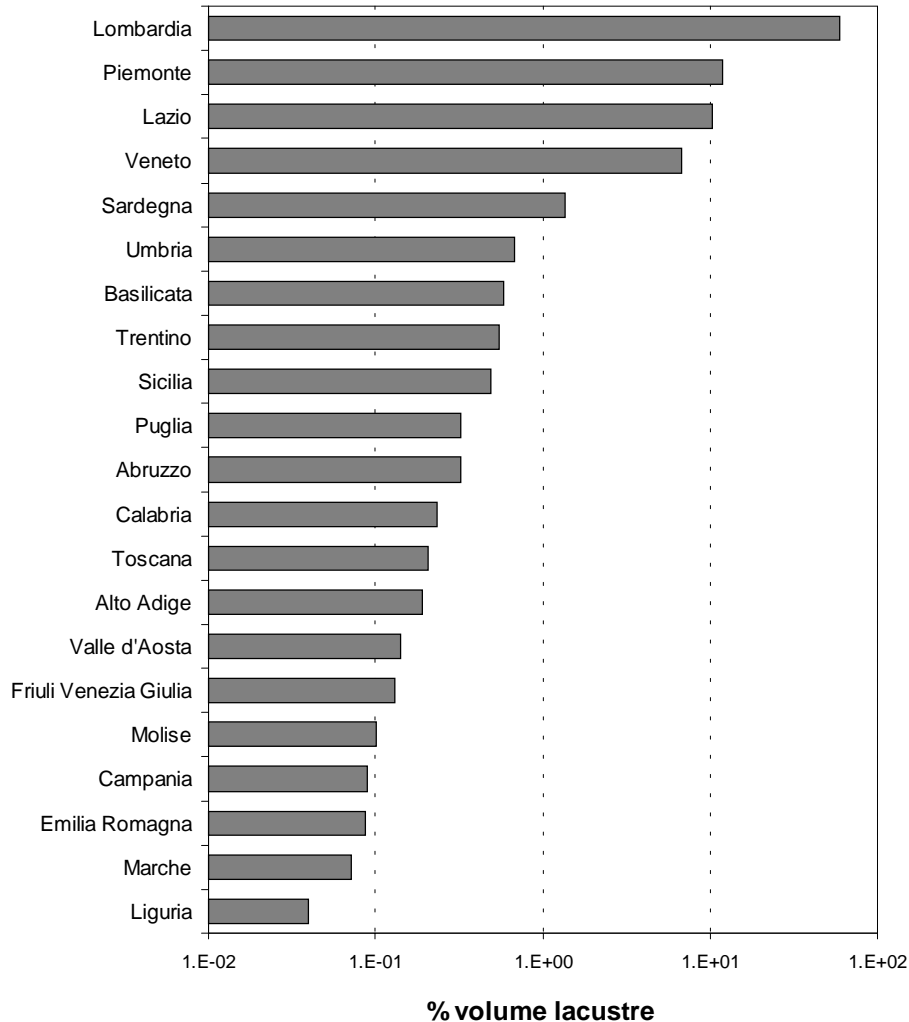


Figura 2. – Ripartizione regionale dei volumi dei laghi considerati dal Progetto LIMNO.

La superficie media dei laghi è circa 5 km^2 . Solo 5 (Lago di Garda, Lago Maggiore, Lago di Como, Lago Trasimeno e Lago di Bolsena) superano i 100 km^2 e complessivamente i 7 laghi più estesi (Garda, Maggiore, Como, Trasimeno, Bolsena, Iseo, Bracciano e Lugano) coprono il 62 % della superficie lacustre nazionale. Rispetto al volume ben 64 laghi su 400 hanno una capacità $\leq 2 \cdot 10^6 \text{ m}^3$, mentre solamente 3 superano abbondantemente i 10 km^3 (Lago di Garda, Lago Maggiore e Lago di Como) e da soli rappresentano il 72% del volume complessivo nazionale.

In termini generali l'Italia presenta quindi un elevato numero di ambienti artificiali o naturali ampliati (circa il 70% dei Laghi LIMNO, che diventano oltre il 78 % se tale frazione si riferisce ai soli laghi censibili in base al D.Lgs 152/99). Questa evidenza numerica lascia trasparire in modo efficace l'importanza del ruolo gestionale attivo delle acque che è necessario mettere in campo per salvaguardare la qualità di queste risorse, il

cui destino d'uso è sempre meno destinato alla produzione energetica [20], mentre cresce la domanda di utilizzi a fini potabili, ricreativi e per la produzione ittica [21]. La grande diffusione di riserve potabili nelle aree meridionali ed insulari, che vede nella Sardegna il caso più estremo con la totalità della dipendenza idrica da invasi, rappresenta uno dei maggiori fattori di preoccupazione per l'insorgenza di situazioni a rischio da cianobatteri, poiché le condizioni climatiche e la natura prevalentemente agricola dei bacini idrografici sono due dei principali fattori che possono portare alla eutrofizzazione delle acque e, quindi, a fioriture di alghe tossiche per l'uomo [22].

Le attuali informazioni disponibili nel Database LIMNO e loro potenziale utilizzo

Come anticipato negli obiettivi, questa nota vuole presentare il potenziale utilizzo di una raccolta di dati organizzata ed estesa a tutto il territorio nazionale ai fini della valutazione del rischio da fenomeni di sviluppo di specie algali tossiche.

Il database dei laghi è stato realizzato attraverso la ricerca di materiale bibliografico riguardante il periodo compreso tra il 1950 e il 1999, ma si è concentrato soprattutto sugli ultimi 30 anni. Partita dall'archivio utilizzato per la realizzazione del Catasto dei Laghi Italiani [5], la ricerca è stata estesa a diverse biblioteche specializzate nel settore ambientale, come quella del Reparto di Idrobiologia Applicata dell'IRSA di Brugherio, dell'Istituto Italiano di Idrobiologia di Pallanza, dell'Acquario Civico e del Museo Civico di Storia Naturale di Milano ecc. La ricerca è stata inoltre svolta sfruttando i servizi informatici dell'Area della Ricerca del CNR e dell'Acquario Civico di Milano che hanno permesso di consultare diverse banche dati on-line. Un ulteriore contributo è stato ottenuto dall'archivio bibliografico dei membri della SIte (Società Italiana di Ecologia) e sopra tutto attraverso la richiesta diretta a 42 ricercatori impegnati in studi limnologici.

Dall'insieme di queste ricerche è stato possibile selezionare oltre 2100 riferimenti bibliografici, e archiviare al Reparto IRSA di Brugherio circa 1400 pubblicazioni.

Nel DataBase LIMNO oltre alle informazioni di letteratura sono stati inseriti anche i dati prodotti dagli Enti territoriali preposti al monitoraggio ambientale (ASL, PMIP) e dalle Università, scelti in modo tale da coprire la quasi totalità de territorio nazionale. Un ulteriore contributo di informazioni proviene dal database dell'Istituto Italiano di Idrobiologia e dall'archivio del Laboratorio Chimico del Reparto IRSA di Brugherio. Complessivamente è stato realizzato un database della qualità delle acque costituito da circa 15.000 dati riguardanti, al dicembre 1999, 17 variabili chimiche, 4 variabili fisiche, 6 variabili biologiche e 3 relative alla balneazione. Sono state inoltre considerate 5 variabili morfometriche. Queste 35 variabili rappresentano circa il 10% di quelle inserite nel database, ma per le restanti l'informazione disponibile è ancora scarsa e frammentaria.

I dati sono riferiti al massimo rimescolamento invernale, considerato come periodo più significativo dell'anno. I valori sono riportati generalmente come medie aritmetiche sulla colonna d'acqua o nei laghi stratificati come medie ponderali sui volumi della

colonna epilimnica ed ipolimnica. Nei pochi casi in cui non erano disponibili i dati alla massima circolazione è stata riportata la media annua.

Evoluzione e stato attuale della qualità delle acque lacustri italiane

Per questa nota è stata realizzata una elaborazione dei dati archiviati nel DataBase LIMNO per valutare in modo sintetico lo stato attuale dei laghi dal punto di vista trofico e indagare quale sia la disponibilità di informazioni relative alle fioriture da cianobatteri nei laghi italiani. La qualità delle acque lacustri italiane è stata valutata, per tre variabili trofiche (fosforo totale, clorofilla *a* e trasparenza), confrontando nel tempo la percentuale di laghi rispetto a quelli campionati che rientrano nelle classi di concentrazione definite dall'OECD [10], aggregando l'informazione per periodi decennali, nei primi 20 anni, e quinquennali per il periodo più recente. La figura 3 mostra, considerando le concentrazioni del fosforo totale quale indice primario dello stato trofico, che nei tre decenni considerati sembra evidenziarsi una diminuzione degli ambienti iper-eutrofici, che dal 16% del decennio 1970-79 sono passati al 11% negli anni '80 ed attualmente al 6%. Contemporaneamente sono diminuiti i laghi ultra-oligotrofici, che dal 21% degli anni '80 sono attualmente il 9%. Al contrario sono aumentati i laghi mesotrofici, che dal 29% circa del decennio 80-89 sono passati al 41% ed infine sono aumentati, raddoppiando, anche i laghi eutrofici. Questi dati rappresentano una tendenza dei laghi italiani a stabilizzarsi verso una condizione di meso-eutrofia.

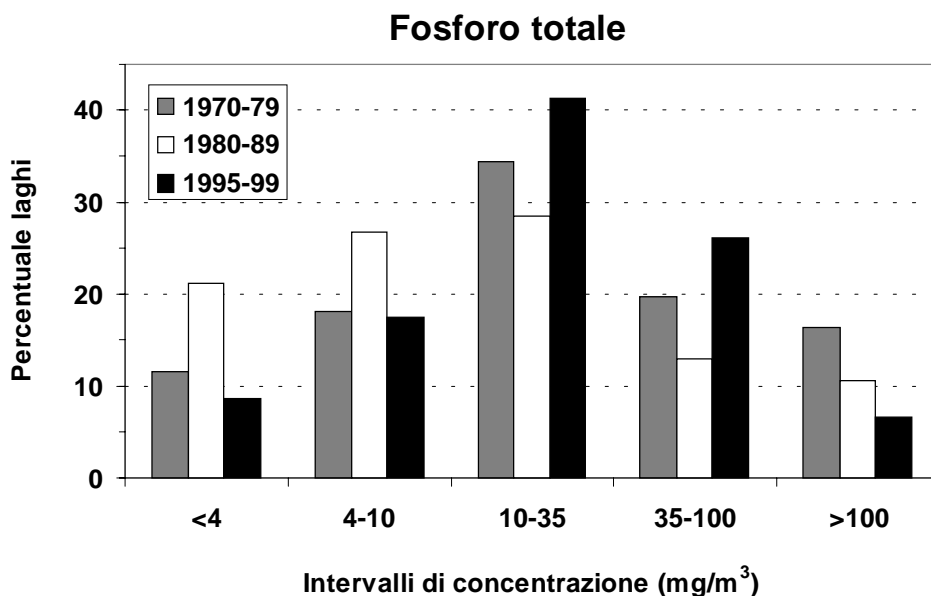


Figura 3. - Distribuzione di frequenza secondo le classi OECD (1982) delle concentrazioni di fosforo totale misurate nel periodo di massimo rimescolamento nei laghi italiani campionati tra il 1970 e il 1999.

Naturalmente una valutazione basata solo sulle concentrazioni di fosforo totale non è limnologicamente accettabile se non viene accompagnata da altri indicatori, come la clorofilla, legati all'attività biocenotica lacustre. Per questo motivo nella figura 4 è riportata la ripartizione percentuale della concentrazione di clorofilla a secondo le classi di trofia indicate dall'OECD [10]. La distribuzione delle frequenze conferma bene quanto già osservato per il fosforo totale. Infatti anche in questo caso viene mostrato un aumento al 35% della percentuale di laghi mesotrofici campionati nell'ultimo quinquennio rispetto a quelli dei 20 anni precedenti e, contemporaneamente, una diminuzione degli ambienti con concentrazione di clorofilla superiore a 25 mg/m³, dal 22% degli anni '80 al 7% dell'ultimo quinquennio.

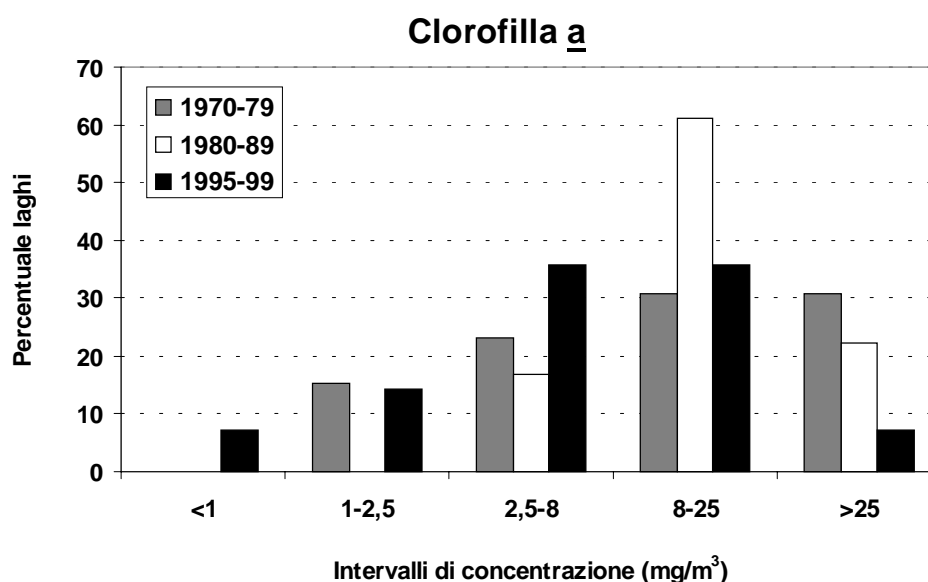


Figura 4. - Distribuzione di frequenza secondo le classi OECD (1982) delle concentrazioni di clorofilla a misurate nel periodo di massimo rimescolamento nei laghi italiani campionati tra il 1970 e il 1999.

L'andamento mostrato dalle concentrazioni di fosforo e di clorofilla a è confermato anche dalla trasparenza, un'altra importante variabile trofica di riferimento. La figura 5 mostra infatti la diminuzione degli ambienti ipereutrofici dal 39% del decennio 1980-89 al 7% dell'ultimo quinquennio, ed un aumento degli ambienti meso ed eutrofici. I primi dal 17% al 36% i secondi da 22% al 43%.

Le tre variabili considerate indicano concordemente che nel corso di 30 anni si è avuto un miglioramento complessivo della qualità trofica delle acque lacustri italiane ed in particolare con una tendenza generale verso la "mesotrofizzazione". Questa tendenza trova univoche spiegazioni nei numerosi interventi di riduzione dei carichi diretti ai corpi idrici effettuati a partire dalla metà degli anni ottanta, per limitare la concentrazione di fosforo nei corpi idrici maggiormente compromessi. La riduzione dei casi di ambienti ultra-oligotrofi è invece da ascrivere al degrado a cui è andata incontro

la loro qualità delle acque in assenza di una adeguata politica di preservazione, ma in presenza comunque di una crescita dei fattori di pressione antropica che ha interessato l'intero territorio nazionale, in particolare alle quote più basse proprio dove sono localizzati con maggiore frequenza i laghi considerati nel DataBase LIMNO.

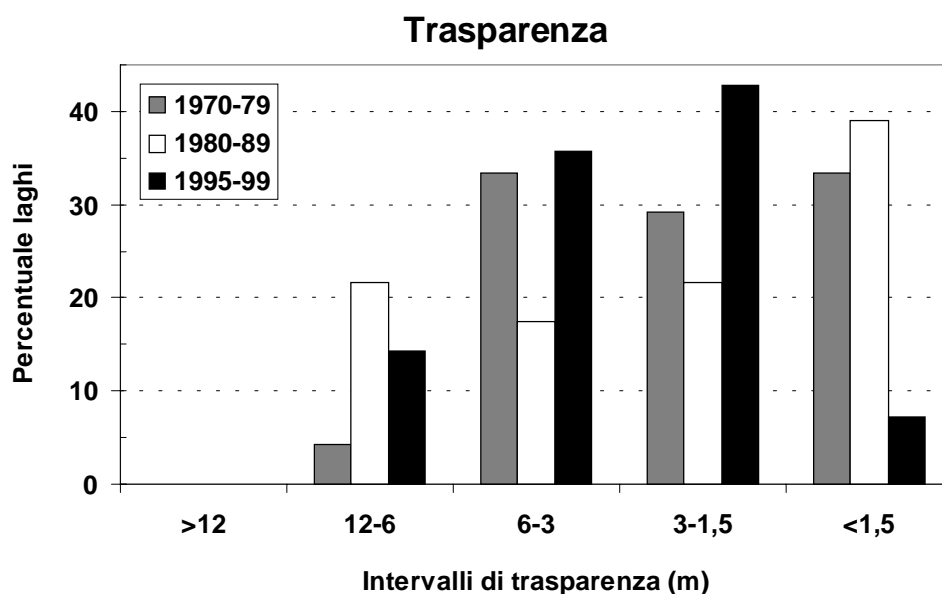


Figura 5. - Distribuzione di frequenza secondo le classi OECD (1982) della trasparenza misurata nel periodo di massimo rimescolamento nei laghi italiani campionati tra il 1970 e il 1999.

La disomogeneità del campione utilizzato, determinata principalmente dalla incompletezza del DataBase LIMNO al momento della elaborazione dei dati per questa nota, imponeva però di accertare la validità dei risultati ottenuti. Ciò è stato ottenuto estraendo un campione di dati di fosforo totale relativi a laghi campionati contemporaneamente nei tre periodi temporali considerati, che ha portato ad una valutazione della qualità delle acque dei laghi sicuramente più rispondente a criteri statistici elementari della omogeneità del campione.

L'esame di questo secondo campione, naturalmente più ridotto nel numero di casi rispetto al precedente, mostra che anche i valori mediani della concentrazione di fosforo totale sono diminuiti dal decennio 1970-79 ad oggi del 40%, passando da 42 mg/m³ a 30, nel decennio 1980-89, ed a 29 nel quinquennio 1995-99. Questi risultati sono in buon accordo con le mediane calcolate considerando tutti i laghi di cui si ha informazione e sono anche in accordo con la distribuzione della percentuale dei laghi per classi trofiche ottenuta da questi dati (Figura 3).

Il secondo confronto contemporaneo nel tempo è stato possibile solo per 25 laghi distribuiti tra Piemonte e Lombardia. Questo risultato, certamente condizionato dalla frequenza maggiore (71% in volume e 51% in superficie) di laghi in queste due regioni, conferma comunque che esiste un problema di scarsa ripartizione della informazione

sulla qualità delle acque lacustri, con un accentramento prevalente verso gli ambienti dell'Italia settentrionale. Infatti la raccolta delle informazioni bibliografiche, valutato attraverso il numero di citazioni per lago per un totale di circa 4600 raggiunto al Dicembre 1999, indica chiaramente che solo 7 laghi hanno una letteratura sufficiente a descriverne la qualità, mentre più di 140, avendo un numero di citazioni inferiore a 5, non hanno informazione tale per essere pienamente considerati (Figura 6) e, in modo ancora più allarmante, per poco meno di un quarto dei quattrocento laghi non si è reperita alcuna informazione!

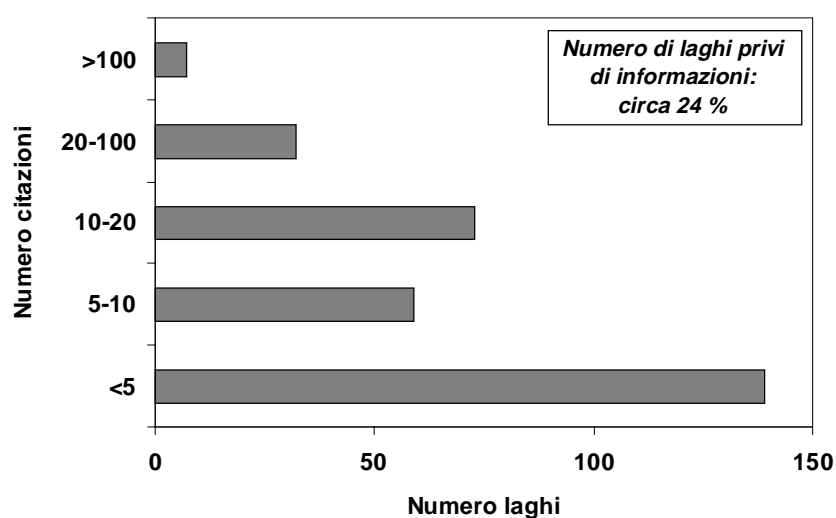


Figura 6. - Distribuzione di frequenza della quantità di informazione (espressa come numero di citazioni nelle pubblicazioni) archiviata nel DataBase LIMNO al Dicembre 1999.

Considerazioni e prospettive gestionali ai fini della prevenzione delle fioriture dei cianobatteri

Bloom di cianobatteri nei laghi vengono segnalati periodicamente in Italia [23,24] ed in taluni casi la situazione porta a valutare a rischio la destinazione ad uso potabile e balneabile delle acque di questi corpi idrici. Negli anni '90 ne sono stati segnalati diversi tra i quali, per dimensione del corpo lacustre, spicca nell'Italia settentrionale il caso del Lago d'Iseo che a metà agosto del 1997 è stato coinvolto in una fioritura di *Anabaena flos-aquae* di notevoli dimensioni. La fioritura ha interessato le acque attorno alla costa sull'intero perimetro ed è durata sino a settembre inoltrato [23]. Il fenomeno, anche se leggermente più contenuto, si è ripetuto nella tarda estate dell'anno successivo (Garibaldi, in questo Rapporto). Altre situazioni note e ricorrenti sono segnalate nei laghi della Sardegna, dove il pericolo persiste costantemente. Nell'estate 1998, ad

esempio, lo sviluppo particolare del fenomeno nel Lago Liscia (Sechi, in questo Rapporto), nel quale si sono verificate morie di pesci, ha portato ad imputare a questa causa anche alcune morie di bovini, che probabilmente si erano abbeverati nelle acque lacustri. Altre segnalazioni sono note per piccoli laghi della Lombardia (Lago di Pusiano) e, tra i grandi laghi in quello di Garda (Salmaso, comunicazione personale). Di rilievo sembrano essere anche i casi segnalati nei laghi siciliani (Barone, in questo Rapporto), e sicuramente analoga si presuppone la situazione per i laghi dell'Italia centrale, in quanto lo sviluppo massivo dei cianobatteri è condizionato generalmente da acque con temperatura superiore a 20°C, concentrazione in fosforo totale tipica di laghi produttivi e acque calme.

I risultati ottenuti dall'elaborazione preliminare dei dati raccolti nel DataBase LIMNO sembrano quindi contrastare con l'apparente incremento della frequenza delle segnalazioni di fioriture di cianobatteri nelle acque lacustri italiane. In realtà, come accade sovente in questi casi, con il crescere della conoscenza del fenomeno ed in particolare quando esso presenta un forte rischio potenziale per la salute umana, cresce l'interesse verso il fenomeno e con esso crescono le segnalazioni di eventi che prima passavano inosservati o non compresi.

La realtà che è invece da sottolineare è quella che, salvo casi sporadici, manca una conoscenza capillare e completa del fenomeno della diffusione delle alghe tossiche in Italia. La situazione, come mostrato in precedenza, non migliora di molto se si tenta di stabilire un quadro dettagliato delle concentrazioni dei nutrienti nelle acque lacustri, considerato il loro ruolo primario nel fenomeno. La mancanza, infatti, ancora oggi di una banca dati completa ed aggiornata dei dati di qualità delle acque lacustri, che comunque il progetto LIMNO non potrà in nessun modo colmare perché esso raccoglie l'informazione esistente, riduce notevolmente le possibilità di pianificare a livello centrale possibili strategie di intervento.

Come affermato da Chourus e Mur [25] l'unica azione con elevata probabilità di successo nella prevenzione delle fioriture è il controllo dei fattori scatenanti l'eutrofizzazione delle acque. Naturalmente in questo caso le misure che possono essere intraprese hanno come obiettivo i carichi in ingresso del fosforo, ma le stesse misure consentono simultaneamente di ridurre anche i carichi di azoto originati nel bacino imbrifero. I nutrienti entrano nei corpi lacustri attraverso scarichi superficiali di origine antropica, oppure attraverso i corsi d'acqua o per il ruscellamento dalle aree agricole, dalle superfici naturali e da quelle lastricate (strade, aree urbane ecc.). In Italia l'attenzione fino ad oggi è stata rivolta in particolare al controllo ed al trattamento dei reflui urbani ed alla riduzione dei tenori di fosforo nei detersivi, secondo una strategia tracciata da due importanti normative: la Legge 319/76 e la Legge 7/1986 [26]. Trascurate e forse sottovalutate sono state fino ad ora le altre sorgenti che, con il contenimento di quelle urbane e metaboliche, hanno assunto una importanza relativa elevata e che possono essere la causa del mancato recupero dello stato trofico, come è ad esempio attualmente mostrato nella maggior parte dei laghi lombardi di medie dimensioni [3].

Altri fenomeni, quali i carichi interni determinati in condizioni di anossia dal rilascio di nutrienti dai sedimenti, possono influire negativamente sul recupero della qualità

della acque lacustri, riducendone od arrestandone la velocità di recupero a valori di fosforo tipici di una trofia intermedia (meso-eutrofia), ma comunque potenzialmente pericolosi per lo sviluppo di anomale fioriture di alghe.

La prevenzione implica comunque anche il costante monitoraggio della qualità delle acque. Come dimostrato in questa nota il monitoraggio delle acque lacustri italiane è fortemente lacunoso sia in termini numerici sia in termini di ambienti sottoposti ad indagini, ma ancora più per la limitata accessibilità delle informazioni. Naturalmente non si vuole in questa sede affermare che parte degli enti preposti ai controlli non conducono il lavoro di monitoraggio, bensì si vuole sottolineare che esiste una forte mancanza di coordinamento delle iniziative che per il passato ha come risultato la quasi impossibilità di poter ricostruire l'evoluzione trofica lacustre. In Lombardia, ad esempio [3], per solo circa 1/6 dei laghi è stato possibile ricostruire l'evoluzione trentennale delle concentrazioni del fosforo totale, variabile che è di gran lunga quella tradizionalmente più misurata nelle acque lacustri. Ciò invece non è stato possibile, per lo stesso gruppo di laghi, per l'azoto totale, perché questa è una delle variabili meno determinate.

La pianificazione di una strategia nazionale per il contenimento e la prevenzione dei fenomeni di fioriture da cianobatteri dovrà quindi considerare almeno i seguenti punti:

- sviluppare in modo completo e coerente con quanto indicato dalla nuova normativa sulle acque (D.Lgs. 152/99), che considera il fosforo tra i macrodescrittori, quale variabile di importanza strategica nel monitoraggio dei laghi;
- avviare a livello nazionale una raccolta informatizzata dei dati prodotti dal monitoraggio costante delle acque lacustri. Tale raccolta, di cui uno degli esempi può essere il DataBase LIMNO, deve essere facilmente disponibile per l'intera comunità scientifica e per gli enti di controllo al fine di conoscere nel tempo come evolvono le caratteristiche trofiche dei laghi italiani;
- completare le misure di risanamento delle acque secondo i piani regionali già avviati. La pianificazione degli obiettivi di qualità dei nuovi piani di risanamento e di quelli non ancora realizzati dovrà comprendere anche interventi che considerino tra i fattori di rischio l'insorgenza dei fenomeni di cianobatteri e/o altre alghe tossiche.

In altre parti di questo volume le note che trattano degli aspetti biologici del fenomeno dei cianobatteri potranno indicare altre esigenze gestionali. Appare però evidente che solo un lavoro di studio e di prevenzione improntato ad una forte interdisciplinarietà nella valutazione di questo fenomeno consentirà di ottenere dei significativi risultati. Proprio questo appare, in realtà, il problema prioritario che deve essere oggi affrontato.

Conclusioni

La mancanza di una segnalazione razionale e continua di fioriture di cianobatteri nelle acque lacustri, ed ancor prima di una reale capacità di conoscenza del fenomeno, porta alla conclusione che ancora oggi non è nota l'entità del problema in Italia. Le strutture regionali e provinciali (ARPA e APPA) non sono generalmente attrezzate ad affrontare il fenomeno e, quando esso si presenta, devono quindi organizzare le loro

attività, spesso in condizioni di emergenza, senza disporre di riferimenti adeguati. Anche il nuovo Piano di Monitoraggio dell'ANPA [27] non considera aspetti di questo genere nella sua struttura operativa generale, anche se va rilevato che restano aperte le possibilità che vengano allestiti progetti mirati in tal senso da parte del Centro Tematico Nazionale per le acque interne.

Si deve quindi concludere che la scarsa conoscenza della diffusione dei fenomeni di proliferazione di fioriture di alghe tossiche in Italia rappresenta un grave fattore di rischio ambientale con importanti implicazioni di tipo sanitario.

Considerando che il principale fattore influente (fosforo) sullo sviluppo delle fioriture mostra importanti segni di riduzione dei suoi valori medi nei laghi italiani, come mostrato in questa nota, non deve comunque essere trascurata la tendenza opposta di nuovi fattori quali i cambiamenti climatici. L'aumento della temperatura dei laghi anche in Italia è un fatto oramai dimostrato [3,28], mentre sembrano affacciarsi altri fenomeni associati alla tropicalizzazione del clima (modifiche delle biocenosi lacustri ecc.).

In tutti i casi si può concludere che, riprendendo la considerazione riportata inizialmente, essendo la prevenzione l'unica strada che presenta il migliore successo nel contenimento delle fioriture di cianobatteri [2], non resta che proseguire con determinazione nell'azione di riduzione di carichi di nutrienti, siano essi di natura urbana, che agricola o di altre fonti, già iniziata negli anni ottanta in Italia e che sembra aver fornito importanti risultati. La preservazione ed il recupero di una buona qualità delle acque lacustri non assume più una sola valenza ambientale, ma diviene infatti strategica anche per la salute umana.

Bibliografia

1. GOPAL, B. & WETZEL R.G. (Eds.). *Limnology in developing countries*. SIL, Internat. Assoc. Limnol., Int. Sci. Publ., Vol. 1, 1995, 230 p.
2. CHORUS, I. & BARTRAM J. (Eds.). 1999. *Toxic Cyanobacterial in water. A guide to their public health consequences, monitoring and management*. E&FN SPON, London.
3. TARTARI, G., MARCHETTO A. & COPETTI D. *Qualità delle acque lacustri della Lombardia alle soglie del 2000*. Fondazione Lombardia per l'Ambiente, Ricerche&Risultati, 2000, (in stampa).
4. GERLETTI, M. & MARCHETTI R. *Relazione sulla qualità delle acque superficiali in Italia. Acque lacustri. I Conferenza Nazionale sulla qualità delle acque in Italia. Urbino*. Rapporto IRSA, 42c, 1973, 129 p.
5. GAGGINO, G. F. & CAPPELLETTI E.. 1984. Catasto dei laghi italiani. *Quaderni Ist. Ric. Acque*, 72. 974 p.

6. PROVINI, A., MARCHETTI R. & TARTARI G. 1992. The Italian lakes: trophic status and remedial measures. In: Guilizzoni, P., G. Tartari and G. Giussani (Eds), *Limnology in Italy. Mem. Ist. Ital. Idrobiol.*, 50: 147-170.
7. TARTARI, G. & MARCHETTO A. Qualità delle acque lacustri italiane: Progetto LIMNO. Atti del Convegno "I laghi come risorsa per lo sviluppo", Milano, 16 Ottobre 1998, 2000, (In stampa)
8. VOLLENWEIDER, R.A. Scientific fundamentals of the eutrophication of lakes and flowing waters, with particular references to nitrogen and phosphorus factors in eutrophication. OECD Technical Report DAS/CSI/68.27, 1968, 159 p.
9. MEYBECK, M., CHAPMAN D. & HELMER R. *Global freshwater quality. A first Assessment. GEMS: Global Environment Monitoring System*. WHO/UNEP, Blackwell Ltd Publ., Oxford, UK, 1989, 306 p.
10. OECD. Eutrophication of waters. Monitoring assessment and control. OECD Publication No. 42077, Paris, 1982, 154 p.
11. CHAPRA, S.C. & RECKHOW K.H.. *Engineering approaches for lake management. Vol. 2: Mechanistic modeling*. Butterworth Publ., Boston, Ann Arbor Sci. Book, 1983, 492 p.
12. SAKAMOTO, M. 1966. Primary production by phytoplankton community in some Japanese lakes and its dependence on lake depth. *Arch. Hydrobiol.*, 62: 1-28.
13. PREMAZZI, G. & CHIAUDANI G. Ecological quality of surface waters. Quality assessment schemes for European Community lakes. J.R.C. Commission of the European Communities, 19921, 24 p. (EUR 14563 EN)
14. SAS, H. (Coordinator). *Lake restoration by reduction of nutrient loading: Expectations, experiences, extrapolations*. Academia Verlag, Richarz GmbH. St. Augustin, 1989, 497 p.
15. STOCKNER, J. Global warming, picocyanobacteria and fisheries decline: is there a connection? Atti 12° Congr. AIOL. Isola di Vulcano, 18-22 Settembre. 1996, Vol. II: 29-37.
16. MUR, L.R., SKULBERG O.M. & UTKILEN H. Cyanobacteria in the environment. In: I. Chorus and J. Bartram (Eds.). *Toxic Cyanobacterial in water. A guide to their public health consequences, monitoring and management*. E&FN SPON, London, 1999, p. 15-40.
17. KUIPER-GOODMAN T., FALCONER I. & FITZGERALD J. Human health aspects. In: I. Chorus and J. Bartram (Eds.). *Toxic Cyanobacterial in water. A guide to their public health consequences, monitoring and management*. E&FN SPON, London, 1999, p. 114-153.
18. GIUSSANI, G., DE BERNARDI R., MOSELLO R., ORIGGI I. & RUFFONI T.. 1986. Indagine limnologica sui laghi alpini d'alta quota. *Documenta Ist. Ital. Idrobiol.*, 9. 415 p.
19. MOSELLO, R., CALDERONI A. & DE BERNARDI R. 1997. Le indagini sulla evoluzione dei laghi sudalpini svolte dal C.N.R. Istituto Italiano di Idrobiologia. In R. Mosello & G. Giussani (Eds.). *Documenta Ist. ital., Idrobiol.*, 61: 19-32.

20. ENEA. La situazione energetico-ambientale del paese - Rapporto 1999. ENEA-MICA, 2000. In: <http://sigserv2.sede.enea.it/cnea/>.
21. IRSA. 1999. Un futuro per l'acqua. . *Quaderni Ist. Ric. Acque*, 109, 235 p.
22. WHO. *Guidelines for drinking water quality. Volume 2: Health criteria and other supporting information*. World Health Organization, Geneva. 1996.
23. GARIBALDI, L., MEZZANOTTE V., BRIZZIO M. C., ROGORA M. & MOSELLO R. 1999. The trophic evolution of Lake Iseo as related to its holomixis. *J. Limnol.*, 58: 10-19.
24. SECHI N. & LUGLIE' A. 1998. Phytoplankton in Sardinia reservoirs. *Giorn. Bot. Ital.*, 130: 977-994.
25. CHORUS, I. & MUR L. Preventive measures. In: I. Chorus and J. Bartram (Eds.). *Toxic Cyanobacterial in water. A guide to their public health consequences, monitoring and management*. E&FN SPON, London, 1999, p. 235-273.
26. MARCHETTI, R. 1987. L'eutrofizzazione. *Un processo degenerativo delle acque*. Collana scientifica Franco Angeli. Milano. 319 pp.
27. ANPA. Progetto per il monitoraggio delle acque superficiali. Dipartimento Stato dell'Ambiente, Controlli e Sistemi Informativi. Settore Monitoraggio e Controlli Integrati, 2000, 80 p.
28. AMBROSETTI, W. & BARBANTI L.. 1999. Deep water warming in lakes: an indicator of climatic change. *J. Limnol.*, 58: 1-9.

*Direttore dell'Istituto Superiore di Sanità
e Direttore responsabile: Giuseppe Benagiano*

*Stampato dal Servizio per le attività editoriali
dell'Istituto Superiore di Sanità, Viale Regina Elena, 299 - 00161 ROMA*

*La riproduzione parziale o totale dei Rapporti e Congressi ISTISAN
deve essere preventivamente autorizzata.*

Reg. Stampa - Tribunale di Roma n. 131/88 del 1° marzo 1988

Roma, dicembre 2000 (n. 4) 2° Suppl.

*La responsabilità dei dati scientifici e tecnici
pubblicati nei Rapporti e Congressi ISTISAN è dei singoli autori*