

ISTITUTO SUPERIORE DI SANITÀ

**Dinamica di specie algali tossiche
nei laghi di Albano e Nemi**

Milena Bruno, Valentina Messineo,
Daniela Mattei, Serena Melchiorre

Dipartimento di Ambiente e Connessa Prevenzione Primaria

ISSN 1123-3117

Rapporti ISTISAN

04/32

Istituto Superiore di Sanità

Dinamica di specie algali tossiche nei laghi di Albano e di Nemi.

Milena Bruno, Valentina Messineo, Daniela Mattei, Serena Melchiorre
2004, 55 p. Rapporti ISTISAN 04/32

I risultati dello studio di 27 mesi (gennaio 2001 – aprile 2003) compiuto dall'Istituto Superiore di Sanità hanno evidenziato la presenza di due popolazioni stabili dell'alga Cianoficea tossica *Planktothrix rubescens* nei laghi di Albano e Nemi nel Lazio. La Cianoficea è in grado di produrre microcistine, potenti epatotossine che agiscono come agenti inibitori degli enzimi proteinfosfatasi 1, 2A e 3, presenti in tutti gli organismi viventi. Poiché si pensa che le proteinfosfatasi possano invertire l'azione della proteina chinasi C, la loro inibizione si traduce nell'attivazione di una serie di processi metabolici che hanno risvolti acuti, riguardanti la disgregazione delle membrane citoplasmatiche, e cronici, riguardanti l'attivazione di oncogeni che innescano tumori gastrointestinali ed epiteliali. Le ipotesi di recupero dei due laghi dalla pesante compromissione trofica che li caratterizza rappresentano l'unica strada per impedire la dominanza e le fioriture di *P. rubescens* o di altre Cianoficee tossiche e per rivalutare un territorio prezioso dal punto di vista paesaggistico e storico.

Parole chiave: Cianoficea, Tossine algali, Eutrofizzazione

Istituto Superiore di Sanità

Toxic algal species dynamic in the lakes of Albano and Nemi.

Milena Bruno, Valentina Messineo, Daniela Mattei, Serena Melchiorre
2004, 55 p. Rapporti ISTISAN 04/32 (in Italian)

The results of a 27 month study (January 2001– April 2003) carried out by the Istituto Superiore di Sanità (the Italian National Institute of Health) have pointed out the presence of two steady populations of the toxic Cyanophyceae *Planktothrix rubescens* in the lakes of Albano and Nemi in Latium. *Planktothrix rubescens* produces microcystins, powerful hepatotoxins that can inhibit Protein Phosphatases types 1, 2A and 3 (PP1, PP2A and PP3). As PPs are thought to reverse the protein kinase C action, their inhibition means the activation of several metabolic processes whose consequence are cell membrane breaking up and activation of epithelial and gastrointestinal oncogenes. Lakes recovering strategies are the only way to prevent *P. rubescens* and other toxic Cyanophyceae from developing harmful blooms and to revalue a really precious environment.

Key words: Cyanophyceae, Algal toxins, Eutrophication

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

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

Presidente dell'Istituto Superiore di Sanità e Direttore responsabile: *Enrico Garaci*
Registro della Stampa - Tribunale di Roma n. 131/88 del 1° marzo 1988

Redazione: *Paola De Castro, Sara Modigliani e Sandra Salinetti*
La responsabilità dei dati scientifici e tecnici è dei singoli autori.

© Istituto Superiore di Sanità 2004

INDICE

Introduzione	1
Fioriture algali	2
Ruolo dell'eutrofizzazione.....	2
Diffusione delle fioriture tossiche nel mondo e conseguenze ecologiche.....	4
Fioriture algali tossiche d'acqua dolce.....	5
Tossine rilevate più frequentemente in Italia	7
Saxitossine.....	7
Anatossine.....	8
Tossine meno diffuse.....	9
Microcistine.....	9
Effetti delle microcistine su altri organismi viventi.....	11
Caratteristiche di <i>Planktothrix rubescens</i>	15
Ecofisiologia.....	15
Metabolismo fotosintetico.....	16
Capacità di sospensione.....	17
Indagini pregresse sui luoghi dello studio	19
Fase sperimentale: campionamento, parametri e metodi di analisi	25
Campionamento.....	25
Siti di campionamento.....	25
Procedura di campionamento.....	26
Trasporto dei campioni.....	28
Rilevazione dei parametri chimico-fisici.....	28
Determinazione della temperatura.....	28
Determinazione del pH.....	28
Determinazione della conducibilità.....	29
Determinazione dell'ossigeno disciolto.....	29
Metodi di analisi.....	30
Sedimentazione e conta delle cellule.....	30
Determinazione della clorofilla a.....	30
Determinazione spettrofotometrica.....	31
Estrazione tossicologica e biosaggio.....	31
Prova su HPLC.....	32
Risultati dello studio	33
Nemi.....	33
Albano.....	39
Considerazioni sui risultati sperimentali	45
Conclusioni	49
Bibliografia	52

INTRODUZIONE

A seguito della grande fioritura algale tossica rilevata dall'Istituto Superiore di Sanità (ISS) nel lago Albano a febbraio del 2001, l'uso delle acque del lago è stato interdetto durante i mesi invernali-primaverili, ed è stato programmato l'ampliamento degli studi previsti sulle biomasse algali del lago per valutare la dinamica di popolazione della specie tossica riscontrata, ed esaminare possibili strategie di recupero dell'ecosistema lacustre. A questo scopo nel luglio dello stesso anno è stata stipulata una convenzione tra ISS e Regione Lazio che ha dato luogo allo studio sistematico dei laghi Albano e Nemi, quando anche in quest'ultimo sono state rilevate le fioriture tossiche a carico della specie *Planktothrix rubescens*.

La Cianoficea *Planktothrix rubescens* produce una tossina (microcistina-RR) la cui azione interessa fegato, polmoni e reni, e che è implicata nell'attivazione di oncogeni che innescano tumori epatici, gastrointestinali ed epiteliali. La particolare microcistina identificata è ritenuta avere maggiore tossicità alle dosi più basse rispetto alle altre varianti della stessa classe, prodotte da altre specie.

Le caratteristiche in oggetto configurano un pericolo per la vita di occasionali bagnanti che ingeriscano modiche quantità dell'acqua in caso di forte fioritura, o di sportivi predisposti ad attacchi allergici che nelle stesse condizioni percorrano il lago inalando la tossina volatile. L'idoneità delle acque dei laghi di Albano e Nemi all'uso ricreativo, agricolo e di riserva naturale è pregiudicata dal grave grado di eutrofizzazione instauratosi progressivamente nel corso dei decenni passati e dalla presenza della specie algale tossica in questione, capace di fioriture imponenti durante i mesi autunnali ed invernali.

La nicchia ecologica di *Planktothrix rubescens* è caratterizzata dalla presenza di un alto rapporto N/P (azoto totale/fosforo totale) nelle acque.

I dati chimici dai laghi di Albano e Nemi dimostrano l'esistenza in questi di un rapporto variante nei mesi freddi da 15 a 30 e più. La riduzione di questo rapporto è attualmente il sistema più sicuro per prevenire le fioriture tossiche dell'alga.

Le immissioni di sali nutrienti nei laghi appaiono differenziate durante l'anno: mentre nel lago Albano si ipotizza oltre al resto una probabile contaminazione delle falde acquifere che arrivano al lago, nel lago di Nemi l'immissione depona per apporti da dilavamento dei terreni di serra durante i periodi di concimazione di fiori/ortaggi.

Lo studio-controllo dell'ISS ha avuto come obiettivo l'inquadramento del grado di compromissione trofica delle acque al fine di poter pianificare, nell'ambito di un gruppo di lavoro creatosi presso l'Assessorato alle Politiche ambientali, interventi sanitari e ambientali necessari al risanamento di ambedue i bacini idrici.

FIORITURE ALGALI

Ruolo dell'eutrofizzazione

La contaminazione di inquinanti organici e inorganici in corpi idrici a basso idrodinamismo determina il fenomeno dell'eutrofizzazione, la cui risposta biologica è l'incremento della biomassa algale: ridondanti coperture di macrofite e macroalghe andranno a rivestire i fondali, mentre il fitoplancton si svilupperà nella zona eufotica.

Si parla di "fioriture eutrofiche" quando la massa di alghe microscopiche è costituita per l'80-90% da una o due specie, rivelando una condizione patologica dell'ambiente. Le fioriture fisiologiche, stagionali, sono composte in genere dalle classi e non sono mai monospecifiche, ma esprimono una grande varietà di generi nell'ambito di una classe o di una divisione. Le Cianofitee si possono considerare in fioritura quando il numero delle loro cellule supera la soglia di un milione per litro.

Prima di tutto è necessario fare una netta distinzione tra ambienti naturalmente eutrofizzati e ambienti eutrofizzati per cause di tipo antropico o culturale.

L'eutrofizzazione naturale richiede tempi molto lunghi, migliaia di anni, ed è un processo irreversibile: nel caso di un lago, ad esempio, si avrà un riempimento di materiali solidi e fini sospensioni trasportati dai suoi immissari, che ne diminuiranno progressivamente la profondità.

I bassi fondali che circondano le rive poi promuoveranno la vegetazione acquatica che aumenterà il materiale organico particolato nell'acqua.

Alle canne palustri che principalmente popolano questi habitat, successivamente si sostituiranno dicotiledoni terrestri, come le graminacee; in seguito a questi eventi un lago si trasforma in palude e infine in sistema terrestre.

Le acque lacustri naturalmente eutrofizzate, presentando un elevato indice di diversità biologica, sono ecosistemi definiti in buona salute.

Tuttavia ambienti chiusi e ristretti, proprio come laghi e fiumi, risentono facilmente di alterazioni provocate dall'uomo: l'eutrofizzazione culturale o antropogenica è un fenomeno molto più rapido e per lo più reversibile; esso è una forma di inquinamento dovuta ad un eccesso di nutrienti in invasi di non adeguata ampiezza, profondità e ricambio idrico.

Fertilizzanti agricoli, rifiuti urbani, industriali e zootecnici contenenti fosforo e potassio, fluendo inevitabilmente nei laghi e negli stagni, oltre che nei mari, sono i responsabili di un esagerato *input* di questi nutrienti.

L'effetto di un esasperata immissione di queste sostanze in un corpo d'acqua provoca un eccesso di produttività primaria e un'abbondante riproduzione algale. Una produzione primaria eccessiva comporta la formazione di una biomassa esuberante rispetto a quella che può essere utilizzata dagli organismi erbivori. L'eccesso di produzione, non più controllato dalla catena del pascolo, fa sì che l'energia fissata venga trasferita alla catena del detrito, causando l'anossia delle acque.

Durante l'estate poi la situazione peggiora essendoci più ore di luce: l'attività fotosintetica aumenta causando una diminuzione dell'indice di trasparenza dell'acqua dovuto a un aumento della densità microalgale.

Il processo aerobico di decomposizione delle alghe morte consuma ossigeno e così i pesci muoiono progressivamente per asfissia.

Col graduale esaurimento di ossigeno i normali processi ossidativi per il riciclaggio della materia organica morta vengono sostituiti da processi di putrefazione anaerobici. I corpi d'acqua che versano in tali condizioni presentano formazioni di schiume algali o tappeti di alghe

flottanti, diminuzione della trasparenza dell'acqua e deossigenazione dell'ipolimnio ed emettono un forte odore di idrogeno solforato.

L'eutrofizzazione può dunque danneggiare la vita acquatica, sia in modo diretto con le morie di pesci, sia in modo indiretto modificando la struttura della comunità acquatica: specie più bisognose di ossigeno e più sensibili a certe sostanze tossiche soccomberanno a specie più resistenti, che vedranno ridotta la competizione per lo spazio vitale e si accresceranno indisturbate.

I fosfati regolano il livello di produttività primaria nelle acque dolci.

Schindler ipotizzò che gli ecosistemi lacustri avessero evoluto dei meccanismi naturali per compensare le carenze di azoto e di carbonio, ma non le carenze di fosforo (Odum, 1988), esso infatti è il fattore limitante l'attività fotosintetica di questi ambienti.

Gli effetti negativi dell'eutrofizzazione coinvolgono la vita acquatica, ma anche l'uso potabile e l'uso ricreativo della risorsa idrica.

Le acque ad uso potabile provengono da serbatoi, da bacini idrici artificiali e talvolta anche da fiumi. Il pH, il BOD (*Biochemical Oxygen Demand*), il COD (*Chemical Oxygen Demand*), la concentrazione di ossigeno e la concentrazione di ammoniaca sono alcuni dei fattori presi in considerazione per analizzare e qualificare la bontà di queste acque.

L'ossigeno disciolto nell'ipolimnio in alti livelli durante tutto l'anno e la conducibilità spesso bassa sono caratteristiche chimiche tipiche di acque oligotrofiche, mentre ossigeno basso o nullo durante i periodi di stagnazione e conducibilità a volte molto alta sono tratti comuni di acque eutrofiche. C'è inoltre da rimarcare che basse profondità medie, piccoli volumi ipolimnici e temperatura tiepida nell'ipolimnio sono caratteri frequenti negli invasi eutrofici, mentre i laghi oligotrofici sono in genere profondi, con grandi ipolimni freddi.

L'OECD (*Organisation for Economic Co-operation and Development*) ha stabilito nel 1985 dei valori ben precisi per valutare il grado di trofia di un corpo d'acqua (Tabella 1).

Tabella 1. Schema di classificazione della trofia delle acque interne

Parametro	Grado di trofia			
	oligotrofia	mesotrofia	eutrofia	ipertrofia
P tot µg/L	8	26,7	84,4	750-1200
N tot µg/L	661	753	1875	
Chl a µg/L	1,7	4,7	14,3	100-150
Trasparenza Disco Secchi (m)	9,9	4,2	2,45	0,4-0,8

Uno degli effetti più pericolosi generati dall'eutrofizzazione è la comparsa di imponenti fioriture di alcune specie di Cianofite che si verificano quando il pH è neutro o lievemente alcalino e le acque sono ricche di nutrienti; una eventuale deficienza di azoto può far emergere specie azotofissatrici eterocistate o in anaerobiosi.

La presenza di nutrienti, luce e temperatura opportuna porta all'aumento della produttività primaria, che determina la progressiva scomparsa dei nitrati e dell'anidride carbonica disciolta con utilizzo dell'anidride carbonica del bicarbonato e innalzamento del pH dell'acqua. L'intervallo di pH tollerato dalle Cianofite acquatiche va da 6 a 10: valori troppo elevati causano la precipitazione del ferro, non più assimilabile dalle Cianofite, e pH troppo bassi non consentono più l'assimilazione del molibdeno, necessario ai coenzimi delle nitrogenasi e nitrato-reduttasi, coinvolte nella fissazione dell'azoto atmosferico. Inoltre la clorofilla di queste alghe è più sensibile agli ambienti acidi.

Diffusione delle fioriture tossiche nel mondo e conseguenze ecologiche

Le alghe sono organismi capaci di vita autotrofa, ossia sono in grado di produrre gli zuccheri necessari al metabolismo cellulare tramite l'uso dell'energia solare nella sintesi biochimica, a partire dall'acqua e dall'anidride carbonica. La classificazione delle alghe (Bold & Wynne, 1985) le divide in dieci divisioni: le Cianofite, le Proclorofite, le Clorofite, le Carofite, le Euglenofite, le Feofite, le Crisofite, le Pirofite, le Rodofite, le Criptofite, e un ultimo gruppo che raccoglie tutte le incerte attribuzioni.

Il fitoplancton è il primo anello della catena alimentare acquatica, e nello stesso tempo, tramite la fotosintesi è il produttore primario della materia organica.

Il succedersi delle stagioni durante l'anno causa sia nei mari che nei laghi una successione di popolamenti nel fitoplancton, composto da tutte le alghe planctoniche unicellulari e coloniali. In inverno nei laghi si possono trovare scarse popolazioni di Diatomee con cellule quiescenti di specie preminenti in primavera (es. *Asterionella* ed eventualmente *Melosira italica* nelle acque ricche di nutrienti), come anche alcune Desmidiacee.

All'inizio della primavera nei laghi oligotrofici si apre la successione delle Diatomee, con i generi *Cyclotella* e *Tabellaria*, mentre nei laghi a più alta trofia sono più frequenti le Crisoficee. In primavera inoltrata diventano dominanti le Cloroficee.

All'inizio dell'estate persistono le Cloroficee, e fanno la loro comparsa i Dinoflagellati. In tarda estate questi gruppi sono sostituiti da alghe verdi flagellate e non flagellate, unicellulari e coloniali, dalle Desmidiacee alle Cianoficee. All'inizio dell'autunno si ritrovano le Cianoficee, spesso come gruppo largamente dominante nei laghi eutrofici, e frequentemente le stesse specie di Diatomee preminenti nelle fioriture primaverili.

Oltre questa successione causata dalle condizioni stagionali, si verifica anche una stratificazione verticale delle varie divisioni nella colonna d'acqua, dovuta principalmente alla diversa tolleranza dell'intensità luminosa da parte dei vari pigmenti fotosintetici, e alla capacità di spostamento per raggiungere gli strati d'acqua dove sono più concentrati i nutrienti.

Così alla superficie si riscontrano prevalentemente le Cianoficee, i cui pigmenti colorati proteggono bene la clorofilla dall'azione denaturante dei raggi UV, e che possono così beneficiare della massima intensità luminosa. Nei piccoli ambienti di pozza si riscontrano più facilmente i Dinoflagellati. Alle medie profondità dominano le Cloroficee, con l'eccezione dei laghi in primavera e autunno, delle acque correnti fredde e delle sorgenti, in cui sono prevalenti le Crisoficee.

Nello strato profondo a contatto con la superficie del termocline dominano le Diatomee.

Su circa 5.000 specie algali fitoplanctoniche, circa 300 specie possono talvolta presentarsi in numero così elevato da cambiare il colore dell'acqua, come capita nelle "maree rosse".

Diverse decine di queste specie hanno la capacità di produrre potenti tossine, e alcune di queste sono concentrabili nei pesci e nei molluschi, essendo in grado così di raggiungere l'uomo anche attraverso la catena alimentare.

Nel mondo è stata notata un'aumentata frequenza di fioriture tossiche dal 1970 in poi, aumento dovuto alla maggiore attenzione scientifica per le specie tossiche, al maggior sfruttamento delle acque costiere per l'acquacoltura, all'impulso dell'eutrofizzazione culturale e di condizioni atmosferiche insolite, e anche al trasporto di cisti quiescenti nell'acqua di stiva delle navi, o negli stock di pesci per gli allevamenti.

Come già detto, fioriture fisiologiche si verificano stagionalmente anche nel fitoplancton di acque oligotrofiche, ma sono composte in genere da intere classi (es. Diatomee) e non sono mai

monospecifiche, anzi esprimono una grande varietà di generi nell'ambito di una classe o di una divisione; oltre a ciò, anche il contenuto medio di clorofilla *a* è basso.

La frequenza delle fioriture tossiche si è accresciuta in tutto il mondo, dal 1970 in poi: una nazione che costituisce esempio da questo punto di vista è il Giappone, che in soli dieci anni è passato da 44 fioriture annue rilevate (1965) a più di 300 fioriture (1975). Questa evidenza è senz'altro dovuta in parte anche all'aumentata attenzione degli osservatori scientifici per le specie tossiche, ma altrettanto certamente all'impulso raggiunto dall'eutrofizzazione culturale, all'accresciuta utilizzazione delle acque costiere per l'acquacoltura e alle condizioni atmosferiche che mutano.

C'è da osservare, però, che anche in presenza di una fioritura algale causata da una specie tossica, la produzione di tossine non è automatica. In una frequenza sia pur molto ridotta (all'incirca l'1% dei casi), ci si può trovare di fronte ad un ceppo non produttore, che limita i danni della sua presenza alle conseguenze di una biomassa algale elevata; a questo riguardo non si può dare per scontata la presenza di tossine rinunciando alla verifica tossicologica.

Le fioriture di cianobatteri tossici, in particolare, possono avere effetti considerevoli a diversi livelli: organismi, popolazioni, comunità e intero ecosistema. Esse possono durare giorni o mesi. Sebbene una grande biomassa si possa accumulare sulla superficie, anche la popolazione di cianobatteri dispersi nell'epilimnio e nel metalimnio può essere di grande importanza ecologica. I cianobatteri tossici hanno causato morie di pesci, di fauna selvatica e di bestiame in molti paesi, ma gli effetti ecologici delle tossine vengono studiati solo da pochi anni. I cianobatteri tossici possono colpire gli organismi attraverso il cibo, l'acqua bevuta, le branchie; ma possono colpire anche i processi ecologici fondamentali, la produzione primaria (a causa della formazione di fioriture che la inibiscono perché non permettono il passaggio della luce), l'attività microbica. Molti studi mostrano gli effetti negativi dei cianobatteri sullo zooplancton: le fioriture di cianobatteri sono spesso associate al declino dei cladoceri e possono essere tossiche o poco appetibili come fonte di cibo o possono produrre deterrenti per gli erbivori (in particolare le forme coloniali e filamentose sembrano costituire un cibo povero per molti pascolatori). Inoltre riducono il tasso riproduttivo dei rotiferi. I molluschi e altri invertebrati filtratori possono essere influenzati e possono diventare tossici per i predatori. Inoltre i cianobatteri tossici riducono la normale attività batterica così che la riciclaggio dei nutrienti è ridotta e la materia organica si può accumulare sulla superficie dei sedimenti alterando le condizioni del fondo; il decadimento di schiume di cianobatteri, poi, può deteriorare la qualità dell'acqua e può essere associato a batteri o microrganismi potenzialmente tossici o patogeni.

Fioriture algali tossiche d'acqua dolce

Quando si parla di casi di tossicità algale in ambienti d'acqua dolce, ci si riferisce pressoché esclusivamente alle conseguenze dovute all'affermazione di alcuni taxa di Cianoficee. Dopo la prima segnalazione di Francis in Australia (1989), su una fioritura di *Nodularia spumigena* Mertens, che aveva provocato la morte di pecore, orsi, maiali e cani, molti altri eventi simili, coinvolgenti altre specie di Cianoficee, sono stati riportati in tutto il mondo (Gorham & Carmichael, 1990).

Le Cianoficee sono un gruppo di organismi procariotici comprendenti circa 150 generi e oltre 2000 specie (van den Hoek *et al.*, 1995). Sono i procarioti fotosintetizzanti caratterizzati dalla maggior diversificazione e i più diffusi: sono presenti nell'atmosfera, in acque con la più varia salinità e temperatura (fino a 73-74 °C), nel suolo, sulle rocce e nelle loro fessure. La capacità di molti generi di fissare l'azoto atmosferico ha fatto sì che diversi organismi sviluppassero delle relazioni simbiotiche con le Cianoficee: ad esempio licheni con *Gloeocapsa*

e *Nostoc*; sfagni, muschi e angiosperme con *Nostoc* e *Anabaena*. La capacità di fissare l'azoto atmosferico tramite il complesso delle nitrogenasi, che è spesso localizzato in cellule opportunamente modificate, le eterocisti, è comunque una spesa energetica molto elevata per gli individui. In generale le specie vi ricorrono quando nell'ambiente comincia a scarseggiare seriamente l'azoto: le eterocisti allora aumentano e producono tra l'altro ammoniaca.

Hanno un apparato fotosintetico simile, nella funzione e nella struttura, a quello dei cloroplasti degli eucarioti, grazie alla presenza della clorofilla *a*, responsabile della fotosintesi ossigenica. Per questa caratteristica e per la morfologia di tipo "algale", il loro trattamento tassonomico viene fatto utilizzando le regole dell'*International Code of Botanical Nomenclature* (1972); le caratteristiche di batteri consentono però anche una loro classificazione sui principi dell'*International Code of Bacteria Nomenclature* (1975). Entrambe le metodologie di classificazione possono essere considerate appropriate.

Le Cianofitee sono colonizzatori primari dei suoli, a cui aggiungono materia organica e di cui prevengono l'erosione incipiente.

Le specie di Cianofitee non incluse in un rivestimento della parete cellulare rigido, sono capaci di movimento. Questa capacità è tipica di molte specie filamentose ma anche di alcune unicellulari: il movimento viene generato tramite mucillagine secreta da minuti pori della membrana cellulare, o tramite contrazioni ad onda sulla superficie della cellula. I filamenti o tricomi hanno fibrille nella parete cellulare le cui contrazioni generano onde di propulsione, come ad esempio nel caso di *Oscillatoria*. Il citoplasma contiene tra l'altro anche vacuoli di gas, che appaiono come granuli rossastri, deputati alla regolazione del galleggiamento cellulare e alla protezione del DNA cellulare per mezzo di un'azione di ombreggiante.

La nutrizione in questa Divisione è molto varia: comprende specie ad autotrofia pura, specie con eterotrofia facoltativa (al buio, su substrati di glucosio, saccarosio, fruttosio), e diverse specie capaci di fotoeterotrofia in caso di luce ridotta. Diverse specie richiedono vitamina B12 per crescere. Alcune specie unicellulari in condizioni di nutrizione ottimale raggiungono un tempo di generazione di 3-8 ore.

Gli ordini sono tre: *Chroococcales*, *Chamaesiphonales*, *Oscillatoriales* (il primo e il terzo raccolgono le famiglie in cui sono state riscontrate specie con produzione di tossine).

L'elenco delle specie tossiche comprende attualmente circa 60 specie (Elenco Ministero della Salute, 1997); alcune di queste possono presentarsi con ceppi tossici e non. Poiché la produzione di tossine è il risultato di informazioni genetiche specifiche, questo carattere ha un grande significato tassonomico (Skulberg & Skulberg, 1985)

Fioriture tossiche dovute a *Microcystis aeruginosa*, *Planktothrix rubescens*, *Anabaena flos-aquae* e altre specie di Cianofitee produttrici di tossine sono segnalate da decenni in tutto il mondo, con frequenze alte in stati come il Minnesota, l'Australia, il Giappone e il Sudafrica.

TOSSINE RILEVATE PIÙ FREQUENTEMENTE IN ITALIA

In Italia il problema delle fioriture di alghe tossiche è sempre stato affrontato sotto l'aspetto della dinamica delle popolazioni algali, ma, almeno fino agli anni '80, la questione non era mai stata esaminata da un punto di vista tossicologico. Eventuali morie di pesci, infatti, venivano sempre spiegate con la loro asfissia, determinata dalla tipica mancanza di ossigeno nei corpi idrici eutrofizzati.

Solo nel 1982 venne emanato il DL.vo n. 470/1982 che obbligava gli organi preposti ad eseguire analisi quantitative e qualitative su alghe e loro prodotti provenienti da corpi idrici adibiti alla balneazione.

Il controllo si estese anche alle acque potabili nel 1988 con il DL.vo n. 236/1988: tale decreto definiva le alghe un parametro su cui andavano eseguiti controlli occasionali "con frequenza dipendente dal giudizio insindacabile non degli operatori, ma delle autorità competenti; non solo quelle di controllo tecnico sul territorio, ma anche quelle di gestione amministrativa" (Bruno *et al.*, 2002).

Nel 1985 vennero segnalati all'ISS i primi casi di fioritura algale a sospetto rischio tossicologico. Col pervenire di segnalazioni di fioriture di alghe tossiche, non essendo disponibili fino ad allora standard di riferimento per queste tossine algali, venne raccolta dal 1993 una banca dati che riportasse tutti gli eventi di fioriture algali comunicate all'ISS.

Molte tossine algali, purtroppo, non vengono bloccate dai comuni processi depurativi: il loro ingresso in acque destinate a consumo umano può essere impedito soltanto con specifici filtri o trattamenti, che però risultano essere spesso molto costosi.

In Italia, oggi, 7 regioni su 20 sono interessate da queste fioriture a carattere tossico; le tossine riscontrate con maggiore frequenza nelle acque italiane sono le saxitossine, le anatoxine e le microcistine.

Saxitossine

Le saxitossine o PSP (*Paralytic Shellfish Poisoning*) sono composti guanidici eterociclici (Figura 1).

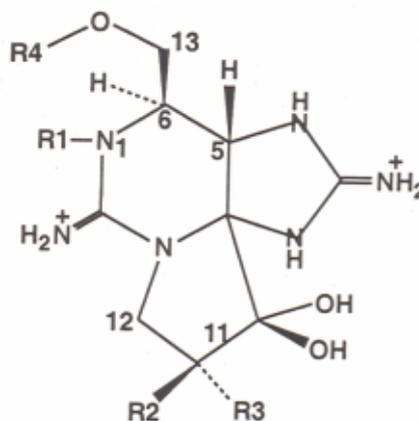


Figura 1. Struttura generale delle saxitossine

Il loro bersaglio è neuronale, si legano al sito 1 del canale di voltaggio del sodio, bloccandone il flusso. Il rapido insorgere dei sintomi nell'uomo si esplicita con debolezza respiratoria, dei movimenti bulbari e delle estremità. Entro 30 minuti si avverte pizzicorio o insensibilità alle labbra, gradualmente estendentesi al viso e al collo: prurito alla punta delle dita dei piedi e delle mani, mal di testa, irrequietezza, gastroenterite acuta. I riflessi tendinei inizialmente sono preservati, sono presenti aritmie cardiache e sopravviene spesso il coma da cui il paziente, se tempestivamente intubato, si riprende in 4 o 5 giorni. Trattamento: lavanda gastrica e respirazione artificiale. Non vanno somministrati rilassanti.

Anatossine

Le anatossine sono ammine secondarie bicicliche (2-acetil-9azabicyclo(4.2.1)non-2-eni) (Figura 2). La famiglia delle anatossine, appartenente al grande gruppo degli alcaloidi tossici, si divide in due gruppi: l'anatossina-a, potente agente paralizzante neuromuscolare per depolarizzazione post-sinaptica che si lega stabilmente al recettore nicotinico dell'acetilcolina, e l'anatossina-a(s), che funziona come anticolinesterasi irreversibile.

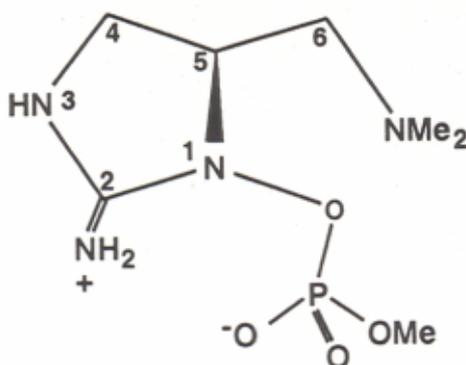


Figura 2. Struttura generale della anatossina-a

Queste proprietà hanno favorito lo studio delle tossine a scopi clinici, e la creazione di derivati sintetici, a tossicità ridotta, per la cura di particolari sindromi degenerative come la demenza di Alzheimer, in cui la degenerazione dei neuroni produttori l'acetilcolina, che non può essere assunta dall'esterno a causa dell'estrema degradabilità, viene compensata dalla somministrazione di derivati dell'anatossina-a, che non viene degradata facilmente. In questo modo viene rallentata la degenerazione mentale. Discorso simile si ha per la miastenia grave: in questo caso l'anatossina-a sostituisce la produzione carente o l'azione ormai troppo blanda dell'acetilcolina, inviando un messaggio molto più energico alle fibre muscolari in via di degenerazione.

La presenza di anatossina-a nelle acque, a causa di fioriture di specie produttrici, è spesso causa di morie ittiche, di anafidi e mammiferi.

Tossine meno diffuse

Tossine d'acqua dolce a minore frequenza di ritrovamento sono la cilindropermopsina e la glenodinina.

La cilindropermopsina (Figura 3) è anch'essa una tossina prodotta, da sola o insieme ad altre, da varie specie di Cianofitiche (*Cylindropermopsis raciborskii*, *Aphanizomenon ovalisporum*, *Umezakia natans*). La tossina, un alcaloide a struttura guanidica tricyclica combinata con un idrossimetiluracile, agisce inibendo la sintesi del glutathione ridotto endocellulare, causando gravi epatoenteriti per necrosi nelle porzioni centrilobulari dei lobuli epatici (Harada *et al.*, 1994).

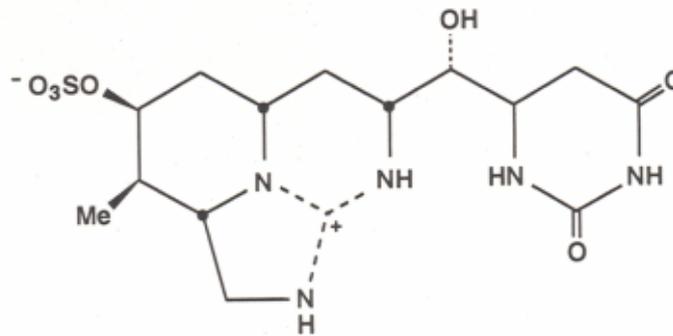


Figura 3. Struttura della cilindropermopsina

Le glenodinine, o polonicumtossine, sono tre ittiotossine (PT-A; -B e -C) di recente scoperta. Prodotte dal dinoflagellato *Peridinium (Protoperidinium) polonicum*, sono alcaloidi con nucleo tetraidropiridinico tipici attivi a pH alcalino (8,7-9,2) in presenza di alti livelli di ossigeno disciolto, come conseguenza di una elevata attività fotosintetica. Le morie avvengono quindi per lo più di pomeriggio o di sera, e subito dopo le fioriture intense, non contemporaneamente. Le polonicumtossine hanno un alto livello di presenza al declino delle fioriture, perché vengono rilasciate dal citoplasma delle cellule in lisi, e permangono a lungo nell'acqua. La minima quantità di cellule sufficiente per uccidere i pesci va da 2.400 a 24.000 in ambiente alcalino (pH 8,8, test su *Oryzias latipes*; Oshima *et al.*, 1989). Attualmente in Europa *Peridinium polonicum* è stato segnalato in Germania e in due laghetti alpini italiani.

Microcistine

Alcuni membri del genere *Microcystis*, *Oscillatoria*, *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Nostoc*, *Nodularia*, *Cylindropermopsis* producono tossine letali che includono epatotossine cicliche penta- ed eptapeptidi, gli alcaloidi epatotossici con un gruppo guanidico ciclico e gli alcaloidi neurotossici.

Le microcistine sono eptapeptidi monociclici a basso peso molecolare, costituiti da un carboidrato di bloccaggio, sette residui aminoacidici e una metilammina (Figura 4). Gli eptapeptidi si diversificano tra loro mediante due L-aminoacidi variabili (L-R1 e L-R2) e finora sono state isolate in tutto il mondo ben 60 varianti diverse della prima tossina identificata, la microcistina-LR.

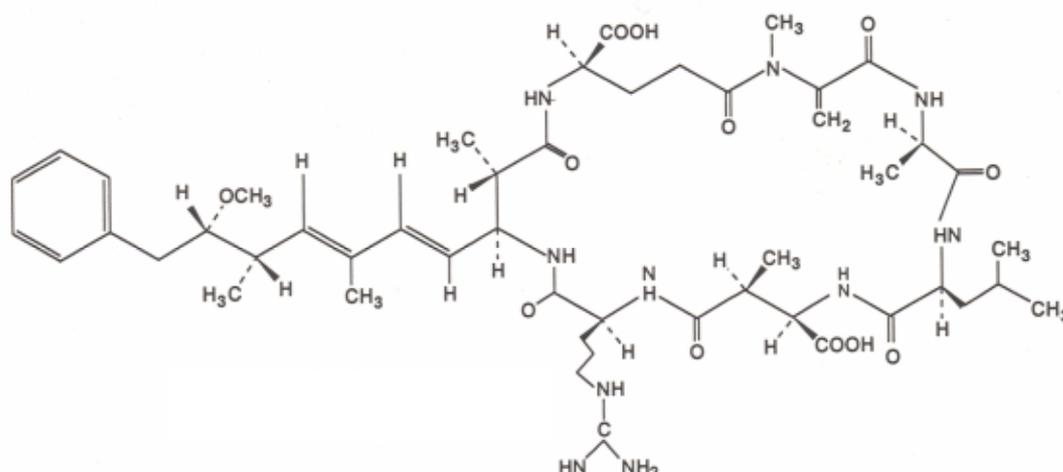


Figura 4. Struttura della microcistina - LR

Le microcistine agiscono come agenti inibitori degli enzimi proteinfosfatasi 1, 2A e 3, presenti in tutti gli organismi viventi. Poiché si pensa che le proteinfosfatasi possano invertire l'azione della protein chinasi C, la loro inibizione si traduce nell'attivazione di una serie di processi metabolici che hanno risvolti acuti, riguardanti la disgregazione delle membrane citoplasmatiche, e cronici, riguardanti l'attivazione di oncogeni che innescano tumori gastrointestinali ed epiteliali. Inoltre, dato che la proteinfosfatasi 1 defosforila il dominio citoplasmatico del recettore della 6 mannosio fosfatasi responsabile del trasporto intracellulare delle molecole degli enzimi, la sua inibizione può danneggiare la combinazione del ligando con il recettore e può rendere impossibile il trasporto delle particelle dell'enzima ai lisosomi. I danni istologici acuti riguardano il fegato, organo bersaglio principale, i polmoni e i reni. Le lesioni si esplicano con necrosi degli epatociti, emorragie estese con distribuzione perilobulare, scollamento delle cellule e perdita dell'architettura tissutale, rottura delle cellule dell'endotelio sinusoidale e scomparsa degli spazi di Disse tra epatociti e sinusoidi. Alcuni studi sull'influenza della microcistina -YR sull'attività di alcuni enzimi proteolitici nel fegato di topo (Lankoff & Kolataj, 2001) hanno dimostrato che la tossina inibisce la sintesi delle proteasi catepsina D e L (che prendono parte alla degradazione della struttura proteica delle cellule), arginilaminopeptidasi, dipeptidasi II e IV e causa una labilizzazione (ossia indebolimento della stabilità) delle membrane lisosomiali provocando l'autodistruzione delle cellule e severi danni epatici. Recenti acquisizioni relative ad esperimenti su cellule luteali di ratto, mostrano l'attività bloccante esercitata dalle microcistine sulle serina-treonina proteinfosfatasi delle cellule del corpo luteo, ipotizzando un ruolo di queste tossine nella depressione della sintesi ed escrezione del progesterone (Ford *et al.*, 1996).

La sintomatologia umana prevede, dopo tre-quattro ore dall'ingestione, gastralgia, vomito, diarrea e dolori intestinali. Più tardi subentrano febbre, emicrania acuta, dolori muscolari e articolari, debolezza, aumento delle γ gt, indice di danno epatico, lieve o nessun aumento di alanino-amino transferasi e fosfatasi alcalina: la fase epatica dura circa due giorni, a cui seguono uno-due giorni di fase letargica con severi squilibri elettrolitici, e una fase diarroica di cinque giorni. A parità di peso le microcistine sono 20 volte più potenti dell'acido cianidrico e della stricnina, e nel biosaggio su topo causano la morte dei topi di 18-24 g di peso entro 30 minuti-3 ore dopo inoculo intraperitoneale di 0,1-0,5 mL di tossina purificata in soluzione fisiologica.

Casi di morti umane sono stati segnalati in Brasile nel 1988 nello stato di Bahia, dove si sono prodotti 2.000 casi di gastroenterite, di cui 88 fatali in un periodo di 42 giorni, dovuti al consumo di acqua potabile resa eutrofica e contaminata da microcistine a seguito dell'inondazione provocata dalla grande diga di Itaparica, e nel 1996 nella cittadina di Caruaru, stato del Pernambuco, dove di 126 pazienti intossicati attraverso emodialisi utilizzando acqua di un vaso contaminato con microcistine, 60 decedettero entro un periodo di 5 mesi. I pazienti presentavano un tasso di microcistine nel siero di 0,001-0,010 µg/mL (1-10 µg/L).

Recentemente è stato dimostrato che la tossina somministrata intraperitonealmente ha rivelato una potente attività tumore promotrice nel fegato di ratto inizializzato con dietilnitrosamina (Nishiwaki *et al.*, 1992) e che le microcistine causano apoptosi in una varietà di linee cellulari umane e murine (Mc Dermott *et al.*, 1998), e apportano danni diretti al corredo genetico: dosi di microcistina -LR pari a 1 mg/mL causano significativa frammentazione del DNA nei fibroblasti embrionali di topo (Lakshmana *et al.*, 1998).

L'effetto cronico dato dall'assunzione di dosi subacute di microcistine per lungo periodo, essendo inibitori delle proteinfosfatasi (*Protein Phosphatases*, PP) di tipo 1 e 2A (PP1 e PP2A) che hanno un ruolo significativo nell'espressione dei geni coinvolti nella crescita cellulare, consiste in promozione di tumori epatici ed epiteliali, da sole o dopo inizializzazione con sostanze cancerogene, come ad esempio il dimetilbenzantracene o la dietilnitrosammina.

Studi epidemiologici condotti nei distretti cinesi di Qi-Dong e Haimen (Yu, 1989; Yu, 1995) hanno dimostrato la relazione tra tumore epatico primario e consumo di acque contaminate da microcistine: le persone che bevevano acqua proveniente da una pozza contaminata avevano un tasso di mortalità per carcinoma epatocellulare più alto (100 morti su 100.000) rispetto a persone che consumavano acqua non contaminata (meno di 20 morti su 100.000). Dopo il cambio della fonte di acqua potabile dalla pozza ad una sorgente non contaminata, il tasso di mortalità per carcinoma epatocellulare (HCC) si stabilizzava e diminuiva lentamente fino a raggiungere un livello comparabile a quello osservato nelle aree di controllo.

Queste evidenze indicano che le microcistine sono nuovi promotori di tumore epatico mediato attraverso l'inibizione dell'attività della PP1 e della PP2A. Ciò fornisce inoltre le prove che la via dell'acido ocaidaico è un meccanismo generale di promozione tumorale in vari organi.

Studi sulla somministrazione di microcistine in topi per via intranasale hanno dimostrato che singole dosi sub-acute, non tossiche, dopo 7 giorni di somministrazione giornaliera davano luogo ad un effetto cumulativo, con aumento della massa epatica pari a quello causato da una sola dose 16 volte maggiore (Fitzgeorge *et al.*, 1997).

Le microcistine nel topo danneggiano il fegato, secondariamente il rene, e provocano emorragie polmonari ed epatiche. Nell'uomo l'aspetto emorragico epatico non è predominante.

La dose per inalazione, causa di polmonite allergica per il topo, risulta perfettamente sovrapponibile alla dose per iniezione intraperitoneale, entrambe comunque notevolmente più dannose rispetto alla dose per ingestione.

Effetti delle microcistine su altri organismi viventi

Per quanto riguarda l'effetto delle microcistine sullo zooplancton, uno studio dell'Università di Zurigo ha evidenziato come specie non adattate alle tossine dei cianobatteri (*Thamnocephalus*, *Eudiaptomus*, ecc.) fossero molto suscettibili in termini di sopravvivenza alla loro presenza (Kurmayer *et al.*, 1999); inoltre è stato dimostrato che i consumatori primari, in particolare *Daphnia parvula*, se nutriti con cianobatteri tossici, sono in grado di accumulare microcistine ad un livello di 1,78 µg di tossina / 25 daphnidi (Zakaria A Mohamed, 1999) e sono quindi in grado di trasferirle ai livelli superiori della catena alimentare.

Inoltre i cianobatteri tossici possono rappresentare un alto rischio di contaminazione anche dei molluschi, qualora si presentino fioriture imponenti: mitili (es. *Mytilus galloprovincialis*) nutriti per 4 giorni con cianobatteri tossici e poi posti in acqua non contaminata, mostrano un livello massimo di microcistine di 10,7 µg/g di mitili peso secco durante il periodo di accumulo, fino a raggiungere i 16 µg di microcistine /g di mitili peso secco il secondo giorno del periodo di depurazione (Vasconcelos *et al.*, 1999), picco probabilmente dovuto alla reingestione di feci contaminate. Prove di bioaccumulazione nei molluschi d'acqua dolce (*Unio duoglasiae* e *Anodonta woodiana*) sono state ottenute anche in alcuni laghi giapponesi (Watanabe *et al.*, 1997).

Anche la fauna ittica mostra danni dovuti all'esposizione a microcistine: è stato dimostrato in uno studio americano di Zimba e Carmichael che queste tossine sono le responsabili delle numerose morie di pesci gatto (*Ictalurus punctatus*) che si verificano nei laghetti per acquacoltura in Mississippi, Alabama, Arkansas e Louisiana: i pesci esposti a fioriture di *Microcystis aeruginosa* morivano entro 24 ore e le loro autopsie rivelavano fegato e milza danneggiati e ricchi di microcistine. Anche le numerose morie di carpe riscontrate nel lago Aculeo, nel Cile centrale, sono riconducibili all'effetto di queste epatotossine, che tra l'altro influiscono anche sullo zooplancton nativo (Penaloza *et al.*, 1990): uno studio effettuato su questo lago ha infatti evidenziato che la morte della fauna ittica era dovuta alla perdita della capacità delle branchie di mantenere l'omeostasi nel mezzo interno dovuta all'effetto inibitore che le microcistine hanno sull'attività delle ATPasi dipendenti da Na⁺ K⁺, HCO₃⁻ e Ca⁺⁺ della frazione microsomiale delle branchie. L'inibizione risultava essere proporzionale alla dose di microcistina somministrata: la maggior inibizione di ciascun enzima, indotta con una concentrazione di microcistina pari a 4 µg/mL, era simile a quella prodotta da inibitori specifici per ogni ATPasi (es. la uabanina per l'ATPasi Na+K+ dipendente). Le due attività maggiormente suscettibili risultavano essere la Na+/K+ ATPasi e la Na+ ATPasi, entrambe correlate a pompe ioniche (Gaete *et al.*, 1994).

In particolare la Na+K+ ATPasi è stata approfonditamente studiata (Zambrano & Canelo, 1996) dopo essere stata trattata con microcistina-LR e acido ocaidaico per capire il meccanismo biochimico dell'inibizione: la tossina inattiva l'idrolisi K+ dipendente della fosforilazione della pompa Na+/K+ e il rilascio della uabanina legata: questi risultati indicano che le microcistine non solo bloccano l'idrolisi della proteina fosforilata sui residui serina-treonina, ma inibiscono anche la defosforilazione aspartica degli enzimi della pompa Na+.

Recenti studi sul fegato della trota arcobaleno (*Oncorhynchus mykiss*) nutrita con cianobatteri liofilizzati (*Microcystis aeruginosa*) alla dose di tossicità acuta di 700 µg/kg di peso corporeo, hanno evidenziato che i cambiamenti nella morfologia cellulare, l'inibizione delle protein fosfatasi, le emorragie intraepatiche e la necrosi degli epatociti rappresentano gli eventi primari nella tossicità indotta da microcistine e sembrano associati all'interazione reversibile della microcistina con le subunità catalitiche della PP1 e PP2A; mentre la morte cellulare per apoptosi rappresenta un evento secondario dovuto all'interazione covalente tra la microcistina e le proteinfosfatasi nucleari e cellulari (Fischer *et al.*, 2000).

Questi effetti sono comparabili con quelli riportati nei mammiferi, in particolare nei topi, e questo implica che le reazioni biochimiche che conducono a questa sequenza di eventi sono simili nelle due classi.

Un altro studio dello stesso autore (Fischer & Dietrich, 2000) ha dimostrato che nei ciprinidi, per esempio nella carpa (*Cyprinus carpio*), l'assimilazione della tossina è più efficiente che nei salmonidi, probabilmente a causa delle diverse abitudini alimentari, e che il meccanismo primario di morte cellulare è l'apoptosi: nella carpa a cui è stata somministrata una singola dose di *Microcystis aeruginosa* pari a 400 µg di microcistina -LR/kg di peso corporeo, sono stati osservati danni alle cellule del tubulo prossimale del rene e agli epatociti già dopo un'ora,

seguiti da cambiamenti patologici della mucosa intestinale a 12 ore dalla somministrazione della tossina. La dose di 500 µg di microcistina somministrata intraperitonealmente provoca la morte sia nei ciprinidi che nei salmonidi entro le ventiquattr'ore.

La LD₅₀ (*Lethal Dose 50%*) per la carpa può oscillare tra i 300 e i 500 µg /kg di peso corporeo, e per la trota tra i 400 e i 1000 µg/kg di peso corporeo.

I pesci, in generale, risultano essere più tolleranti alle alte dosi di microcistine e sopravvivono più a lungo rispetto ai mammiferi (26 ore per la trota rispetto a 1-2 ore per il topo, Kotak *et al.*, 1993) perché il tasso di perfusione del sangue attraverso il fegato è più basso nei pesci, meno di un quarto di quello dei mammiferi, e ciò riduce la dose iniziale di tossina che raggiunge il fegato nel pesce rispetto al topo (Kotak *et al.*, 1996). Anche la temperatura più bassa a cui vive il pesce contribuisce ad un assorbimento più lento della tossina. Comunque i pesci trattati con microcistina-LR mostrano un cambiamento di colorazione del dorso (da verde argenteo chiaro a verde oliva scuro), una perdita della coordinazione del nuoto e del controllo della galleggiabilità e una diminuzione della frequenza dei movimenti ventilatori opercolari.

Riguardo la possibilità di bioaccumulo di microcistine nei pesci e il conseguente rischio per la salute umana, un recentissimo lavoro brasiliano (Freitas De Magalhaes *et al.*, 2001) ha evidenziato che queste tossine si possono accumulare nei tessuti dei pesci (es. in *Tilapia rendalli*) usati per consumo umano: il tessuto muscolare può raggiungere concentrazioni di microcistine superiori al limite raccomandato dalla *World Health Organization* (WHO) per il consumo umano giornaliero TDI (*Threshold Daily Intake*) (0,04 µg/kg di peso) definito come la quantità accettabile di una potenziale sostanza tossica che può essere consumata giornalmente da un uomo adulto sano durante il periodo di vita.

L'esposizione dell'uomo a cianotossine può verificarsi attraverso diverse vie incluse la via dermica, inalatoria, intravenosa e orale; due sono le vie orali:

- ingestione diretta di acqua contenente cellule di cianobatteri e tossine;
- consumo di animali che hanno ingerito e accumulato tossine o di prodotti contaminati.

A questo proposito è molto recente la scoperta che alcuni prodotti di integrazione alimentare contenenti alghe blu-verdi (molto usate per i loro apparenti effetti benefici) possano contenere inavvertitamente microcistine: in un test dell'*Oregon Health Division* sui prodotti contenenti alghe blu-verdi sono state rinvenute microcistine in 85 degli 87 campioni esaminati; 63 campioni, cioè il 72%, superavano il limite stabilito di 1 µg di microcistine per grammo di prodotto. La tossina esaminata con HPLC (*High-Performance Liquid Chromatography*) è stata riconosciuta come microcistina-LR (Duncan *et al.*, 2000).

Notevoli implicazioni sulla salute umana ha, inoltre, la scoperta che anche le piante possono accumulare microcistine: è possibile che tessuti di piante commestibili esposte alla tossina possano costituire un vettore di esposizione alla tossina; infatti è stato dimostrato (Codd *et al.*, 1999) che colonie di *Mycrocystis aeruginosa* e microcistine sono trattenute nella lattuga irrigata con spray di acqua contaminata da fioriture di cianobatteri.

Quindi le microcistine hanno effetti anche sugli organismi vegetali: nelle microalghe (*Scenedesmus armatus*) inibiscono del 50% la fotosintesi; nelle macrofite inibiscono la produzione dell'ossigeno fotosintetico (es. in *Ceratophyllum demersum*) (Pietsch *et al.*, 2001), riducono il numero delle fronde di circa il 50% e la concentrazione della clorofilla *a* e *b* di circa il 40%, inoltre l'attività della fosfatasi acida diminuisce, alcune fronde mostrano clorosi e la crescita delle radici è inibita (es. in *Spirodella oligorrhiza*). Ciò aumenta la possibilità che le microcistine possano contribuire alla riduzione della popolazione di macrofite nei corpi d'acqua eutrofizzati dominati da cianobatteri (Romanowska-Duda *et al.*, 2002)

Simili danni si riscontrano anche nelle piante di *Solanum tuberosum* e *Sinapis alba*, nelle quali la tossina inibisce la crescita dei semi e il contenuto di clorofilla, mentre nel *Phaseolus vulgaris* è inibito lo sviluppo delle radici.

Concludendo, gli effetti delle microcistine su uomini e animali si riassumono in:

- epatotossicosi acute per ingestione diretta;
- promozione di tumori, se ingerite in dosi subacute per diverso tempo (tumori epatici);
- polmoniti allergiche ed epatotossicosi se respirate, analogamente ad altre sostanze (lipopolisaccaridi di membrana, ficocianina, ficoeritrina) proprie delle Cianoficee.

In Australia si considera una concentrazione di 0,84 µg/L di tossina come livello soglia di sicurezza per ingestione nei mammiferi (maiali), riferibile ad una densità algale di Cianoficee (*Microcystis aeruginosa*) pari a 5000 cellule/mL (Falconer *et al.*, 1994).

È indicativo il fatto che nell'ambito della balneazione, si registrano lamentele in circa il 30% dei bagnanti esposti per più di un'ora al contatto con acque al di sopra di questa soglia. I disturbi denunciati in queste occasioni sono ulcere in bocca, febbre, vomito, diarrea (in relazione alle tossine), irritazioni ad occhi, orecchie, e *rash* cutaneo (in relazione a polisaccaridi e pigmenti) (Pilotto *et al.*, 1997).

Per una situazione di pericolo igienico- sanitario, dalla letteratura sperimentale si desumono i seguenti valori DL₅₀ per iniezione intraperitoneale:

- 60 µg di microcistina-LR, per kg di topo;
- 300-600 µg di microcistina-RR, per kg di topo.

Il limite citato da Falconer è attualmente consigliato dal Ministero della Salute in Italia per le acque di balneazione.

L'UNESCO (*United Nations Educational, Scientific and Cultural Organization*) e la commissione di esperti della WHO hanno recentemente adottato il limite di 1 µg/L (rischio di intossicazione acuta) per il consumo di acque potabili provenienti da invasi eutrofizzati e contaminati da Cianoficee. Questo limite è già di 8 volte inferiore a quello elaborato da Falconer nel 1996 (Falconer, 1996).

Il limite suggerito dalla letteratura internazionale per il rischio cronico da assunzione per lunghi periodi di acque provenienti da invasi contaminati è di 0,01 µg/L (tumore epatico primario) (Ueno *et al.*, 1996).

La localizzazione intracellulare delle tossine è nella regione del nucleoide e attorno ai tilacoidi. Esse hanno probabilmente una funzione metabolica attiva all'interno della cellula, permanente o intermittente, forse legata alla loro attività inibitrice delle proteinfosfatasi.

CARATTERISTICHE DI *PLANKTOTHRIX RUBESCENS*

Le microcistine sono prodotte da molte Cianoficee, tra cui *Planktothrix rubescens* spesso rinvenuta nei laghi italiani. *P. rubescens* è costituita da tricomi di color rosso bruno senza visibile guaina. Il diametro medio dei tricomi è 7 µm, la loro lunghezza è variabile e può raggiungere pochi mm. I tricomi sono composti da cellule adiacenti tutte identiche tra loro, tranne quelle apicali (che vengono usate per il riconoscimento morfologico), con la lunghezza minore del diametro del tricoma.

Planktothrix rubescens era originariamente considerata una Cianoficea o alga blu-verde perché possiede peculiarità procariotiche; comunque è stata inserita in un nuovo gruppo tassonomico, i cianobatteri, che classifica tutte le alghe blu-verdi come veri batteri (Stainer, 1977; Ripka *et al.*, 1979). *Planktothrix rubescens* è, come molti altri cianobatteri, un tipico componente del phytoplankton lacustre con comportamento simile ad una vera alga. È presente in molti laghi europei (dalle regioni intorno alle Alpi all'Europa centrale – Lago Biczak – alla Norvegia e alla Sardegna), è stata presente per qualche anno anche nel lago Washington (USA) ed è poi scomparsa dopo la diversione di un effluente. È stata anche osservata nel lago Crooked (Indiana) (Konopka, 1982 a, b; Edmondson, 1991).

Ecofisiologia

Quando cresce attivamente in un mezzo di coltura bilanciato e ricco di nutrienti, *Planktothrix rubescens* è di un colore rosso profondo; in queste condizioni il suo contenuto in proteine è simile a quello di *Spirulina*, equivalente al 12% di N (peso secco). Il contenuto di P raggiunge un massimo dell'1,3% (peso secco). Il microscopio elettronico mostra la presenza di molti granuli di accumulo dei fosfati. La clorofilla *a* è l'unica forma di questo pigmento presente in *Planktothrix rubescens*, mentre sono tipici due carotenoidi: mixoxantofilla, che è caratteristica dei cianobatteri in generale, e oscillaxantina, specifico per il genere *Oscillatoria*. A differenza del contenuto di clorofilla *a*, quello di oscillaxantina non è luce-dipendente (Feuillade, 1972). L'energia luminosa che i carotenoidi assorbono ha una efficienza fotosintetica molto bassa; generalmente si considera che questo pigmento serva come protezione contro gli alti livelli di irradiazione. *Planktothrix rubescens* contiene tre biliproteine: alloficocianina e C-ficocianina, che sono responsabili del colore blu-verde di molti cianobatteri, e la C-ficoeritrina rossa. Questi pigmenti sono idrosolubili e diffondono all'esterno delle cellule quando i cianobatteri muiono; si considera che essi siano i pigmenti più efficienti nell'assorbire la luce (Stainer, 1977).

La radiazione fotosintetica attiva (*Photosynthetically Active Radiation*, PAR) catturata dalla ficocianina è usata con una resa uguale o maggiore di quella assorbita direttamente dalla clorofilla *a* (Garnier, 1974).

Le biliproteine rendono capace *Planktothrix rubescens* di utilizzare l'intero spettro della radiazione fotosintetica attiva. L'abbondanza dei pigmenti spiega perché è stato trovato che la bassissima irradiazione di 26 µem⁻²s⁻¹ era ottimale per la crescita di *Planktothrix rubescens* in un esperimento a lungo termine (20 °C, 18 ore, 64 cicli luce/buio), Konopka (1982 a) trovò che l'irradiazione ottimale per *Planktothrix rubescens* presente nel lago Crooked era 180 µem⁻²s⁻¹ (25 °C, 2 ore). A causa della loro costituzione (proteine associate a pigmenti) le biliproteine sono molto sensibili alla scarsità di azoto e possono anche agire come riserve di azoto quando c'è un'adeguata provvista di questo nutriente (van Liere *et al.*, 1975). Di conseguenza il contenuto di biliproteine delle cellule è correlato con il loro contenuto totale di azoto ed è indice

del loro stato di carenza o disponibilità di questo nutriente (Feuillade & Feuillade, 1981; Feuillade & Davies, 1994). La misura delle biliproteine in una popolazione di cianobatteri allo stato stabile naturale, quindi, fornisce una indicazione indiretta dello stato di disponibilità di azoto nel lago.

Metabolismo fotosintetico

Planktothrix rubescens non tollera un arricchimento del mezzo anche dell'1% di anidride carbonica perché esso diventa rapidamente troppo acido. Il pH cresce rapidamente da 8,5 a 9 con la crescita della coltura: a queste condizioni di pH sono presenti solo tracce di anidride carbonica libera nell'acqua, perché il carbonio inorganico disciolto è soprattutto sotto forma di ione bicarbonato.

La fotosintesi in *Planktothrix rubescens* è stata studiata da Feuillade & Feuillade (1981): in condizioni subottimali di crescita è stato osservato un tipico ciclo C3 (Calvin-Benson). Anche la PEP carbossilasi e la carbossichinasi sono enzimi molto attivi, perché il PEP è usato dalla precedente carbossilazione C3 e il bicarbonato come substrato. La struttura procariotica delle singole cellule conferisce un vantaggio: l'intera cellula, ricca di tilacoidi, appare e si comporta come un cloroplasto così che, purché ci sia energia sufficiente, tutta l'anidride carbonica respirata è immediatamente reincorporata fotosinteticamente. Le proporzioni relative del ¹⁴C fissato nelle frazioni intracellulari di *Planktothrix rubescens* dipendono principalmente dal livello di irradiazione prevalente durante l'incorporazione.

Misurazioni a vari livelli di limitazioni di azoto hanno mostrato che il rapporto tra la somma dell'attività della PEP carbossilasi+PEP carbossichinasi e l'attività della RuBP carbossilasi è correlata al livello di carenza di azoto e che, inoltre, c'è una relazione matematica tra questo rapporto e quello di pigmenti fotosintetici. L'influenza della carenza di azoto mostra una reale diminuzione dell'attività della RuBP carbossilasi.

I sistemi suddetti permettono all'alga di sopravvivere quando l'anidride carbonica è scarsa.

Questo rafforza l'idea che la supremazia di *Planktothrix rubescens* è legata alla sua capacità adattativa nei confronti di diversi fattori limitanti più frequenti nei laghi: bassa intensità luminosa grazie ai suoi sistemi di pigmenti in grado di assorbire l'energia all'interno dello spettro luminoso; bassa concentrazione di anidride carbonica grazie all'organizzazione della cellula che limita la perdita di questo composto e grazie all'enzima carbossilante il cui substrato è il bicarbonato anziché l'anidride carbonica libera; scarsa disponibilità di azoto inorganico grazie all'aumento dell'affinità e alla scelta di vie metaboliche: Smith (1982) ha infatti dimostrato che alcune specie di cianobatteri possiedono una potenzialità eterotrofica. L'assorbimento e l'utilizzo di alcuni aminoacidi alla concentrazione naturale è stata confermata con colture axeniche di *Planktothrix rubescens*, poiché dopo 20 minuti di incubazione nelle proteine cellulari è presente il 60% di radioattività di una miscela di aminoacidi marcati con ¹⁴C. È stata stabilita la capacità di *Planktothrix rubescens* di competere con successo con i batteri per l'assorbimento di aminoacidi alle concentrazioni ambientali (Feuillade *et al.*, 1988; Bourdier *et al.*, 1989). L'utilizzo di concentrazioni molto basse di aminoacidi potrebbe essere un fattore che rende l'alga capace di persistere in ambienti sfavorevoli alla sua crescita. Come altre specie, *Planktothrix rubescens* è probabilmente in grado di riassimilare i suoi stessi essudati. La fosfatasi alcalina le permette di utilizzare le forme organiche di fosforo quando l'acqua è povera di fosfato (Feuillade *et al.*, 1990). Questo adattamento sembra essere diffuso nel fitoplancton e nei batteri. L'opinione attuale è che, nel plancton pelagico, i veri batteri possono competere con le microalghe e i cianobatteri nell'assimilazione del fosfato, ma

quest'ultimo effettivamente controlla la crescita batterica con il tasso al quale essi rilasciano la sostanza organica (Currie & Kalff, 1984).

Capacità di sospensione

In alcuni cianobatteri planctonici la presenza di spazi intracellulari pieni di vescicole di gas riduce la normale densità cellulare al di sotto di quella dell'acqua, regolando pertanto la loro galleggiabilità. Le vescicole sono inclusioni citoplasmatiche cave, cilindriche, associate in ammassi (spesso chiamati vacuoli di gas) e ritrovati esclusivamente in alcuni procarioti. Essi sono coperti da parti finali coniche e i loro diametri medi generalmente sono tra i 60 e i 110 nm. Le pareti delle vescicole sono costituite da una particolare proteina detta GVPa (*Gas Vesicle Protein*), una seconda, minore proteina detta GVPc può esistere in alcune specie. Sebbene la parete sia completamente permeabile ai gas, la sua superficie interna è idrofobica e previene l'ingresso di acqua nella vescicola. Inoltre la parete fornisce una grande rigidità alla vescicola intatta. La composizione del gas al suo interno è simile a quella dell'aria alla pressione ambientale. Al di sopra di una certa pressione esterna, chiamata pressione critica, tutte le vescicole collassano irreversibilmente in involucri appiattiti. Questa pressione critica varia in modo interspecifico e in ampi intervalli. Il gas che era nelle vescicole esce per diffusione nella soluzione circostante senza formare una bolla (Walsby, 1969). Le proteine costituenti disaggregate possono essere usate come fonte di azoto per motivi metabolici o possono essere riassemblate in nuove membrane di vescicole di gas. Una pressione esterna compresa tra 0,7 e 1,2 MPa fa collassare vescicole isolate e *in situ* di *Planktothrix rubescens*. Questa pressione è notevolmente più alta di quella necessaria a rompere le vescicole in *Microcystis* (Deacon & Walsby, 1990).

Comunque le specie gas vacuolate non rimangono sempre positivamente galleggianti: esse alternano la loro galleggiabilità e possono controllare i movimenti verso il basso e verso l'alto nella colonna d'acqua. Il fatto che la cellula galleggi o no dipende dalla frazione di cellula occupata dal gas. Infatti la galleggiabilità di popolazioni naturali di cianobatteri gas vacuolati fluttua continuamente: sono state osservate variazioni diurne in laghi e colonne d'acqua sperimentali. Studi in laboratorio e sul campo indicano che la RGV (*Relative Gas Vacuolation*) e la galleggiabilità nelle alghe blu verdi dipendono dalla interazione di luce e nutrienti limitanti che colpiscono i tassi relativi di fotosintesi, crescita e sintesi di vescicole di gas.

Di particolare interesse sono le condizioni limitanti la crescita che permettono alla RGV di aumentare, come avviene durante le fioriture in superficie. La luce può avere questo effetto in alghe con sufficienti nutrienti a disposizione. Con una riduzione dell'intensità luminosa, la RGV non aumenta in *Planktothrix rubescens* proveniente da un chemostato azoto limitato. Come alternativa alla luce Reynolds e Walsby hanno suggerito i maggiori fattori limitanti la crescita: carbonio, azoto, fosforo.

La RGV in *Planktothrix rubescens* diminuisce al crescere del grado di limitazione di azoto e aumenta con le transizioni alla limitazione di carbonio inorganico. Inoltre l'aumento di disponibilità di carbonio inorganico e di azoto può anche avere effetti opposti sulla galleggiabilità delle alghe blu-verdi: l'aumento di azoto ammoniacale aumenta la RGV in colture azoto limitate di *Planktothrix rubescens* e induce fioriture superficiali in popolazioni metalimnetiche di *Oscillatoria agardii isothrix*. Questo indica che la limitazione di azoto ha un ruolo nella formazione di popolazioni subsuperficiali, soprattutto in alcune specie, e che la limitazione di carbonio inorganico può contribuire alla formazione o al mantenimento di fioriture superficiali. Gli esperimenti sui laghi suggeriscono che la formazione di popolazioni subsuperficiali è una risposta della galleggiabilità alla alta intensità luminosa e alla mancanza di

nutrienti nei pressi della superficie. Walsby ha messo in relazione questa riduzione della galleggiabilità con il collasso delle vescicole di gas dovuto all'aumento della pressione di turgore e questo meccanismo di collasso è dipendente dalla fotosintesi (quando le condizioni di luce e nutrienti sono tali che il tasso di fotosintesi supera il tasso di crescita limitata dai nutrienti), così la limitazione di azoto potrebbe promuovere l'aumento della pressione di turgore e il collasso delle vescicole, contribuendo all'accumulo di fotosintato osmoticamente attivo, mentre la disponibilità di azoto aumenterebbe l'assimilazione del fotosintato e ridurrebbe la pressione di turgore. Comunque l'incremento della RGV in cellule azoto limitate non è spiegato del tutto dai cambiamenti della pressione di turgore. L'accumulo di carboidrati appare essere di grande importanza nella regolazione della galleggiabilità di questa specie (Utkilen *et al.*, 1985): l'alga, esposta ad alta intensità luminosa, accumula carboidrati e scende lentamente ad una profondità dove la quantità di carboidrati è ridotta, così che il contenuto delle vescicole di gas può aumentare.

Le alghe azoto limitate tendono ad avere grandi riserve di carboidrati e sono, quindi, capaci di grandi tassi di assorbimento di azoto e di sintesi proteica a spese di queste riserve (Reynolds, 1987). Così l'incremento di disponibilità di azoto non solo ridurrebbe la pressione di turgore, ma promuoverebbe la sintesi proteica (anche di proteine delle vescicole di gas): quando è azoto limitata, *Planktothrix rubescens* perde galleggiabilità e sprofonda in un lago stratificato: l'alga si avvicina ad una combinazione di condizioni che portano all'accumulo di proteine e vescicole, in questo modo la galleggiabilità risponde negativamente alle condizioni della superficie (alta intensità luminosa, scarsità di nutrienti) e positivamente alle condizioni dell'acqua profonda (bassa intensità luminosa, abbondanza di nutrienti) e tende a portare *Planktothrix rubescens* verso il fondo della zona fotica.

INDAGINI PREGRESSE SUI LUOGHI DELLO STUDIO

Per quanto riguarda il lago di Nemi, i primi studi sul fitoplancton risalgono al 1931 quando Volterra e D'Ancona eseguirono sul lago una ricca serie di osservazioni periodiche sul comportamento e sulla variabilità del plancton in genere. Ad essi fece seguito un accurato studio di Vittorio Marchesoni (1949) che esaminava il fitoplancton del lago nel periodo 1923-1939. Tali ricerche limnologiche furono utili soprattutto perché durante il periodo 1928-1933 il lago subì profonde modificazioni idrogeologiche a causa dell'abbassamento del suo livello per il recupero delle navi romane di Caligola. Da questo lavoro emerge che il lago prima dell'abbassamento era di tipo oligotrofico, con scarsa vegetazione litoranea e produttività del plancton non abbondante ma neppure scarsa, poi, in seguito alla diminuzione del livello delle sue acque, era diventato eutrofico, con stagnazione estiva e abbondanza di zooplancton e fitoplancton, il cui aspetto era completamente mutato: le specie pelagiche soggette a migrazioni stagionali (tra cui alcune Cianoficee) erano scomparse a causa della riduzione dell'ipolimnio e della eccessiva presenza di idrogeno solforato negli strati profondi; inoltre vi era stato un enorme aumento delle diatomee litorali e bentoniche. Le Cianoficee mostravano un comportamento irregolare, rivelandosi come forme euritermiche, con adattamento ad ampie escursioni termiche, preferendo comunque i mesi invernali. *Planktothrix rubescens* non era comunque mai rilevata tra le Cianoficee presenti nel lago ed esse, tra l'altro, erano presenti in una percentuale piuttosto bassa (tra il 6,6 e il 12%) nel fitoplancton del lago.

In un lavoro di Botrè, Ielmini e Sanna che risale al 1975, venivano presentati i risultati di uno studio delle caratteristiche chimiche dei laghi di Albano, Bracciano e Nemi nel periodo 1973-1974. I risultati per il lago di Nemi evidenziavano un notevole apporto di inquinanti da parte delle acque di rifiuto provenienti da Villa delle Querce e dagli aggregati urbani di Genzano e Nemi, i cui scarichi confluivano direttamente nel lago. Le relative analisi evidenziavano nell'estate 1974 valori piuttosto elevati di BOD5 (che quantifica l'impovertimento di O₂ perché misura la sua concentrazione all'inizio e al termine di 5 giorni dal periodo di incubazione) e COD (picchi rispettivamente di 14 e 34 ng/L), caratteristici di acque inquinate, concentrazioni a volte notevoli di azoto ammoniacale, nitroso, nitrico e di fosforo, frequente presenza di tensioattivi a causa degli scarichi descritti. Gli altri parametri risultavano essere nella norma. Già allora, comunque, le condizioni del lago destavano preoccupazione per l'esposizione ad eventuali fenomeni di inquinamento acuto e per il grado di eutrofizzazione già avanzato. Si rilevava inoltre la possibilità di fenomeni di fioriture algali correlate allo strato trofico del lago e si auspicava l'attuazione di misure di prevenzione per risanare e proteggere l'invaso. Tre anni dopo, nel 1978, Stella, Ferrero e Margaritora pubblicavano uno studio sulle alterazioni del plancton a Nemi: veniva descritta la prima imponente fioritura di *Planktothrix rubescens* verificatasi nel gennaio 1975, che provocò la colorazione rossa delle acque e, al decadimento della fioritura, un fenomeno di putrefazione della massa algale che diede luogo alla formazione di una schiuma biancastra dall'odore pungente. I valori di BOD5 delle acque superficiali risultavano essere altissimi e l'ipolimnio era completamente anossico e ricco di acido solfidrico, nitrati, fosfati e sali di ammonio. La trasparenza era scesa a 0,25 m e la vegetazione sommersa era sparita quasi completamente. Gli autori riferivano inoltre della moria di *Coregonus* avvenuta nell'agosto dello stesso anno e di una successiva moria, estesa a tutta la fauna ittica, avvenuta tra la fine del 1975 e l'inizio del 1976 e preceduta da una infezione di *Saprolegnia* sulla superficie del corpo dei pesci. In quel periodo il valore dell'ossigeno disciolto era diminuito fortemente. Studi sulla struttura della biocenosi zooplanctonica condotti dall'Istituto Zooprofilattico di Roma avevano evidenziato, nel periodo della fioritura di *Planktothrix*

rubescens, un cambiamento nella composizione dello Zooplancton e nella normale distribuzione delle specie che si erano accumulate negli strati superficiali anche nei periodi di piena luce diurna, con conseguenti danni per le specie più vulnerabili. Al decadere del bloom di *Planktothrix rubescens*, un secondo bloom, questa volta di Anabaenopsis e dinoflagellati, si era sviluppato tra luglio e ottobre 1975 e l'acqua aveva cambiato colore, passando dal rosso al verde-giallo, con un grado di torbidità elevato per tutto il periodo.

Come conseguenza della diversione, nel febbraio 1976, di uno degli scarichi di Genzano e di quello dell'ospedale, gli autori rilevavano una più regolare successione di specie zooplanctoniche dovuta alla ricomparsa di specie fitoplanctoniche, la cui assenza aveva causato, nel corso dell'anno precedente, un'alterazione nella dieta dei piccoli erbivori Rotiferi e Cladoceri. Le condizioni del plancton del lago nel periodo studiato, dunque, apparivano lontane dalla normalità, con zooplancton coperto da alghe epizoiche e infettato da funghi parassiti che colpivano le specie nel periodo di massima abbondanza, causando vere e proprie epidemie.

Nel 1982 fu pubblicato uno studio di Bazzanti e Loret sulla struttura della comunità macrobentonica del lago di Nemi nel periodo tra febbraio 1976 e dicembre 1978. Esso evidenziava come la composizione qualitativa della comunità bentonica, l'alta percentuale di Tubificidi e la bassa densità di Chironomidi (specialmente tra i 10 e i 31 m), insieme alla marcata riduzione numerica dell'intera fauna bentonica all'aumentare della profondità, fossero tutti fattori tipici di un lago altamente eutrofizzato con anossia ipolimnica durante quasi tutto l'anno.

In un lavoro più recente curato dalla Provincia di Roma e dall'Università La Sapienza ("Valutazione della situazione ambientale del Lago di Nemi", 1987), veniva preso in esame lo stato trofico dell'invaso e la composizione del fitoplancton: la composizione quantitativa media, valutata sia in base alla percentuale di individui, sia in base alla percentuale di biovolume spettante ad ogni classe, differiva nettamente dalla composizione qualitativa; le Cianoficee rappresentavano infatti, da sole, il 90% circa sia del popolamento, sia del biovolume fitoplanctonico complessivo. Queste percentuali così estreme sono da considerare una caratteristica nettamente anomala, indicatrice da sola del grave stato di eutrofizzazione del lago. La composizione mensile dei livelli superficiali presentava le stesse caratteristiche della composizione media: una netta dominanza delle Cianoficee si riscontrava durante tutto l'anno, tranne che nei mesi primaverili, durante i quali il plancton risultava costituito essenzialmente da Diatomee e Criptoficee. La presenza di *Planktothrix rubescens* era rilevata solo sporadicamente con densità comunque molto basse, era invece sempre presente la cianoficea *Oscillatoria limnetica* che presentava picchi in inverno e in estate.

Gli autori hanno esaminato inoltre la caratterizzazione chimico-fisica delle acque, prendendo in considerazione parametri analitici come bicarbonati, azoto totale, ossigeno disciolto, pH, silice solfati, temperatura e trasparenza: i risultati ottenuti evidenziavano lo stato di notevole inquinamento delle acque (gli ortofosfati raggiungevano picchi di 559 µg/L, il fosforo totale di 864 µg/L e i nitrati di 703 µg/L) con completa anossia ipolimnica tra maggio e ottobre.

Anche la comunità zooplanctonica era oggetto di trattazione: si evidenziava la riduzione qualitativa dello zooplancton che risultava costituito in gran parte da specie ad ampia valenza ecologica e da alcune (Rotiferi come *Keratella quadrata*), più abbondanti, caratteristiche di acque eutrofe. Nel popolamento zoobentonico litorale e profondo, l'alto rapporto Oligocheti/Oligocheti-Chironomidi (80-90%) era inteso come un ulteriore sintomo dell'elevato grado trofico del bacino.

Lo stesso lavoro esaminava anche il tempo di ricambio del lago, stimato intorno ai 15 anni, il carico massimo ammissibile di fosforo per assicurare condizioni di oligotrofia che risultava essere, secondo le equazioni di Vollenweider, di 235 kg/anno e il carico di nutrienti proveniente

dalle fonti di inquinamento diffuse e puntiformi operanti nell'ambito del bacino del lago (Tabella 2).

Tabella 2. Carichi di nutrienti provenienti dalle fonti di inquinamento operanti nell'ambito del bacino del lago di Nemi

Fonte di inquinamento	Azoto (kg/anno)	Fosforo (kg/anno)
Insedimenti civili	10.950	3.285
Attività agricole	13.310	1.617
Terreno non coltivato	556	28
Totale	24.816	4.930

Dall'esame di questi dati si evincevano le seguenti indicazioni:

- La depurazione dei liquami provenienti dagli insediamenti civili o la loro diversione era un provvedimento necessario già allora per consentire il risanamento del lago.
- L'aliquota del carico complessivo di nutrienti proveniente dalle attività agricole risultava di entità superiore a quella massima ammissibile per mantenere le acque in condizione di oligotrofia: bisognava pensare quindi ad una razionalizzazione dell'uso dei fertilizzanti o ad interventi atti a diminuire le possibilità di dilavamento del terreno.

Uno studio dello stesso anno effettuato da Bazzanti e Seminara sul macrobentos dell'invaso sottolineava, come gli studi già citati, la predominanza degli Oligocheti e la persistente anossia ipolimnica che aveva causato la progressiva semplificazione dell'intera comunità.

Nel 1994 l'Istituto Tecnico Industriale Sperimentale di Ariccia rendeva nota una analisi chimica del lago di Albano e di Nemi che confermava la presenza di quantità elevate di ammoniaca in entrambi i laghi, dovuta probabilmente all'inquinamento microbiologico e all'uso di fertilizzanti azotati trascinati negli invasi a causa del dilavamento del terreno. Gli autori dichiaravano molto chiaramente che l'abbassamento del livello idrico lacuale dovuto ad un bilancio idrogeologico negativo, e l'indice di inquinamento costituivano un'emergenza paesaggistica e ambientale.

Uno studio sulle caratteristiche morfologiche, geologiche e climatiche dei due laghi effettuato da Chondrogianni, Ariztegui, Guilizzoni e Lami nel 1996 rendeva note le profondità massime (Nemi 32 m; Albano 175 m) medie (Nemi 17 m; Albano 77 m) le superfici (Nemi 1,8 km²; Albano 6 km²) e altre caratteristiche, tra le quali il grado di eutrofizzazione che per Nemi risultava essere elevato, le concentrazioni di fosforo e di nitrati che si attestavano su valori alti, l'anossia ipolimnica durante la stratificazione termica estiva, la presenza dominante di Cianofitee, l'abbondanza di specie zooplanctoniche tipiche di acque eutrofizzate e la bassa biodiversità della comunità macrofita e zoobentonica.

In una conferenza svoltasi nel 1998 a Genzano sull'inquinamento e sull'abbassamento idrico dei laghi di Albano e Nemi era emerso che in alcuni effluenti e scarichi vi erano alte concentrazioni di ortofosfati, nitrati, nitriti e agenti inquinanti dovuti a concimi chimici, alle acque nere e ai detersivi. Erano emerse anche testimonianze di cittadini che avevano notato chiazze oleose sulla superficie dell'acqua e autobotti che immettevano sostanze non identificate nei laghi. Risultava inoltre evidente che le cause dell'inquinamento erano da ricercare anche nell'uso di concimi e di prodotti chimici nei terreni agricoli esistenti sulle coste lacuali e nell'abbassamento del livello delle acque che risultava indipendente dalla quantità delle precipitazioni, ma fortemente correlato all'eccessivo sfruttamento della falda idrica da parte dei comuni e delle industrie.

L'anno successivo, nel "Progetto Colli Albani" il prof. Scialis dell'Istituto Tecnico Industriale Sperimentale di Ariccia ha indicato come nell'area dei Castelli, per effetto della crescita demografica e quindi del fabbisogno idrico, il prelievo da parte dei pozzi comunali dal 1984 al 1995 era cresciuto del 48%. Da studi effettuati dall'Assessorato provinciale all'Ambiente è risultato, infatti, che a fronte di una ricarica del bacino idrico di 48 milioni di metri cubi/anno (800 mm di pioggia/anno su un bacino di circa 100 km² con tasso di infiltrazione efficace del 60%) il consumo risulta pari a 37 milioni di metri cubi/anno solo per i pozzi comunali, a cui però si deve aggiungere il consumo dei pozzi privati: pertanto il bilancio idrico risultava quindi deficitario. In conseguenza di ciò il livello idrico lacuale ha subito un costante abbassamento, particolarmente rilevante negli ultimi anni. Le analisi relative ai parametri chimici hanno evidenziato valori elevati di azoto ammoniacale (anche se sotto forma di ione ammonio, meno tossico) in entrambi i laghi (0,28 ng/L a Nemi e 0,56 ng/L ad Albano), superiori al limite della Legge Merli 319/1976. Presumibilmente tali valori elevati sono causati sia da inquinamento microbiologico, sia dall'uso di fertilizzanti azotati che confluiscono nei laghi per dilavamento del terreno. A riprova di ciò è il valore molto elevato di nitriti riscontrato nella zona della spiaggia del lago Albano, zona di giardini e di insediamenti turistici.

In conclusione il lavoro ha messo in evidenza come entrambi gli invasi fossero un'emergenza ambientale a causa dell'abbassamento dell'incile e degli indici di inquinamento delle acque.

Nel 2000 il Parco Regionale dei Castelli Romani ha avviato il progetto "Studi interdisciplinari del rischio ambientale per la valutazione del *multihazard* nel comprensorio del Parco dei Castelli Romani" con l'intenzione di affrontare in modo multidisciplinare l'analisi della pericolosità naturale nel contesto della mitigazione della vulnerabilità, definita come grado di suscettibilità dell'ambiente. Le campagne condotte nel corso dell'anno 2000 hanno evidenziato condizioni comprese tra livelli di oligo-mesotrofia per il lago Albano e di meso-eutrofia per quello di Nemi. Le misurazioni dell'ossigeno disciolto hanno rivelato una stratificazione netta delle acque nel caso del lago Albano, con livelli di anossia spinta al di sotto dei 60 metri di profondità, dato che riflette sia condizioni di limitato ricambio delle acque di fondo determinato dalla conformazione fisica del bacino, sia condizioni pregresse di apporti antropici. Sono stati inoltre segnalati ricorrenti episodi di fioriture di Cianofite ad alta potenzialità tossica. Nel lago di Nemi, caratterizzato da una profondità molto inferiore rispetto ad Albano, ma da una produttività trofica maggiore, i livelli di ossigenazione hanno messo in evidenza condizioni di netta ipossia nelle acque di fondo durante la stratificazione termica estiva.

Per quanto riguarda in particolare il lago Albano, il primo studio, riguardante le società pelagiche, litorali e bentoniche, risale al 1950 (Stella, 1950). In esso il quadro termico del lago evidenziava una temperatura uniforme nell'epilimnio e nell'ipolimnio durante l'inverno e una stratificazione termica, con formazione del termocline tra i 10 e i 20 metri di profondità, dalla primavera all'autunno a causa del graduale riscaldamento degli strati superficiali. La quantità di ossigeno disciolto negli strati profondi era, a quell'epoca, piuttosto abbondante e le acque del fondo risultavano pure, non soggette a putrefazione. Non venivano evidenziati episodi di fioriture fitoplanctoniche di alcun tipo. Pochi anni dopo un lavoro di Gabriella Cannicci documentava una eccezionale fioritura del lago nel settembre 1953 che aveva provocato un cambiamento dell'aspetto delle sue acque, diventate di colore bruno, vischiose e torbide a causa di una fioritura della cianofitea *Aphanizomenon ovalisporum*. Tuttavia, escludendo questo episodio, il lago veniva considerato oligotrofico grazie anche alla grande trasparenza delle acque, alla notevole profondità rispetto alla superficie e all'ottima ossigenazione.

Nel lavoro di Botrè, Ielmini, Sanna e Bielli del 1975, già citato per Nemi, la situazione del lago Albano risultava non ancora compromessa: le condizioni di ossigenazione erano buone,

con valori considerati normali e adatti al mantenimento della vita acquatica nelle sue varie forme; l'azoto ammoniacale, nitroso e nitrico era praticamente assente, così come il fosforo, i tensioattivi e gli antiparassitari (DDT, HCB e lindano). I cloruri erano presenti in concentrazioni compatibili con le medie normali delle acque dolci. Al contrario, in uno studio successivo di Margaritora, Stella e Ferrara (1988), gli autori mettevano in evidenza come i valori di ossigeno disciolto fossero quasi nulli oltre i 60 metri di profondità durante tutto l'anno e i valori di fosforo e azoto fossero abbastanza elevati da essere riconducibili a quelli di un lago mesotrofico. Il fitoplancton risultava essere caratterizzato in prevalenza da Cianoficee, con dominanza di *Planktothrix rubescens*, che costituivano il 65% del biovolume globale. Questo cambiamento di stato trofico delle acque disturbava notevolmente la comunità zooplanctonica: le imponenti fioriture di Cianoficee apparivano riflettersi sui rapporti trofici interspecifici, sulle successioni stagionali e sulla distribuzione delle specie, con un effetto a lungo termine anche sulla struttura della comunità zooplanctonica.

Successivamente negli anni '90, un progetto mai pubblicato della Provincia di Roma in collaborazione con l'Università "La Sapienza" ha studiato le condizioni del Lago di Albano e in parte di quello di Nemi nel periodo 1984-1991 dal punto di vista idrogeologico e climatico, ma senza occuparsi del fitoplancton.

In tale lavoro il tempo di ricambio complessivo del lago era stimato essere di oltre 67 anni. Il carico di nutrienti proveniente dalle fonti diffuse e puntiformi di inquinamento in quel periodo è riportato nella Tabella 3, mentre il carico massimo ammissibile di fosforo per assicurare condizioni di oligotrofia risultava essere, secondo le equazioni di Vollenweider, di 1242 kg/anno, nettamente al di sotto del reale carico di fosforo immesso nel lago all'epoca dello studio.

Anche in questo caso si auspicava la realizzazione di un progetto di intercettazione dei reflui mediante una condotta circumlacuale atta a convogliare l'intera portata captata ad un differente recettore finale.

Tabella 3. Carichi di nutrienti provenienti dalle fonti di inquinamento operanti nell'ambito del bacino del lago Albano

Fonte di inquinamento	Azoto (kg/anno)	Fosforo (kg/anno)
Insedimenti civili	15.330	4.599
Attività agricole	2.670	112
Totale	18.000	4.711

Nel più recente lavoro di Chondrogianni, Ariztegui, Guilizzoni e Lami (1996) il lago appariva in condizioni di spinta anossia ipolimnica, con conseguente assenza di fauna in profondità. Lo stato era da considerarsi meso-eutrofico, con valori di ortofosfati e ammonio quasi nulli nell'epilimnio, ma alti nell'ipolimnio (170 µg/L per il fosforo e 270 µg/L per l'azoto). Il fitoplancton era rappresentato dalle Cianoficee, tra le quali prevaleva *Planktothrix rubescens* (65%), dalle cloroficee e dalle diatomee. Lo zooplancton della zona pelagica era costituito da 11 specie di rotiferi, 4 di cladoceri e 2 di copepodi.

L'anno successivo, nell'ambito del "Progetto Acqua", il WWF (*World Wildlife Fund*) in collaborazione con il Liceo "Ugo Foscolo", ha reso noti i risultati di un monitoraggio chimico dei laghi di Albano e Nemi: è stato appurato come in alcuni effluenti e scarichi dei laghi vi fossero alte concentrazioni di fosfati, nitrati, nitriti e agenti inquinanti di vario tipo.

Inoltre dalle misurazioni gli autori hanno osservato che il livello batimetrico della soglia dell'incile risultava di 3,5 metri nel lago di Nemi e di 1,8 metri nel lago Albano e che i comuni e

i privati continuavano lo scavo di nuovi pozzi e l'approfondimento di quelli già esistenti. In considerazione delle evidenze emerse venne proposta una serie di interventi di recupero tra cui il divieto di nuove costruzioni e l'abbattimento delle opere abusive, la ricostruzione dei fossi alluvionali dei bacini imbriferi, il riordino del vincolo idrogeologico e l'interdizione del prelievo diretto di acqua per tutelare le riserve idriche del Vulcano Laziale, il riciclo di acqua depurata a fini agricoli e il rifacimento delle reti idriche. Nessuno di questi provvedimenti è stato adottato per favorire il recupero dei laghi.

A seguito della grande fioritura algale tossica rilevata dall'ISS nel lago Albano a febbraio del 2001, nel luglio dello stesso anno è stata conclusa una convenzione tra ISS e Regione Lazio che ha dato luogo allo studio sistematico dei laghi Albano e Nemi, quando anche in quest'ultimo sono state rilevate le fioriture tossiche a carico della specie *Planktothrix rubescens*.

La Cianoficea *Planktothrix rubescens* produce una tossina (microcistina-RR) la cui azione interessa fegato, polmoni e reni, e che è implicata nell'attivazione di oncogeni che innescano tumori epatici, gastrointestinali ed epiteliali. La particolare microcistina identificata è ritenuta avere maggiore tossicità alle dosi più basse rispetto alle altre varianti della stessa classe, prodotte da altre specie.

Le caratteristiche in oggetto configurano un pericolo per la vita di occasionali bagnanti che ingeriscano modiche quantità dell'acqua in caso di forte fioritura, o di sportivi predisposti ad attacchi allergici che nelle stesse condizioni percorrano il lago inalando la tossina volatile. L'idoneità delle acque dei laghi di Albano e Nemi all'uso ricreativo, agricolo e di riserva naturale è pregiudicata dal grave grado di eutrofizzazione instauratosi progressivamente nel corso dei decenni passati e dalla presenza della specie algale tossica in questione, capace di fioriture imponenti durante i mesi autunnali e invernali.

FASE SPERIMENTALE: CAMPIONAMENTO, PARAMETRI E METODI DI ANALISI

Campionamento

Il campionamento è stato effettuato mensilmente nell'arco di una mattinata, in genere dalle ore 10 alle ore 13, dal mese di gennaio 2002 al mese di aprile 2003.

Siti di campionamento

Albano

Il lago Albano costituisce un bacino lacustre impostato all'interno di una depressione craterica di forma approssimativamente ellissoidale, con asse maggiore di poco superiore ai 3,5 km orientato in direzione NW-SE e asse minore di lunghezza pari a 2,3 km. L'intera cinta craterica risulta caratterizzata da quote che oscillano tra i 350 m sul livello del mare in corrispondenza del settore nord-ovest del lago e i 560 m sul livello del mare (Convento di Palazzolo) in corrispondenza del settore sud-est. Il lago occupa la parte sud-occidentale del sistema vulcanico laziale. Il perimetro del lago è di 12 km e la profondità raggiunge i 175 m. Il periodo di rimescolamento va da gennaio a marzo, con una temperatura dell'acqua tra 10,7 e 11 °C, e il termoclino inizia a formarsi in aprile, per attestarsi tra -10 m e -20 m, con massima stratificazione in agosto e temperatura massima raggiunta di 26,9 °C. Il bacino del lago presenta una antropizzazione spinta che già in passato ha causato più volte fioriture algali, la prima delle quali ad essere notata, nel 1953, è stata considerata eccezionale (Canicci, 1953).

Dal 1960 il livello del lago di Albano si è abbassato di oltre quattro metri e mentre prima degli anni novanta l'abbassamento medio annuale era intorno ai 25 cm, ora raggiunge i 40 cm all'anno; in particolare dall'inizio dei campionamenti dell'ISS nel gennaio 2001, il lago si è abbassato di oltre un metro. Questo fenomeno, che provoca sicuramente un'aggravarsi delle condizioni di stato trofico del lago, è dovuto principalmente ad uno smodato prelievo dalla falda acquifera dell'area dei Castelli Romani. In questa zona infatti, il fabbisogno idrico della popolazione è di circa 65 milioni di metri cubi annui; se si tiene conto del fatto che la ricarica naturale della falda è di 33 milioni di metri cubi annui, i restanti 32 milioni che vengono prelevati per soddisfare il fabbisogno idrico dei Castelli Romani vanno ad intaccare proprio la falda e ad abbassare il suo livello, quindi a depauperare la riserva d'acqua dell'intera zona. Attualmente sono circa 10.000 i pozzi dichiarati nell'area suddetta, ma si stima che ne esistano almeno altrettanti abusivi, che quindi non risultano nella documentazione ufficiale.

Nemi

Il lago si trova a 316 metri sul livello del mare e occupa il fondo di un cratere vulcanico dei colli Albani, gruppo montuoso a Sud-Est di Roma che comprende anche il lago di Albano. Ha una superficie di circa 1,67 km², una profondità media di 17 metri e massima di 33 metri e un volume pari a 30.483.000 m³. Le condizioni di stratificazione termica sono piuttosto nette per un arco di tempo abbastanza esteso (da Aprile a Dicembre); le acque profonde presentano variazioni minime, oscillando tra i 7 e gli 8,5 °C, quelle superficiali invece variano dai 7,9 ai 26,4 °C. In assenza di stratificazione termica le differenze tra epilimnio e ipolimnio sono assenti o contenute nell'ambito di 1 °C; in presenza di stratificazione (alla profondità di 10-15 m) la

temperatura rimane su valori abbastanza costanti nei primi 5 metri, subisce una brusca variazione tra 10 e 15 metri e variazioni minime negli strati più profondi.

Tra il 1928 e il 1932 il livello del lago fu abbassato per recuperare due navi romane che giacevano sul fondale. Il lago ha recuperato il suo livello originario nel 1944, cioè dopo 12 anni. Le acque del lago devono essere considerate eutrofiche a causa dell'alta concentrazione di nutrienti e alla bassa concentrazione di ossigeno disciolto ipolimnico.

La prima segnalazione della presenza della cianofitea *Planktothrix rubescens* in questo lago risale al 1975 in occasione di una intensa fioritura che determinò l'arrossamento del lago in aprile e maggio e l'anossia delle acque con moria di pesci nel mese di agosto.

Come avviene per il lago di Albano, anche quello di Nemi si sta abbassando notevolmente negli ultimi anni, essenzialmente per le stesse ragioni già esposte per Albano. Ciò risulta evidente se consideriamo che il suo emissario artificiale, lungo circa 1600 m, che mette in comunicazione il lago con la valle Ariccia (il terzo cratere dell'antico vulcano Laziale), un tempo era completamente pieno d'acqua, mentre ora è quasi totalmente prosciugato e percorribile a piedi.

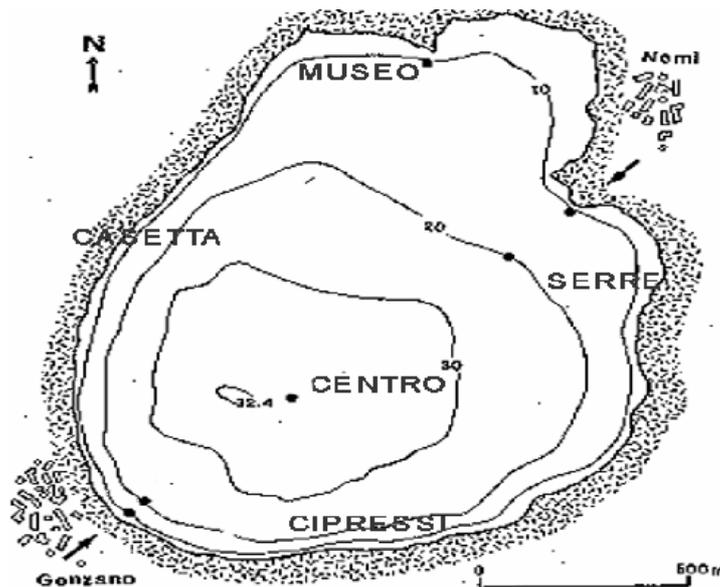
Procedura di campionamento

Campionamento di superficie

Il prelievo dei campioni è stato effettuato in quattro stazioni rivierasche poste a 50 metri dalla riva secondo lo schema a croce greca: ad Albano in corrispondenza della zona balneare prospiciente il traforo ("Molo"), del ristorante "I delfini" ("Hotel"), del bosco ("Bosco") e del centro federale del CONI ("castello") (Figura 5); a Nemi in corrispondenza del Museo delle navi romane ("Museo"), della zona coltivata ("Serre"), del bosco di cipressi ("Cipressi") e della zona archeologica ("Casetta") (Figura 6).



Figura 5. Mappa batimetrica del lago Albano in cui sono indicate le stazioni di campionamento



**Figura 6. Mappa batimetrica del lago di Nemi
in cui sono indicate le stazioni di campionamento**

È stato inoltre effettuato un prelievo di superficie in una stazione di “Centro lago” corrispondente al punto di intersezione della croce greca.

Retinata

Il campione è stato raccolto con una pescata verticale effettuata con una rete da plancton a maglia sottile (non superiore a 60 μm di apertura di maglia) modello 20MY KC Maskiner og lab. Udstyr, fatta scendere alla profondità desiderata, che dipende dal tipo di cianobatteri presenti: nel caso di *Planktothrix rubescens* che presenta una distribuzione lungo l'intera colonna d'acqua, la rete viene fatta scendere fino alla massima profondità.

Campionamento a diverse profondità

Il prelievo di campioni lungo la colonna d'acqua è utile per determinare la distribuzione e la frequenza dei popolamenti algali tossici in funzione delle profondità e per avere un quadro complessivo delle condizioni chimico-fisiche dei diversi strati d'acqua a temperatura differente. Il lago Albano è soggetto a stratificazione termica e il rimescolamento completo avviene solo nei mesi invernali. I campionamenti lungo la colonna d'acqua, pertanto, sono stati eseguiti ogni 5 metri a partire dalla superficie, attraverso lo strato superficiale più caldo, l'epilimnio, comprendendo anche lo stretto strato separatore intermedio, il termoclino, caratterizzato da una differenza di temperatura maggiore di 1 °C per ogni metro di profondità. Il pronunciato gradiente termico di questo strato impedisce il mescolamento di epilimnio e ipolimnio e quindi la libera diffusione dell'ossigeno disciolto prodotto dalle alghe e diffuso dall'atmosfera dalla superficie al fondo.

L'attrezzatura è stata:

- Verricello idrografico con cavo da 4-6 mm e puleggia contametri;
- Bottiglia Ruttner da prelievo con capacità di 2,5 litri;
- Messaggero per la chiusura della bottiglia.

Una volta collocata una zavorra all'estremità del cavo del verricello e azionato quest'ultimo, si raggiungono le diverse profondità ad intervalli di 5 metri, ad ogni profondità si raccoglie un campione d'acqua attraverso la bottiglia Ruttner che viene chiusa mediante un meccanismo fatto scattare dal messaggero. Ogni campione viene trasferito in una bottiglia apposita e sottoposto alla determinazione dei parametri chimico-fisici.

Trasporto dei campioni

I campioni prelevati vengono posti in bottiglie scure e trasportati all'interno di borse termiche dal sito di campionamento al laboratorio per mantenere la temperatura a +4 °C.

Essi vengono analizzati il giorno stesso del prelievo, o al più tardi il giorno successivo.

Rilevazione dei parametri chimico-fisici

Determinazione della temperatura

La determinazione di questo parametro risulta fondamentale per comprendere la situazione termica del bacino idrico che è importantissima per lo sviluppo di eventuali fioriture algali. La risposta del lago agli scambi calorici con l'atmosfera, al lavoro esercitato sulla sua superficie dal vento e all'impatto idrologico dell'areale circostante, si evidenzia essenzialmente nei cicli di riscaldamento e raffreddamento della massa d'acqua, che, nei laghi temperati di sufficiente profondità come quello di Albano, si manifestano dalla tarda primavera all'autunno con le tipiche strutture della stratificazione termica: tre strati sovrapposti, ciascuno a differente temperatura e densità, che consentono la suddivisione verticale della colonna d'acqua in epi-, meta- e ipo-limnio, mentre col termine di termoclino si indica la superficie definita dall'insieme dei punti nei quali si verifica il massimo valore del gradiente termico verticale. Questo strato di salto, oltre che una barriera termica e di densità, costituisce un ostacolo idrodinamico in grado di limitare gli scambi di massa e i rimescolamenti verticali tra le acque superficiali e quelle profonde.

Determinazione del pH

Il pH delle acque superficiali è la risultante di svariati processi, tra loro interconnessi, che sono essenzialmente riconducibili a reazioni acido-base, comprendendo in questo termine anche le reazioni di scambio ionico, e quelle di ossido-riduzione. In termini generali, le reazioni di ossidazione (nitrificazione, ossidazione dei solfati, ecc.) tendono ad acidificare il sistema, mentre il dilavamento, inteso come processo di solubilizzazione e di scambio ionico nelle rocce e nel suolo, insieme con le reazioni di riduzione (denitrificazione, ecc.), servono a consumare protoni aggiungendo riserva alcalina alle acque. I processi di sintesi e di respirazione o demolizione della sostanza organica possono essere guardati come casi particolari delle reazioni di ossido-riduzione. Nei laghi, la fotosintesi è infatti un processo biologico mediante il quale le alghe, utilizzando la luce come fonte di energia, producono ossigeno e convertono in sostanza organica l'anidride carbonica, l'acqua e nutrienti quali l'azoto e il fosforo; durante la reazione di riduzione del carbonio inorganico (fotosintesi), il consumo di CO₂ basifica il sistema, tant'è vero che il pH nella zona di massima produzione in laghi poco tamponati raggiunge valori intorno a 9,2. Al contrario, la respirazione e/o la mineralizzazione aerobica della sostanza organica, avvengono con il rilascio di CO₂ e conseguente diminuzione del pH. Se poi l'intensità

di questi processi è tale da consumare completamente l'ossigeno disponibile, come avviene nell'ipolimnio di laghi eutrofici come quelli qui presi in esame, allora la demolizione della sostanza organica prosegue in ambiente anaerobico attraverso una serie di reazioni di riduzione che tendono a basificare il mezzo e rappresentano livelli successivi di potenziali redox sempre più bassi.

Per misurare il pH è stata utilizzata una sonda della Mettler Toledo modello In Lab 482 che opera per via elettrometrica misurando la differenza di potenziale tra l'elettrodo di misura (elettrodo a vetro) e un elettrodo di riferimento a potenziale noto (elettrodo a calomelano). L'elettrodo a vetro è costituito da una membrana sferica di vetro, permeabile agli ioni H^+ , che nella sua parte interna contiene l'elettrodo di riferimento a calomelano in contatto mediante ponte salino (KCl saturo) con una soluzione di acido cloridrico tamponata a pH noto. Con l'immersione dell'elettrodo nel campione, tra le due interfacce della sottile membrana di vetro si stabilisce una differenza di potenziale che obbedisce alla legge di Nernst ed è funzione della differenza esistente tra l'attività (o concentrazione) dello ione idrogeno nella soluzione interna (a pH noto e tamponato) e quella esterna.

L'elettrodo a vetro non risente di interferenze quali colore, torbidità, sostanze ossidanti o riducenti.

Determinazione della conducibilità

La conducibilità è la capacità di una soluzione di far passare la corrente: la quantità di corrente che passa è proporzionale al numero di ioni presenti in soluzione; quindi la misura della conducibilità fornisce una lettura diretta della concentrazione della soluzione. Il livello della forza ionica varia dunque da una bassa conducibilità, tipica di acque pure, ad una alta conducibilità, caratteristica di acque inquinate. Per determinare questo parametro è stata utilizzata una sonda della Mettler Toledo modello In Lab 781. Il sensore opera per un principio a quattro anelli di platino posti concentricamente uno sopra l'altro lungo la sonda. Un voltaggio alternato è applicato ai due anelli più esterni. Nella soluzione campione il voltaggio induce una corrente, la cui intensità dipende dal numero di ioni presenti. Quindi, la corrente misurata dai due anelli più interni dà un valore diretto della conducibilità della soluzione. Visto che la misura di questo parametro è volume dipendente, la guaina esterna della sonda assicura che il volume della soluzione campione rimanga costante per ogni analisi.

Determinazione dell'ossigeno disciolto

È stata utilizzata una sonda Hanna Instruments HI 9143.

Il metodo è basato sull'uso di elettrodi di tipo polarografico che misurano la corrente di diffusione prodotta dalla riduzione di ossigeno al catodo. La cella è costituita da un catodo di platino, o di un altro metallo nobile, e un elettrodo ad AgCl/Ag di riferimento immersi nell'elettrolita di supporto contenuto da una membrana fermata da un O-ring di gomma. Tra i due elettrodi viene mantenuta una opportuna differenza di potenziale (0,6-0,8 V). Il metodo si presta per rilevazioni in continuo, specie se l'elettrodo è in movimento. Se la misura avviene ad elettrodo fermo, è necessario agitare il campione.

Metodi di analisi

Sedimentazione e conta delle cellule

I campioni sono stati posti a sedimentare in appositi pozzetti di plexiglas con il fondo trasparente e capacità di 25 mL per un periodo di 24-48 ore e poi esaminati all'invertoscopia (Leitz, labovert FS).

Le tecniche di conta algale più utilizzate sono quella per strisce e quella per campo.

La tecnica per strisce raccomanda di contare strisce perpendicolari attraverso il centro del fondocamera. L'ampiezza delle strisce è costante per ogni serie di campioni. Il calcolo del numero di cellule per millilitro si effettua con la formula:

$$C \times At / L \times W \times S \times V = n. / mL$$

dove C è il numero di organismi contati; At è l'area totale del fondocamera in mm²; L è la lunghezza di una striscia in mm; W è l'ampiezza di una striscia in mm; S è il numero di strisce contate e V è il volume del campione nella camera in mL.

La tecnica di conta per campo prevede l'esame casuale di campi non sovrappoventisi fino a contare 100 unità della specie dominante. Il calcolo si esegue mediante la formula:

$$C \times At / Af \times F \times V = n. / mL$$

dove Af è l'area di un campo in mm² ed F è il numero dei campi contati.

Nel nostro caso è stata applicata la tecnica per strisce (Ottaviani & Bonadonna, 2000).

Determinazione della clorofilla a

Le clorofille sono molecole a struttura tetrapirrolica che legano al centro un atomo di magnesio, a funzione di accezione fotonica durante la sintesi fotochimica. Questa reazione consente alle piante, e quindi anche alle alghe, di avere un metabolismo autotrofo. La clorofilla a, contenuta in tutti i phyla algali, permette di valutare la presenza complessiva di tutte le alghe che compongono il fitoplancton (Ottaviani & Bonadonna, 2000).

Il metodo si basa sulla determinazione spettrofotometrica della clorofilla a estratta in acetone dalle cellule fitoplanctoniche preconcentrate su filtro. La molecola è, infatti, in grado di assorbire la luce rossa dello spettro visibile. Acidificando l'estratto si ha la perdita dell'atomo di magnesio dal nucleo porfirinico della clorofilla a che degrada a feofitina. La successiva misura spettrofotometrica dell'estratto acidificato consente il calcolo della feofitina a e delle clorofilla b e c nel campione originale, mediante l'applicazione di equazioni che fanno uso dei rispettivi coefficienti di assorbimento (Ottaviani & Bonadonna, 2000).

Il picco di assorbimento della clorofilla è molto stretto e la banda passante ottimale è tra 0,5 e 2 nm.

Strumentazione e vetreria

- Beute da vuoto con supporti per filtri in Pyrex da 47 mm di diametro;
- Centrifuga;
- Filtri in nitrato di cellulosa con porosità 0,45 µm e diametro 47 mm;
- Manometro;
- Pinzette a punte piatte;
- Pompa;
- Provette da 10 mL con tappo a tenuta;

- Sistema di omogeneizzazione a cavitazione;
- Spettrofotometro UV/VIS, in questo caso il modello è Lambda Bio della Perkin Elmer.

Reagenti

- Soluzione acquosa di acetone al 90%.

Procedura

Servendosi delle pinzette si pone il filtro sul supporto e si filtra un volume idoneo di campione (1 litro) utilizzando l'apposito sistema di filtrazione. Si applica una depressione non superiore ai 50 Kpa (350 mm Hg). Si omogeneizza per 10 secondi il filtro in 10 mL di acetone – acqua al 90% con un omogeneizzatore regolato alla velocità di 25.000-30.000 rotazione per minuto (rpm). Il campione viene poi posto al buio a +4°C e si lascia in posa per 10 minuti.

Si chiarifica trasferendo l'omogenato in una provetta e centrifugando per 20 minuti a 6000 xg; si preleva poi il surnatante dosandone il volume.

Determinazione spettrofotometrica

Si misura l'assorbanza del surnatante alle lunghezze d'onda di 750, 663, 645, 630 nm utilizzando un bianco costituito dalla soluzione di acetone al 90%. La lettura dell'estratto a 750 nm fornisce una misura della torbidità dell'estratto che non deve superare 0,01 unità di assorbanza. In caso contrario è necessario ripetere il procedimento di chiarificazione.

Per il calcolo dei risultati, infine, è necessario inserire le assorbanze (A):

$$\text{mg/L} = [11,64 (A_{663} - A_{750}) - 2,16(A_{645} - A_{750}) - 0,10(A_{663} - A_{750})] V_e / V_f$$

dove: V_e = volume (mL) dell'estratto

V_f = volume (mL) filtrato.

Estrazione tossicologica e biosaggio

Per effettuare l'estrazione delle tossine dalle alghe per il biosaggio con *V. fisheri* 10 mg di alghe in peso fresco vengono sospese in 1 mL di acqua sterile bidistillata e sonicate per 5 minuti a 30-40 °C, con 20 secondi di vortex dopo 2,5 minuti di sonicazione. La sospensione viene quindi centrifugata per 10 minuti a 11.000 rpm, e il supernatante raccolto a parte, mentre il centrifugato viene risospeso in 1 mL di acqua sterile bidistillata e il procedimento ripetuto per intero. Al termine, i due supernatanti così ottenuti vengono uniti e saggiati con il biosaggio (Ottaviani & Bonadonna, 2000).

Per la rilevazione della presenza di tossine algali si usa un biosaggio su batteri *Vibrio fisheri*: il sistema Microtox. Esso si basa sulla esposizione di concentrazioni note di *V. fisheri*, batterio fosforescente di profondità marine, a diverse concentrazioni crescenti della sospetta sostanza tossica. La luminosità batterica si estingue in proporzioni coerenti con la quantità di tossico con cui viene a contatto e con il tempo di esposizione (5', 15' o 30'). I valori di estinzione, registrati dal luminometro dell'apparecchio in base ad una scala interna, vengono elaborati statisticamente dal software fornito con lo strumento, che permette di calcolare il coefficiente di estinzione del 50% dei batteri presenti, compresi i limiti di confidenza, in base ad una curva tracciata raccogliendo le percentuali di estinzione causate da tutte le varie concentrazioni del tossico saggiato (Ottaviani & Bonadonna, 2000).

Prova su HPLC

Nella HPLC la colonna cromatografica è stretta e lunga e viene riempita con sferette piccolissime di vetro o di plastica rivestite con uno strato sottile di fase stazionaria. La fase mobile viene forzata a passare attraverso la colonna molto impaccata ad una pressione che può superare le 1000 atmosfere, riducendo considerevolmente i tempi di risoluzione. L'elevata risoluzione della HPLC consente di separare miscele di sostanze che non possono essere isolate con altri metodi e la sua alta sensibilità consente di valutare quantitativamente anche frazioni di picomoli di sostanza.

Per la rilevazione delle microcistine, dopo aver effettuato l'estrazione sopra descritta, il campione viene iniettato in una colonna tipo REGIS ISRP GFF S5-80 di 15 cm di lunghezza e 4,6 mm di diametro, oppure tipo C18 RP Lichrochart, con fase mobile 12% acetonitrile 88% tampone fosfato acido di potassio 0,1 M (pH 6,9) a flusso 1 mL/min, e letto con uno strumento Perkin Elmer series 200 a lunghezza d'onda 238 nm e 0,005 AUFS (limite di rilevazione 1 mg/L). Entro 5 minuti si ottiene la risoluzione delle tossine (Meriluoto *et al.*, 1988)

RISULTATI DELLO STUDIO

Nemi

Le analisi relative alla quantità di NH_3 , NO_2 , NO_3 , N totale, PO_4 solubili e P totale sono state eseguite dal marzo 2002 all'aprile 2003. La determinazione dei nitrati è stata effettuata mediante spettrofotometria UV (Ottaviani & Bonadonna, 1997) e quella degli altri nutrienti mediante spettrofotometria per assorbimento molecolare. I risultati per ogni stazione di prelievo sono riportati in Figura 7.

Come si può notare la quantità di fosforo totale supera spesso il valore soglia (84,4 $\mu\text{g/L}$ pari a 0,0844 mg/L) indicato dall'OECD per considerare un corpo d'acqua eutrofizzato (vedi Figura 7 e Figura 8: maggio, giugno e ottobre 2002 solo in profondità perché rilasciati dai sedimenti in condizioni di anossia). Anche l'azoto totale si avvicina spesso al suo valore soglia (1875 $\mu\text{g/L}$ pari a 1,875 mg/L), come si può notare a ottobre 2002 alla profondità di 25 metri, a novembre 2002 e a gennaio 2003 sempre alla stessa profondità. In particolare i nitrati raggiungono livelli molto alti nel periodo che va da marzo a giugno e all'inizio dell'autunno, toccando picchi di 3,77 mg/L a maggio a -25 m, per poi diminuire nel periodo estivo e invernale. Ciò è probabilmente dovuto alla pesante concimazione che avviene nel periodo primaverile e autunnale nei numerosi terreni coltivati presenti intorno all'invaso: in seguito al dilavamento del suolo i nitrati presenti nei prodotti fertilizzanti e concimanti raggiungono le acque del lago. In alcuni mesi si riscontra anche un picco di Ammoniaca sul fondo del lago, dovuto probabilmente ai processi di decomposizione della biomassa algale.

Per quanto riguarda il contenuto di clorofilla *a*, le estrazioni effettuate mensilmente hanno evidenziato che essa supera la soglia di 14,6 $\mu\text{g/L}$ in tutte le stazioni a gennaio, raggiungendo picchi di 24,47 $\mu\text{g/L}$ a febbraio alla profondità di 5 metri e attestandosi comunque su valori piuttosto alti nelle stazioni superficiali ("Serre": 19,31 $\mu\text{g/L}$; "Casetta": 22,39 $\mu\text{g/L}$; "Cipressi": 22,19 $\mu\text{g/L}$; "Museo": 19,11 $\mu\text{g/L}$) da gennaio a marzo per poi riportarsi, con il procedere della stagione primaverile, a valori più bassi superficialmente, ma rimanendo un po' più elevata in profondità fino all'inverno successivo (Figure 9-12). Questo andamento della clorofilla *a* rispecchia perfettamente la dinamica di popolazione di *Planktothrix rubescens* che proprio tra gennaio e marzo dà luogo a fioriture più o meno imponenti, per poi tornare negli strati più profondi quando le condizioni di luce, temperatura e nutrienti non sono più ottimali, grazie alla sua capacità di regolare la galleggiabilità e spostarsi lungo la colonna d'acqua (Figura 10). In effetti, proprio tra gennaio e marzo la temperatura dell'acqua raggiunge valori ottimali per la crescita della cianofitea, il pH è piuttosto alcalino (circa 8) e il rapporto N/P è molto superiore a 10 (condizione essenziale per la fioritura di *Planktothrix rubescens*). Ciò ovviamente si ripercuote sui valori della conducibilità, che in corrispondenza della fioritura sono piuttosto alti. Per quanto riguarda l'ossigeno disciolto, si può notare che l'ipolimnio è spesso anossico, con valori che, nel periodo marzo-dicembre 2002, non superano i 3,1 mg/L (vedi Figura 7). In superficie i valori più bassi si riscontrano a settembre 2001 e settembre 2002, con un minimo di 2,24 mg/L a gennaio 2002; valori più alti sono stati rilevati ad aprile 2002, dicembre 2002, gennaio 2003 e con un massimo di 12,74 mg/L a luglio 2001.

Come si può notare dalle Figure 9 e 13 il termoclino comincia a formarsi a maggio attestandosi tra i 5 e i 15 metri di profondità e persiste fino a novembre, quando le acque sono soggette al rimescolamento totale.

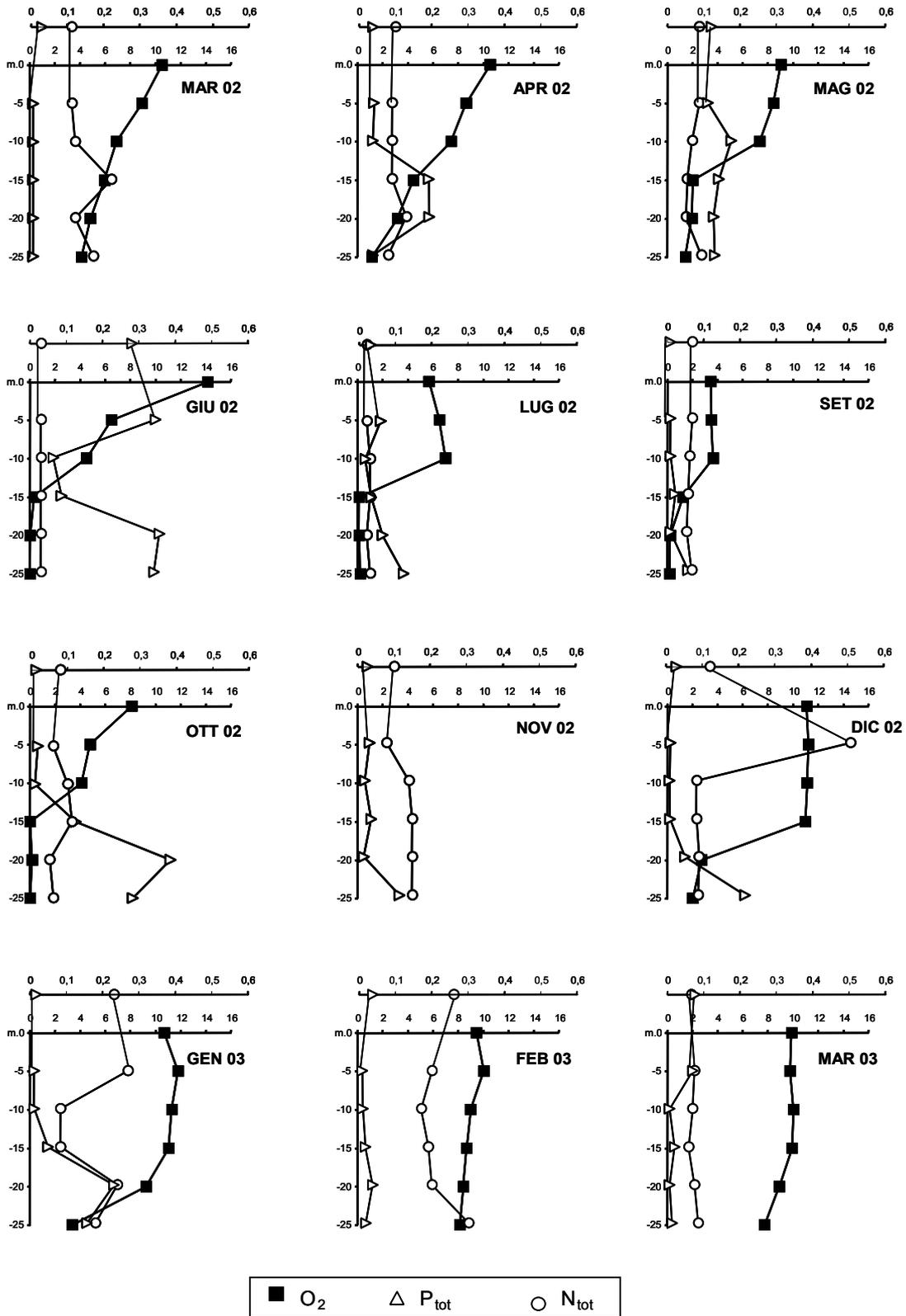


Figura 7. LAGO DI NEMI: analisi chimiche su ossigeno, fosforo e azoto totale

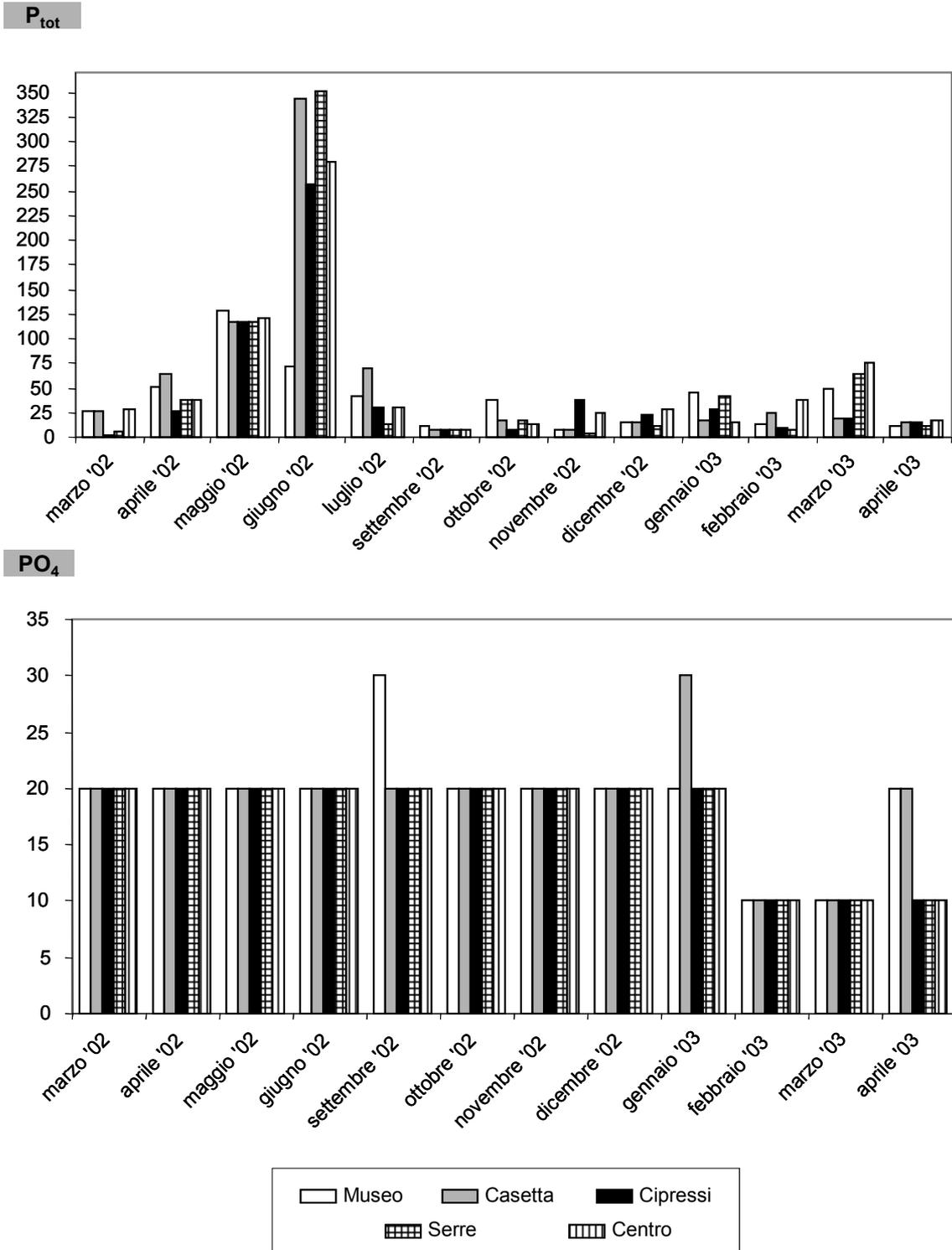


Figura 8. LAGO DI NEMI: andamento in particolare di P_{tot} e PO₄ nelle stazioni superficiali

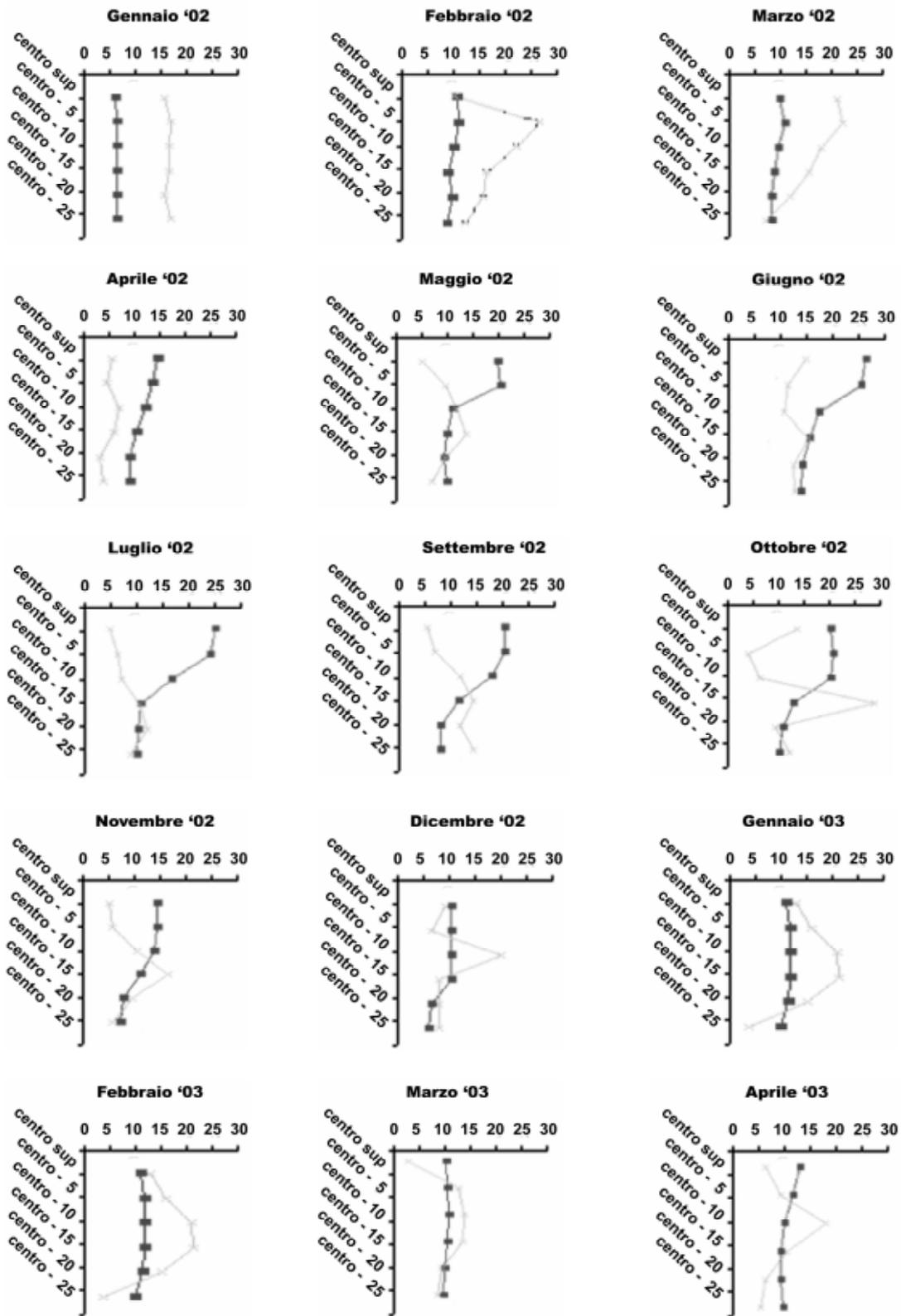


Figura 9. LAGO DI NEMI: comparazione tra T e Chl a ($\mu\text{g/L}$)- (gennaio 2002 – aprile 2002)

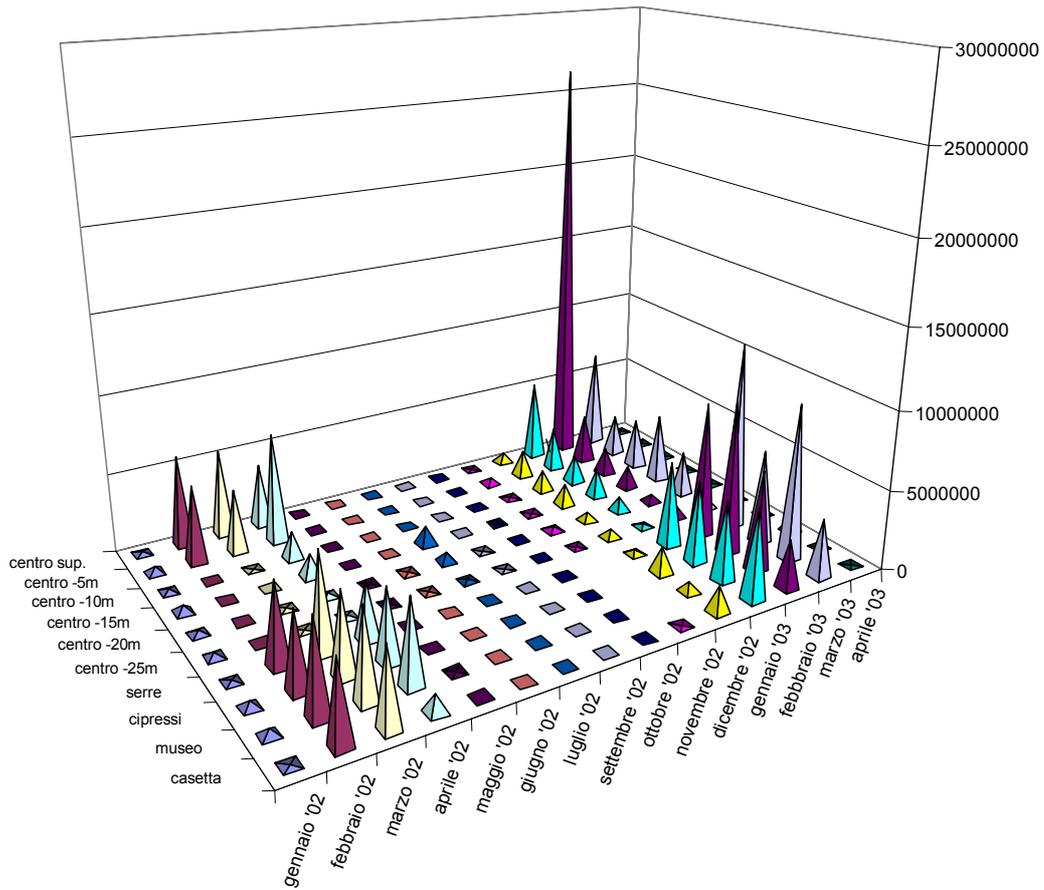


Figura 10. LAGO DI NEMI: andamento della fioritura di *P. rubescens*

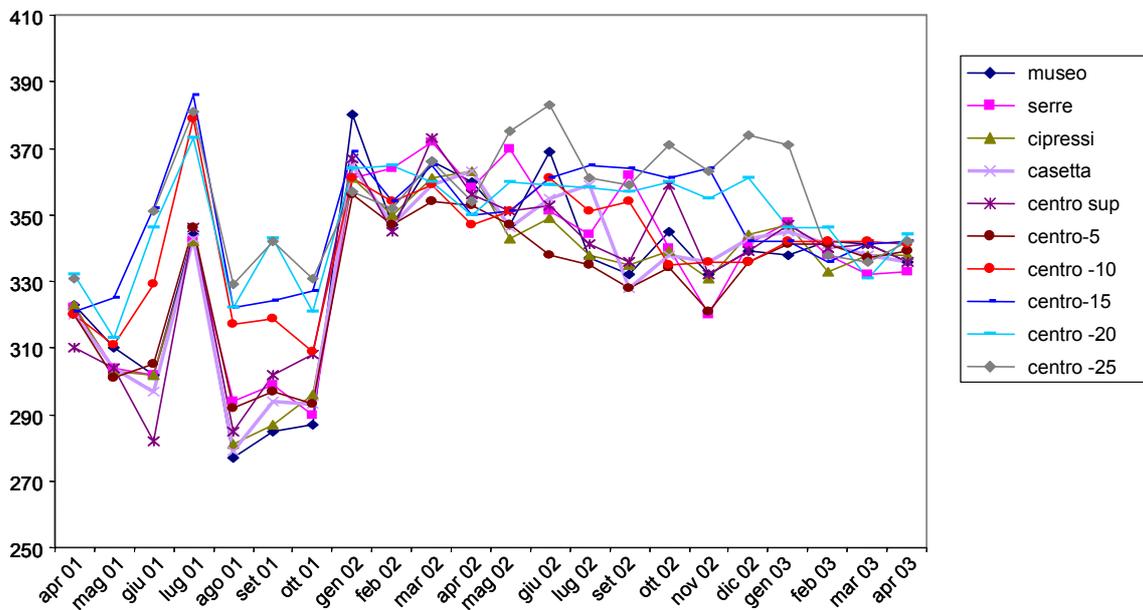


Figura 11. LAGO DI NEMI: andamento della conducibilità (µS)

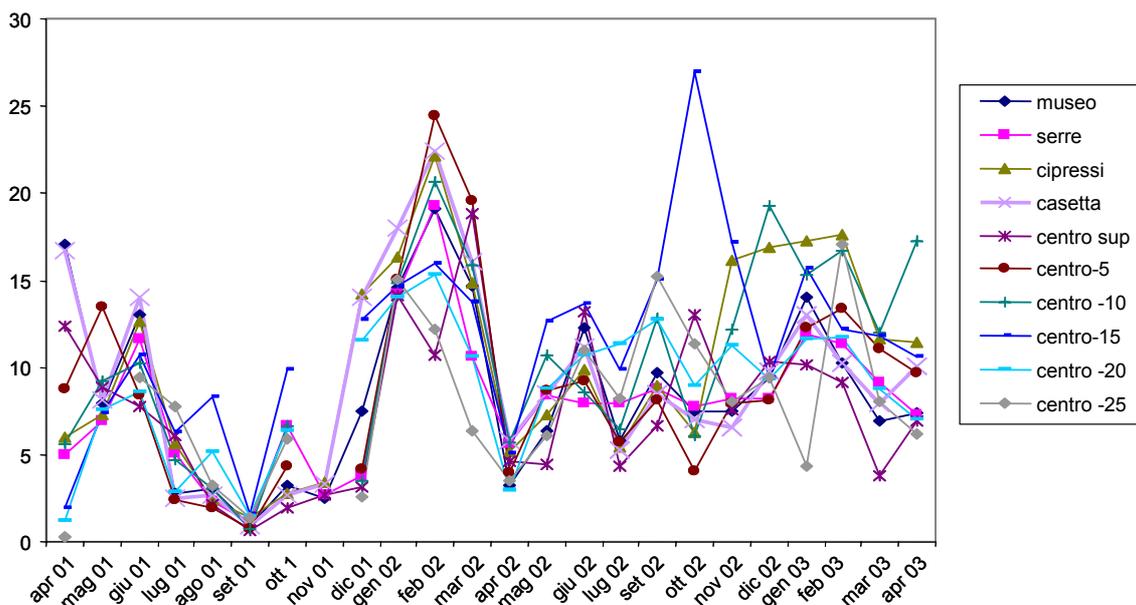


Figura 12. LAGO DI NEMI: andamento della clorofilla a (µg/L)

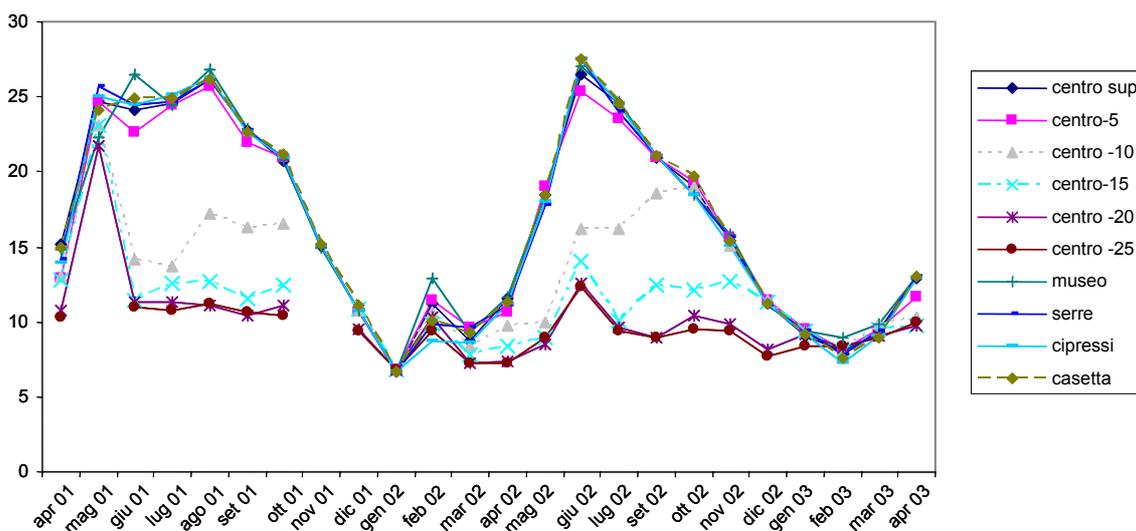


Figura 13. LAGO DI NEMI: andamento della temperatura (°C)

Per quanto riguarda il biosaggio con *Vibrio fischeri*, il risultato del test con Microtox effettuato a marzo 2002 sull'estratto di una retinata, ha evidenziato una concentrazione efficace mediana (*Effective Concentration 50%*, EC_{50}) a 5 minuti di 257,7 mg di alghe in peso fresco/mL e a 15 minuti una EC_{50} di 230,8 mg di alghe in peso fresco/mL. In generale la fioritura nel 2002 si è presentata con una schiuma superficiale di circa 11 milioni di cell/L a cui corrispondeva risposta positiva al biosaggio Microtox (EC_{50} a 5 minuti di 16,18%) e all'HPLC (3,3 ng di microcistine-RR/mg di alghe in peso fresco).

Albano

Per quanto riguarda le analisi chimiche (Figure 14 e 15), si può notare che i valori di fosforo totale sono molto alti lungo tutta la colonna ad aprile 2002 (fino a 166 µg/L), a ottobre 2002 e a novembre 2002, dove però in profondità sono bassissimi; negli altri mesi il fosforo totale rimane a livelli minori. Al contrario l'azoto totale da aprile 2002 a ottobre 2002 è molto basso, poi da novembre 2002 raggiunge valori di circa 100 µg/L (pari a 0,1 mg/L) e si mantiene intorno a questo livello a dicembre 2002 (nelle stazioni superficiali), gennaio 2003, febbraio 2003, per poi tornare a bassi livelli a marzo 2003 (diversamente da marzo 2002 in cui era più alto). Quindi proprio tra gennaio e marzo il valore del rapporto azoto/ fosforo si attesta su valori decisamente maggiori di 10, condizione favorevole alla fioritura di *P. rubescens*. Anche i nitrati sono sempre piuttosto elevati nella stagione invernale fino a marzo (tra 0,5 e 0,74 mg/L) e poi diminuiscono in primavera fino quasi a scomparire in estate. Tuttavia i valori dei nitrati sono più bassi e più uniformi rispetto a quelli riscontrati a Nemi, probabilmente perché sono dovuti non tanto alle concimazioni stagionali dei terreni circostanti, quanto all'inquinamento della falda acquifera della zona dei Castelli Romani.

Ad Albano è stato riscontrato, nei mesi di gennaio e febbraio 2003, un insolito aumento della ammoniaca lungo la colonna d'acqua.

I livelli di clorofilla *a* sono piuttosto elevati in superficie a gennaio e febbraio 2002 per poi abbassarsi notevolmente da marzo 2002 alla fine dell'estate. In questo periodo, però, i valori di clorofilla *a* in profondità rimangono abbastanza alti, confermando così che la biomassa algale si sposta lungo la colonna d'acqua verso il fondo per poi risalire in superficie in inverno, quando la temperatura e le condizioni di luce sono più favorevoli (Figura 16). I valori massimi di clorofilla *a* sono stati riscontrati a marzo 2001 in tutte le stazioni di superficie: il picco si è avuto a "Hotel" (32,55 µg/L), ma anche nelle stazioni di "Bosco" (14,13 µg/L) e "Molo" (16,65 µg/L) il livello è stato molto alto.

Come si può notare dal Figura 17 nel febbraio e marzo 2001 si è verificata una imponente fioritura di *P. rubescens* che ha raggiunto valori dieci volte maggiori del limite di 5 milioni di cellule /litro raccomandato per l'interdizione della balneazione. In quella occasione, a seguito alle rilevazioni dell'ISS, la ASL RMH ha interdetto agli usi umani le acque del lago. Il divieto si è poi ripetuto anche nell'inverno 2002, 2003 e 2004 in quanto il numero di cellule/litro di *P. rubescens*, sebbene minore rispetto all'inverno 2001, superava comunque il limite sopra indicato.

Per quanto riguarda l'ossigeno disciolto, è possibile notare che l'ipolimnio non è anossico come a Nemi: livelli piuttosto bassi si riscontrano solo in estate e inizio autunno, con un valore minimo a ottobre 2001 di 2,01 mg/L, mentre nel resto dell'anno i valori oscillano tra 4,71 e 9,6 mg/L. Nelle stazioni superficiali, invece, il livello di ossigeno disciolto è basso in autunno e in inverno, in cui può scendere fino a 3,13 mg/L (gennaio 2002, stazione a -5 m), e risale poi in primavera ed estate raggiungendo valori tra 8 e 10 mg/L con un valore massimo di 14,9 mg/L ad aprile 2002.

L'andamento della conducibilità (Figura 18) mostra, nelle stazioni superficiali, livelli piuttosto alti in autunno e in inverno con valori che variano tra 495 e 576 µS e un picco di 781 µS a ottobre 2002 nella stazione a 5 metri di profondità, mentre in primavera i valori in superficie si attestano tra 425 e 510 µS; il valore minimo di 329 µS si ha nella stazione a 30 metri di profondità a ottobre 2002. Questi risultati sono compatibili con le variazioni stagionali della popolazione della cianofitea tossica che in autunno comincia a salire dagli strati più profondi per poi dar luogo a fioriture superficiali in inverno e ritornare in profondità in primavera. In generale comunque, i valori della conducibilità risultano molto più alti rispetto a Nemi.

Come si può notare dalle Figure 16 e 19 il termocline inizia a formarsi a maggio, divenendo più pronunciato da luglio in poi e attestandosi tra i 10 e i 20 metri di profondità fino a ottobre, per poi scomparire in inverno.

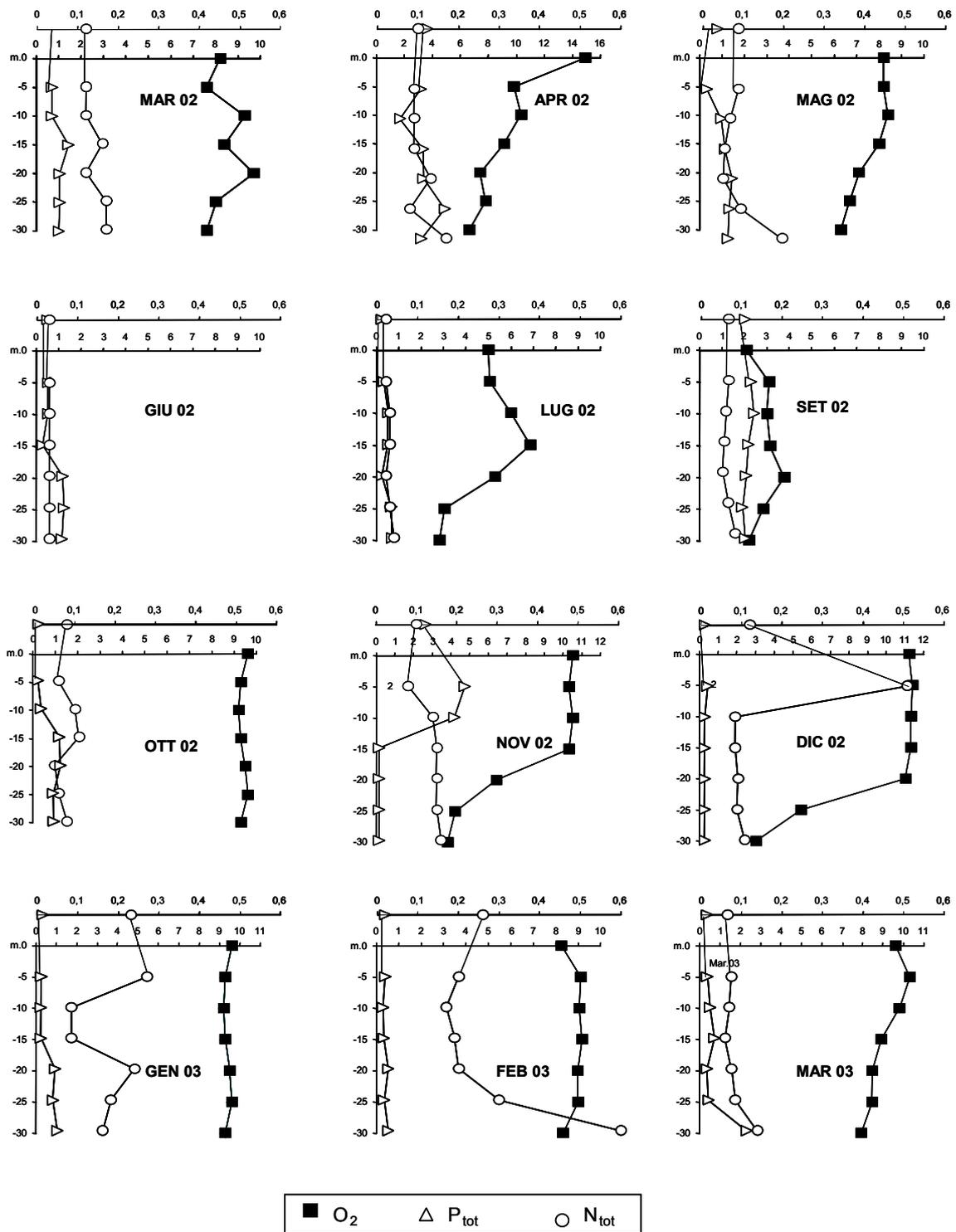


Figura 14. LAGO DI ALBANO: analisi chimiche su ossigeno, fosforo e azoto totale

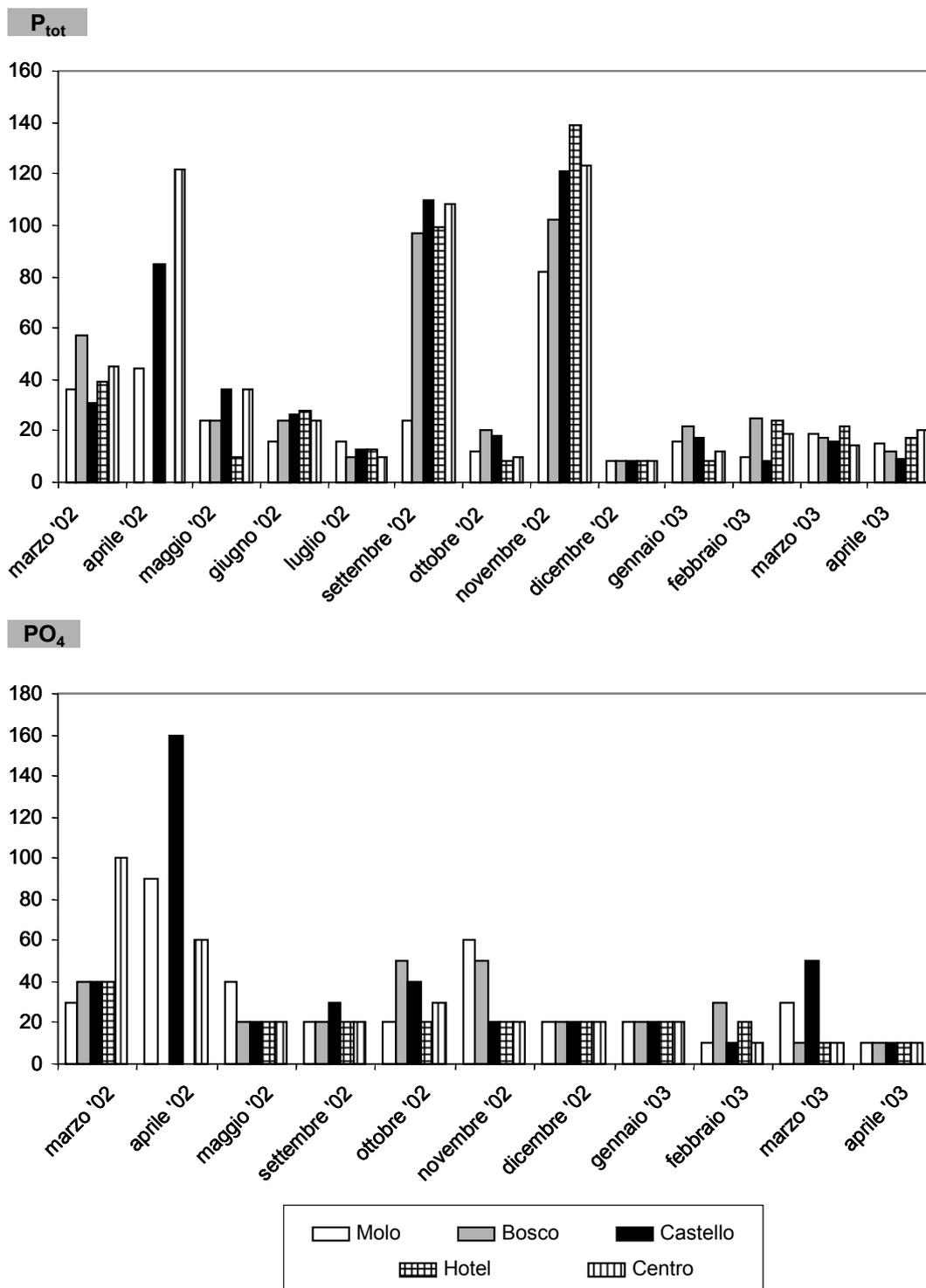


Figura 15. LAGO DI ALBANO: andamento in particolare di P_{tot} e PO₄ nelle stazioni superficiali

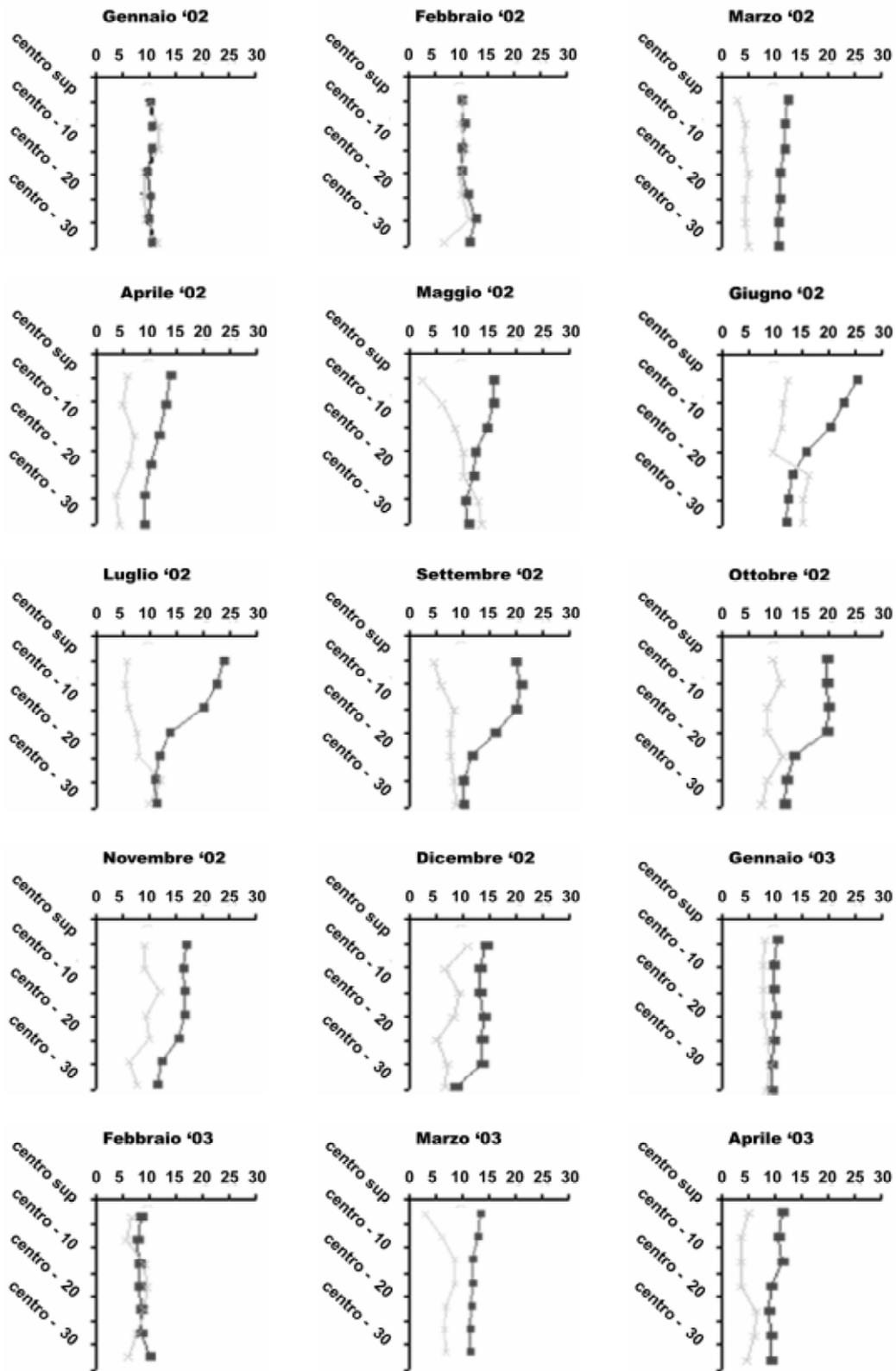


Figura 16. LAGO DI ALBANO: comparazione tra Chl a ($\mu\text{g/L}$) e temperatura

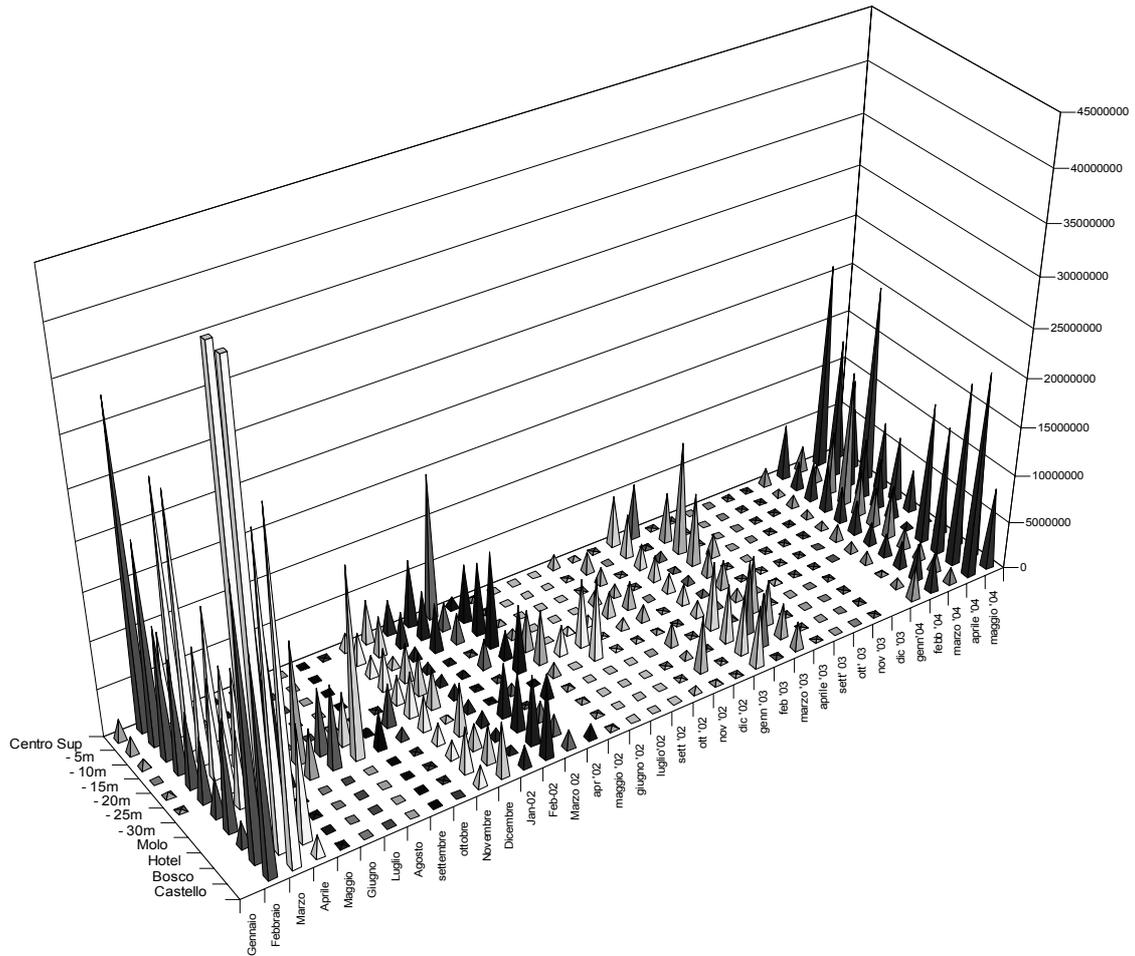


Figura 17. LAGO DI ALBANO: andamento della fioritura di *P. rubescens*

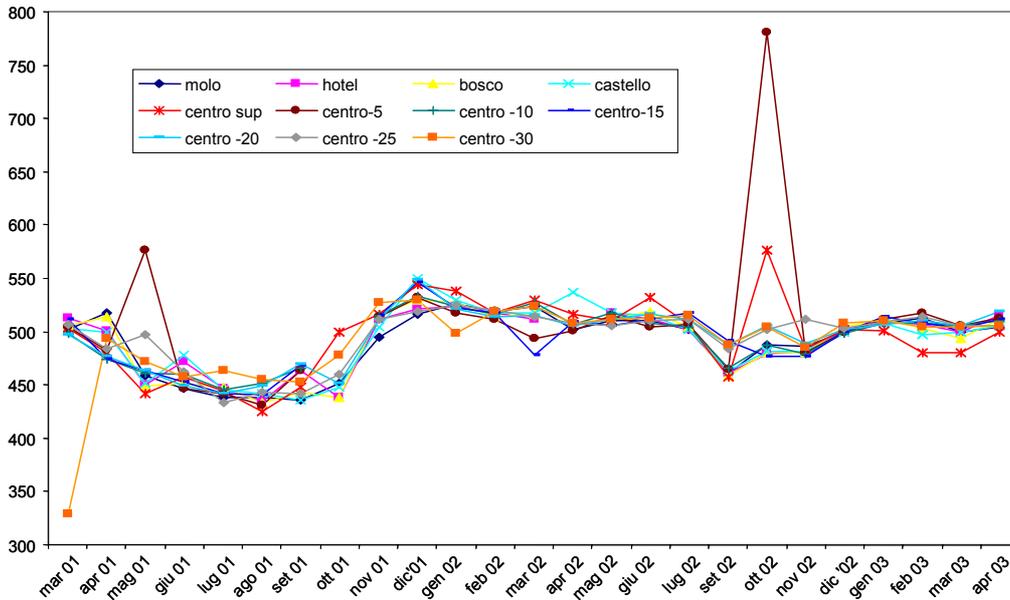


Figura 18. LAGO DI ALBANO: andamento della conducibilità (µS)

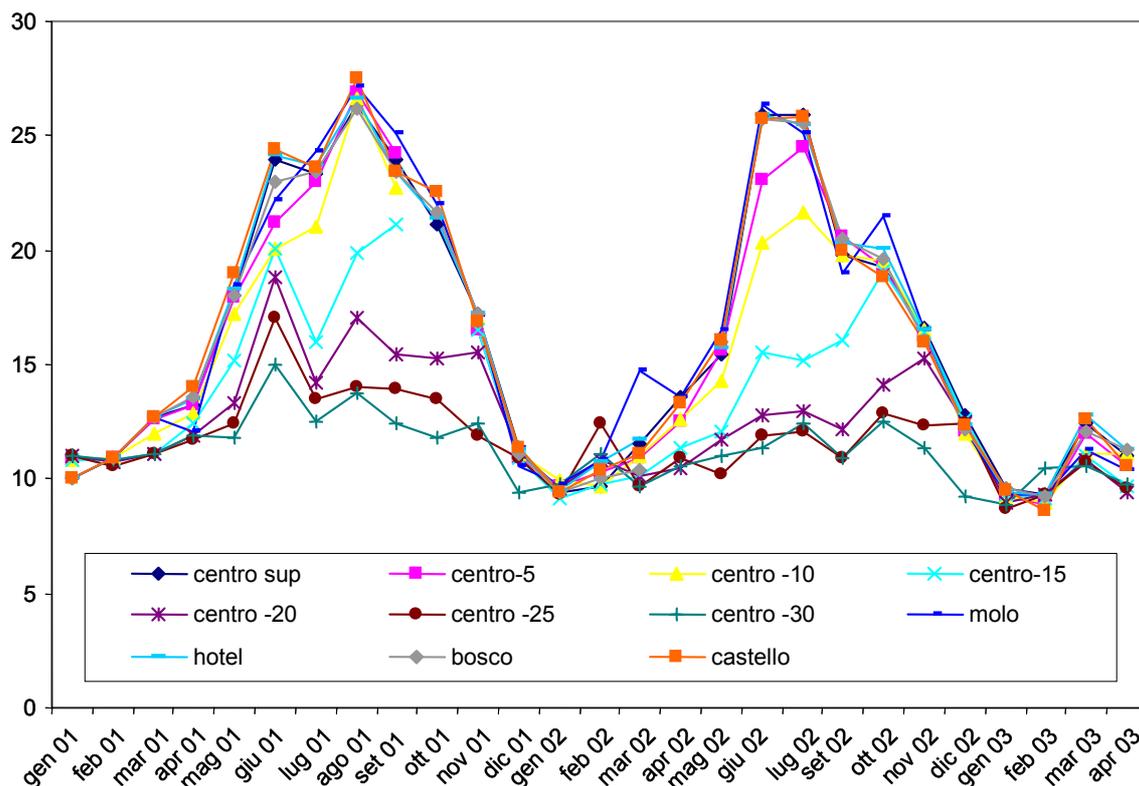


Figura 19. LAGO DI ALBANO: andamento della temperatura (°C)

Per quanto riguarda i risultati del biosaggio, le prime evidenze di tossicità dei campioni prelevati sul lago Albano sono state rilevate con il Microtox nel 2001: l'estratto del campione proveniente dalla stazione "castello" a febbraio in cui era presente una discreta fioritura (7.578.000 cell/L) rivelava a 5 minuti una EC₅₀ di 114,5 mg di alghe in peso fresco/mL e la microcistina-RR era presente nell'acqua in misura di 12,8 µg/L. A marzo l'estratto del campione proveniente dalla stazione "Hotel", in cui *P. rubescens* era presente in maniera imponente con 138.428.571 cell/L, mostrava una EC₅₀ a 5 minuti di 19,73 mg di alghe in peso fresco /mL e a 15 minuti di 20,04 mg di alghe in peso fresco /mL. L'ultimo test tossicologico effettuato a marzo 2003 sull'estratto di una retinata, ha evidenziato una EC₅₀ a 5 minuti di 24,77 mg di alghe in peso fresco/mL e a 15 minuti di 71,01 mg di alghe in peso fresco/mL.

CONSIDERAZIONI SUI RISULTATI SPERIMENTALI

Attualmente, dai risultati esposti in questo lavoro, si evince che entrambi i laghi sono passati in pochi decenni da uno stato di oligotrofia, documentato dai lavori sopra nominati, ad uno stato di eutrofia e tendono ad evolvere verso un stato di ipertrofia anche a causa del costante abbassamento del livello delle loro acque. Questo è verificabile prendendo in considerazione i valori dei nutrienti presenti nei due invasi: ad Albano il fosforo totale e l'azoto totale raggiungono rispettivamente un massimo di 220 µg/L e 600 µg/L, mentre a Nemi il fosforo totale arriva a 352 µg/L (con un picco di 2192 µg/L ad aprile 2002 nella stazione di -15 m), mentre l'azoto totale tocca i 1825 µg/L. Inoltre i valori di clorofilla *a* sono sempre piuttosto alti e raggiungono picchi superiori a 27 µg/L; l'ossigeno ipolimnico disciolto è in media 6,6 mg/L ad Albano e 3,4 a Nemi. La conducibilità media annua ad Albano è 494,4 µS e a Nemi 339 µS. Negli ultimi mesi si può notare un lieve miglioramento della concentrazione di ortofosfati nelle stazioni superficiali a Nemi, dovuto alla deviazione dello sbocco fognario avvenuta tra febbraio e marzo 2003, tuttavia il fosforo totale continua ad aumentare in primavera perché proveniente dalla concimazione del suolo con fosfato d'ammonio.

A Nemi il numero di cellule/litro di *Planktothrix rubescens* nelle stazioni di superficie comincia a crescere notevolmente all'inizio dell'inverno, attestandosi intorno ai 5.000.000 a gennaio 2003, arrivando poi a toccare picchi elevati a febbraio 2003 ("Cipressi": 9.623.998 cell/L; "Museo": 6.306.324 cell/L; "Serre": 8.572.944 cell/L) con un massimo al "Centro lago" di 26.322.048 cell/L, rimanendo su valori notevoli anche a marzo 2003 ("Serre": 11.899.759 cell/L; "Museo": 9.870.768 cell/L; "Centro superficie": 6.361.161 cell/L), per poi scomparire dalla superficie ad aprile.

Ad Albano i picchi superficiali di ortofosfati e fosforo totale riscontrati in alcuni mesi (es. aprile, settembre e novembre 2002) sono causati molto probabilmente da scarichi abusivi, inoltre la condotta circumlacuale che doveva raccogliere gli scarichi dell'intera zona e deviarli dal lago non è operativa pur essendo stata ultimata già da tempo.

Anche ad Albano il numero di cellule /litro di *Planktothrix rubescens* nelle stazioni di superficie cresce con l'inizio dell'inverno: nel 2001 la fioritura è imponente e raggiunge valori elevati a febbraio ("Centro lago": 33.000.000 cell/L; "Castello": 22.320.000 cell/L; "Bosco": 27.520.000 cell/L; "Molo": 11.863.636 cell/L), a marzo tocca i picchi massimi con 136.640.000 cell/L nella stazione di "Molo" e 138.428.571 in quella di "Hotel", ad aprile comincia a scendere in profondità (-10 m: 13.800.000 cell/L; -20 m: 10.350.000 cell/L) e scompare dalla superficie. Nel 2002 la fioritura, sebbene molto più modesta, supera comunque i limiti di legge raggiungendo valori di 6.900.000 cell/L a febbraio nella stazione di "Centro lago", 7.100.000 cell/L nella stazione di "Bosco" e 7.500.000 cell/L in quella di "Castello"; a marzo sono presenti ancora 15.000.000 di cell/L nella stazione di "Centro lago"; ad aprile non c'è più traccia della fioritura in superficie. Nel 2003 l'inizio della fioritura è anticipato di un mese, probabilmente a causa delle condizioni climatiche, e già a gennaio si riscontrano 5.200.000 cell/L a "Centro lago", 7.000.000 cell/L nella stazione di "Molo", 6.000.000 cell/L in quella di "Hotel", 6.200.000 e 6.400.000 cell/L rispettivamente a "Bosco" e "Castello". La fioritura continua a febbraio con valori di 5.685.470 cell/L a "Centro lago", 7.540.170 nella stazione di "Hotel" e 5.450.200 in quella di "Bosco"; si sposta poi in basso lungo la colonna d'acqua prima del solito: già a marzo la popolazione di *Planktothrix rubescens* si attesta tra i 10 e i 15 metri di profondità per poi quasi scomparire ad aprile.

Questa situazione ha determinato l'interdizione alla balneazione, agli usi ricreativi e alla pesca in entrambi i laghi durante i periodi di fioritura della cianoficea tossica.

Si ritiene che *Planktothrix rubescens* sia comparsa ad Albano e Nemi approssimativamente intorno agli anni settanta quando la sua presenza si è manifestata con fioriture che hanno determinato l'arrossamento delle acque dei due invasi; prima di quel periodo questa cianoficea non era mai stata rilevata dagli studiosi che avevano esaminato la composizione del fitoplancton dei due laghi, o probabilmente la sua popolazione non aveva mai raggiunto un livello tale da essere notata quale componente importante nel biovolume fitoplanctonico. Negli ultimi anni, comunque, la popolazione di *Planktothrix rubescens* si è rapidamente accresciuta a tal punto da rappresentare da sola nel periodo invernale la quasi totalità della biomassa fitoplanctonica: questo drastico abbassamento della biodiversità costituisce una ulteriore prova dell'aggravarsi delle condizioni trofiche dei due laghi.

Visti questi dati, si rende sicuramente necessaria l'attuazione di un piano di recupero dei due invasi per poter migliorare il loro stato trofico e, in questo modo, eliminare le condizioni per le fioriture della cianoficea tossica *Planktothrix rubescens* che, come è ormai noto, è tipica di acque eutrofizzate con determinate caratteristiche dal punto di vista dei nutrienti.

Attualmente esistono diversi metodi per depurare i corpi d'acqua contaminati dalle tossine. Nelle fioriture tossiche le cellule rilasciano tossine, in questo caso microcistine, a seguito di trattamenti delle acque con solfato di rame. Dopo il rilascio le microcistine resistono nell'ambiente in media fino a tre settimane, e per questo motivo è sconsigliabile l'uso delle acque a fini potabili prima di un mese dalla scomparsa della fioritura (Harada & Tsuji, 1998). La sicurezza della recuperata potabilità può essere raggiunta solo con indagini di laboratorio, poiché non c'è rapporto tra presenza di tossine ed eventuali odori sgradevoli (dati da geosmina o 2-metil-isoborneolo) nelle acque degli invasi. Questi effetti indesiderati del trattamento con solfato di rame non si hanno dopo quello con idrossido di calcio, che presenta limitate controindicazioni anche per la fauna ittica. La rimozione delle tossine d'acqua dolce dagli impianti di trattamento vede come sistema principale, per sicurezza ed efficienza, l'uso dei filtri a carbone attivi, granulati (*Granular Activated Carbon*, GAC) o in polvere (*Powdered Activated Carbon*, PAC) (Donati *et al.*, 1994). I primi sono ad elevatissima attività e di facile uso ma sono costosi e necessitano di manutenzione periodica per evitare la saturazione; un tempo di contatto superiore ad un quarto d'ora è necessario per ottimizzare l'adsorbimento; i secondi, meno cari, devono essere di buona qualità, ossia derivati da legno d'albero o carbon fossile, devono avere alta densità di mesopori con diametro da 2 a 50 nm, e micropori inferiori a 2 nm. L'assorbimento è una funzione dei primi, che in quelle dimensioni garantiscono la migliore resa anche in presenza di notevole particolato organico. In caso di elevate quantità di tossine la mole di carboni in polvere occorrente può essere eccessiva per i sistemi di trattamento.

Oltre ai carboni attivi, altri metodi attivi nell'eliminazione di microcistine comprendono l'uso di ipoclorito di calcio, permanganato di potassio (1 mg/L elimina 200 µg/L di microcistina -LR in 30 minuti) e cloro acquoso (1 mg/L elimina il 95% delle tossine entro 30 minuti, avendo cura che dopo il trattamento il cloro residuo sia almeno 0,5 mg/L). L'efficienza di questo metodo è strettamente dipendente dal pH, che deve essere inferiore a 8. Infine anche l'ozonizzazione risulta efficace (una dose di 0,1 mg/L elimina tutte le tossine in pochi secondi).

Le monocloramine, il perossido di idrogeno e la nanofiltrazione sono totalmente inefficaci nell'eliminazione delle tossine.

Nella formulazione delle linee guida WHO per le acque potabili durante il convegno europeo di Bad Elster del 23-25 aprile 1997 venne avanzato un valore guida provvisorio per la microcistina -LR di 1 µg/L per la tossicità acuta, e 0,3 µg/L per la tossicità cronica con promozione tumorale e potenziamento carcinogenico. Secondo la produzione tossica per cellula riscontrata mediamente, 0,3 µg/L corrispondono più o meno a 1.785.000 cellule /L.

In Italia i valori soglia attuali in tema di microcistine, sanciti dalla circolare Ministero della Sanità del 31 luglio 1998 fissano il limite di ingestione a 0,84 µg/L (5.000.000 cell/L),

raccomandando per la balneazione l'interdizione delle acque a 5 milioni di cellule/L per le acque dolci e più di 10 milioni di cellule/L per il mare, la vigilanza su eventuali casi di dermatiti o malesseri e accertamento della tossicità tra centomila e 5 milioni di cellule/L nel primo caso e tra un milione e dieci milioni di cellule /L nel secondo con accertamento della tossicità tra centomila e un milione di cellule/L; sotto le centomila cellule/L possono svolgersi gli usuali controlli.

L'interdizione delle acque contaminate da fioriture tossiche comprende gli usi potabili, che possono comportare intossicazioni acute e croniche; gli usi ospedalieri, per la presenza di tossine nei prodotti usati per la dialisi; gli usi di balneazione, per le intossicazioni acute e le dermatiti da contatto; l'irrigazione a pioggia, perché le tossine sono dannose anche per le piante, e inoltre le cellule algali lanciate sulle foglie si seccano e possono essere ingerite con le verdure, mantenendo il loro potere tossico per 24-48 ore; la pesca, poiché le specie ittiche, se non hanno la possibilità di allontanarsi dalle zone di fioritura, vengono intossicate a loro volta, e accumulano tossine negli organi interni e nei muscoli, che si autodepurano naturalmente in circa 60 giorni. L'interdizione può coinvolgere anche la caccia qualora le uniche fonti di approvvigionamento d'acqua per gli animali siano corpi d'acqua con fioritura in atto.

Quando si esaminano i possibili interventi di recupero bisogna partire dall'assunto che ogni situazione è peculiare e va studiata singolarmente. Ad esempio l'eutrofizzazione di un grande lago a lento ricambio va gestita diversamente da un lago medio a ricambio veloce.

La riduzione del carico di fosforo presente nelle acque, che è condizionato da apporti superficiali e da accumulo nei sedimenti, ed è soggetto al ricircolo invernale/primaverile, è perseguibile in vari modi: nel caso del lago di Zurigo è stata effettuata l'immissione delle acque di scarico depurate negli strati superficiali, dove il fosforo contenuto viene metabolizzato rapidamente dalle alghe e non fa in tempo ad accumularsi nei sedimenti; nel lago Worth, in Carinzia, è stata realizzata la deviazione degli scarichi e il convogliamento degli stessi in una rete locale extralacustre; in laghi svedesi poco profondi è stata realizzata l'asportazione dell'intero strato superficiale dei sedimenti ricchi di fosforo; l'abbattimento dello zooplancton per favorire l'emergenza di popolamenti a Cloroficee e la filtrazione attraverso carboni attivi e letti di sabbia di tutto l'epilimnio per diminuire la biomassa algale e il fosforo coinvolto nel metabolismo algale.

La riduzione dell'azoto è più complicata a causa della maggiore idrosolubilità e quindi della facilità a pervenire direttamente all'invaso per dilavamento dei terreni permeabili. Recenti sistemi di abbattimento dell'azoto completano il trattamento delle acque reflue in uscita dal depuratore con la "decantazione" in vasche di fitodepurazione dove crescono vegetali con alto potere rimuovente, come ad esempio *Clorella vulgaris* insieme a *Eichornia crassipes*. Fondamentale, nella difficile lotta al dilavamento dei nutrienti dai terreni, è il ripristino ambientale della copertura vegetativa delle rive dei laghi.

Per minimizzare i danni che derivano a fauna e flora bentonica dalla prolungata anossia estiva che caratterizza le acque profonde dei laghi eutrofizzati, si può procedere all'immissione diretta di ossigeno o aria nei sedimenti. Recentemente è stata tentata la diminuzione delle popolazioni ittiche zooplanctofaghe o l'incremento delle specie zooplanctoniche predatrici, nella convinzione che l'aumento di predazione dello zooplancton sul fitoplancton potesse causarne la diminuzione della biomassa, usando un sistema di lotta biologica. L'esperienza ha dimostrato che questa evenienza non è così consequenziale; ad esempio non vale affatto per le fioriture di *Planktothrix rubescens*, che comunque rimane scarsamente appetibile dallo zooplancton. Gli elementi di maggiore competitività delle Cianoficee con le alghe verdi sono costituiti dalla simbiosi con i batteri eterotrofi, dalla maggiore efficienza di utilizzo della CO₂ in ambienti alcalini (al punto che l'immissione di CO₂, azoto e fosforo in laghi a dominanza di Cianoficee fa emergere popolamenti di Cloroficee), dalla possibilità di fissazione dell'azoto

atmosferico (non comune a tutte le specie), e dalla possibilità di regolare il galleggiamento tramite il collasso dei vacuoli di gas endocellulari, determinato dalla intensità della fotosintesi, che riporta le cellule in profondità dove possono utilizzare i nutrienti contenuti nei considerevoli volumi d'acqua dell'ipolimnio, riproponendo le fioriture dopo il rimescolamento primaverile.

I sistemi per favorire i popolamenti verdi (ecologicamente più desiderabili) comprendono il retinaggio delle schiume di fioritura a Cianoficee, le iniezioni nei corpi idrici di CO₂ con o senza aria, la rimozione del fosforo mediante controllo dell'inquinamento da fonti diffuse e il rimescolamento idrico dove possibile e opportuno. Il rimescolamento artificiale implica la rimessa in circolo di CO₂ e nutrienti dagli strati profondi di un lago, ma causa anche l'ingresso di ossigeno e anidride carbonica dall'atmosfera, con abbassamento del pH. In un lago stratificato queste azioni determinano il declino delle popolazioni di Cianoficee e permettono alle alghe verdi, più pesanti, di riaccedere agli strati superficiali e vincere la competizione, diventando dominanti.

CONCLUSIONI

I risultati dello studio di 27 mesi (gennaio 2001- aprile 2003) hanno evidenziato la presenza di due popolazioni stabili dell'alga Cianoficea tossica *Planktothrix rubescens* nei laghi di Albano e Nemi. I modi in cui la stessa specie abbia potuto raggiungere due laghi contigui possono essere desunti dalla letteratura: le Cianoficee sono note per produrre spesso delle spore di resistenza, che in molti casi possono essere trasportate e disperse dal vento (Bold & Wynne, 1985). Oltre a questa via, importantissima è la dispersione operata dagli uccelli lungo le rotte migratorie: in caso di fioritura superficiale le alghe rimangono prese sulle zampe e le piume ventrali, da dove in un tempo ragionevole possono essere trasferite ancora vitali in altri specchi d'acqua. Una terza possibilità è stata verificata in Italia centro-settentrionale, dove un complesso di cinque laghi artificiali è stato colonizzato da propaguli di *Planktothrix rubescens* trasportati da vene sotterranee di acque minerali, in contatto remoto con altri invasi contaminati.

Indipendentemente dal modo in cui la specie ha raggiunto i laghi, la persistenza e la stabilità della dinamica stagionale che la caratterizzano sono causate dall'elevato rapporto azoto/fosforo, pari a 10 come media annuale se si considerano solo i nitrati, e nettamente superiore nel semestre autunnale-invernale che presiede all'instaurarsi delle fioriture. Questo particolare rapporto di nutrienti è il più congeniale alla dominanza della specie *P. rubescens*, come è emerso in tutti i laghi italiani interessati dalle sue fioriture (Bruno, 2002). La preponderanza di sali d'azoto rispetto al fosforo nei due laghi può essere ricondotta alla parziale deviazione nel corso degli anni degli scarichi fognari incidenti sui due invasi senza una parallela denitrificazione dei terreni agricoli circostanti, che restituiscono alla falda idrica o direttamente al corpo lacustre, per percolazione o dilavamento, il nutriente primario.

Sicura concausa al raggiungimento di questo rapporto inoltre è stata la concentrazione di nutrienti operata nei laghi a seguito dell'abbassamento della falda acquifera e del loro stesso livello.

In queste condizioni, e finché non muterà il rapporto azoto/fosforo, le fioriture di *P. rubescens* si riproporranno annualmente con forza alterna, a seconda dei livelli di rapporto raggiunti, ma sempre in grado di causare l'interdizione delle acque agli usi umani con notevoli danni al turismo, alle attività sportive, e all'ambiente lacustre nella sua interezza. La ricorrenza invernale-primaverile delle fioriture, dovuta alla specifica richiesta di basse temperature dell'organismo, non garantisce dal rischio che altre specie di Cianoficee a dominanza estiva, come ad esempio *Aphanizomenon ovalisporum*, presente nel lago di Albano e in passato capace di spettacolari fioriture, possano prendere il sopravvento in presenza di rapporti azoto/fosforo più bassi.

Le ipotesi di recupero dei due laghi dalla pesante compromissione trofica che li caratterizza, unica strada per impedire la dominanza e le fioriture di *P. rubescens* o di altre Cianoficee tossiche, devono essere necessariamente adeguate alle caratteristiche degli invasi, con cuvette vulcaniche prive di immissari o emissari, molto profonde nel caso di Albano, collocate in aree ricche di testimonianze storiche e archeologiche nel caso di Nemi.

Queste condizioni portano ad escludere primariamente interventi a breve termine non risolutivi, e nello stesso tempo obbliganti alla ripetitività.

L'inattivazione e asportazione dei sedimenti, per eliminare il rilascio di fosforo, ad esempio, non è praticabile per il lago Albano, troppo grande e profondo, ma nemmeno per il lago di Nemi, dato che questi metodi sono stati applicati con successo solo su laghi svedesi di contenuta superficie (1 km²) e di irrisoria profondità (1,2 m). Lo stesso può dirsi della tecnica di precipitazione del fosforo mediante sali di ferro e alluminio, che, a parte i costi dei materiali e la

ripetizione dei trattamenti, ha dato buoni risultati solo per coperture totali dei sedimenti, e su laghi europei e americani con profondità contenuta e superficie al di sotto di 0,5 km². La rimozione meccanica della biomassa nei periodi di massima fioritura, utilizzata anche come mezzo per rimuovere i nutrienti dal sistema lacustre, non è praticabile con le fioriture di *Planktothrix rubescens*, perché l'alga, pur capace di elevate concentrazioni superficiali, grazie al contenuto di vacuoli gassosi regola rapidamente la galleggiabilità e tende a disperdersi immediatamente al di sotto della superficie al minimo accenno di condizioni non confacenti, come ad es. un leggero movimento ondoso, per tornare in superficie poche ore dopo, o la mattina successiva. Anche questo metodo è comunque di costo elevato, e impraticabile su laghi di dimensioni medio-grandi, o soggetti a sfruttamento ittico, come Nemi, data la privazione di nutrimento per i pesci adulti vegetariani e per gli avannotti. La tendenza all'abbassamento di livello che distingue i due laghi esclude il ricorso alle emunzioni selettive di acque ipolimniche, troppo estese in ambedue i laghi, e che non verrebbero reintegrate dalla diminuita piovosità invernale. L'areazione od ossigenazione ipolimnica nel caso di Albano non è praticabile data l'elevata profondità del lago e il suo enorme ipolimnio, e nel caso del lago di Nemi si concreterebbe in un intervento quotidiano per l'arco di cinque-sei mesi, da ripetere annualmente. L'ossigenazione dell'ipolimnio, intervento non risolutivo e piuttosto costoso, non garantirebbe lo spostamento del rapporto azoto-fosforo che favorisce *P. rubescens*. Laghi delle Marche con buona ossigenazione naturale bentonica, infatti, sono interessati da fioriture di *P. rubescens* imponenti, che durano fino a sette mesi.

Gli interventi di risanamento, come già detto, devono adeguarsi alle caratteristiche peculiari degli invasi. In questo senso l'ossigenazione delle acque, costosa e da reiterare, può essere sostituita da un intervento di ripristino del livello originale degli incili, circa tre metri e mezzo al di sopra dell'attuale, utilizzando acque reflue debitamente depurate. La depurazione dovrebbe abbattere i livelli di nutrienti primari nelle acque fino a 600 µg/L di azoto totale, e a 11 µg/L di fosforo totale, secondo la tabella dell'OECD (1985). L'acqua verrebbe oligotrofizzata mediante un trattamento terziario basato su biomasse batteriche ambientali e su loro enzimi di degradazione dei sali di azoto e fosforo. Questo tipo di trattamenti sostituisce frequentemente la fitodepurazione, bisognosa di ampi spazi non sempre disponibili. L'immissione nel lago di acqua oligotrofica, oltre a provvedere una ossigenazione per rimescolamento, darebbe modo di cambiare il rapporto azoto/fosforo, spostando l'equilibrio del lago verso la mesotrofia.

Il volume da ripristinare nel lago di Nemi, pari a 6.300.000 metri cubi d'acqua, potrebbe essere ricostituito in 3,4 anni facendo confluire nel lago un volume di 5.000 metri cubi al giorno.

L'acqua potrebbe essere reperita utilizzando il vicino depuratore di Genzano, previo ammodernamento e rafforzamento con un trattamento terziario per abbattere i nutrienti, o da un depuratore moderno costruito nel territorio di Ariccia all'altro estremo dell'emissario romano di Nemi, che verrebbe utilizzato per riconvogliare le acque al lago senza ulteriori opere di rete nel comprensorio protetto del bosco del Parco.

Il lago di Albano ha un volume circa 16 volte maggiore di quello del lago di Nemi, e il volume da ripristinare sarebbe pari a 21 milioni di metri cubi. Per quest'ordine di grandezza, un ripristino di 5.000 metri cubi al giorno riporterebbe il livello all'incile in 11 anni. Raddoppiando però l'entrata, il tempo verrebbe dimezzato a cinque anni. In questo caso l'acqua potrebbe essere reperita riutilizzando il prodotto del depuratore di Santa Maria delle Mole, previo il solito trattamento terziario per l'abbattimento dei nutrienti.

Queste ipotesi di recupero, anche se in linea con la tendenza al riutilizzo delle acque reflue, nel quadro della strategia di lotta alla siccità da effetto serra, non sono da considerare come le soluzioni definitive all'inquinamento dei laghi dei Castelli. Esse permettono di gestire e

controbilanciare l'abbassamento di livello, ma non possono prescindere dal provvedimento a lungo termine contro l'abbassamento della falda idrica.

Dato il ruolo di rilievo che giocano le fonti di inquinamento diffuso rispetto all'inquinamento puntiforme, la depurazione delle acque nere anche se necessaria non sarebbe in grado, da sola, di agire in modo decisivo sul livello di eutrofizzazione della falda, e sulla sua progressiva dissoluzione ad opera degli eccessi di prelievo.

Il reperimento di nuove fonti di approvvigionamento idrico, che permettano la diversione dei prelievi dai bacini idrici dei laghi, identificabili con il complesso dell'intera falda dei Colli Albani, è il grande, primario intervento a lungo termine da perseguire, insieme alla riduzione dell'inquinamento da nitrati proveniente dagli usi agricoli, e al riutilizzo delle acque di scarico depurate e oligotrofizzate quanto più possibile.

BIBLIOGRAFIA

- Bazzanti M, Loret E. Macrobenthic community structure in a polluted lake: lake Nemi (central Italy). *Boll Zool* 1982; 49:79-91.
- Bazzanti M, Seminara M. Profundal macrobenthos structure as a measure of long-term environmental stress in a polluted lake. *Water, Air and Soil Pollution* 1987;33:435-42.
- Bold MC, Wynne MJ. *Introduction to the algae*. 2^a ed. Prentice Hall: Englewood Cliffs; 1985.
- Botrè C, Ielmini M, Sanna M, Bielli G. Contributo alla conoscenza dello stato di inquinamento dei laghi della provincia di Roma: Albano, Bracciano e Nemi. *Rassegna Chimica* 1975;2:76-92.
- Bourdier et al. Amino acids incorporation by a natural population of *Oscillatoria rubescens*. A microautoradiographic study. *FEMS Microbiol Ecol* 1989;62:185-90.
- Bruno M, Melchiorre S, Viaggio E. *Le fioriture di alghe tossiche nelle acque dolci: emergenza sanitaria e misure di controllo*. Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2002. (Rapporti ISTISAN 02/9).
- Canicci G. Su una eccezionale fioritura del lago di Albano. *Boll Pesca Idrobiol* 1953;8:221-33.
- Chondrogianni C, Ariztegui D, Guilizzoni P, Lami A. Lakes Albano and Nemi (central Italy): an overview. *Mem Ist Ital Idrobiol* 1996;55:17-22.
- Codd GA, Ward CJ, Bell CJ. Cyanobacterial toxins: occurrence, modes of action, health effects and exposure routes. *Archives of Toxicology* 1997;Suppl.19:399-410.
- Currie DJ, Kalff J. A comparison of the abilities of freshwater algae and bacteria to acquire and retain phosphorus. *Limnol Oceanogr* 1984;29:298-310.
- Deacon J, Walsby AE. Gas vesicle formation in the dark, and in light of different irradiances, by the cyanobacterium *Microcystis* sp. *Br Phycol J* 1990; 25:133-9.
- Donati C, Drikas M, Hayes R, Newcombe G. Microcystin-LR adsorption by powered activated carbon. *Water Research* 1994;28(2):1735-42.
- Duncan JG, Kauffman KW, Hall RA, Huang X, Chu FS. Assessing potential health risk from Microcystin toxins in Blue-green algae dietary supplements. *Environ Health Perspectives* 2000;108(5):435-9.
- Edmondson WT. *The uses of ecology, Lake Washington and beyond*. Seattle: University of Washington Press; 1991.
- Falconer IA. Potential impact on human health of toxic cyanobacteria. *Phycologia* 1996;35(6 Supplement): 6-11.
- Falconer IR, Burch MD, Steffensen DA, Choice M, Coverdale OR. Toxicity of the blue-green alga (Cyanobacterium) *Microcystis aeruginosa* in drinking water. *Environmental toxicology and Water quality* 1994; 9:131-9.
- Feuillade J, Davies A. Studies on Lake Nantua. Seasonal variations and long-term trends in phytoplankton pigments. *Arch. Hydrobiol. Beih. Ergebn. Limnol* 1994;41:95-111.
- Feuillade J, Feuillade M. Le métabolisme photosynthétique d'*Oscillatoria rubescens* D.C.(Cyanoficee). I- Carboxylations initiales. *Arch Hydrobiol* 1981;90:410-26.
- Feuillade J, et al. Alkaline phosphatase activities fluctuations and associated factors, in an eutrophic lake dominated by *Oscillatoria rubescens*. In: Bonin & Golterman- *Hydrobiologia* 1990;207:233-40.
- Feuillade J, et al. Amino acids uptake by a natural population of *Oscillatoria rubescens* in relation to uptake by bacterioplankton. *Arch Hydrobiol* 1988;113:345-58.
- Feuillade J. Croissance d'*Oscillatoria rubescens* et variations quantitatives de la chlorophylle et des différents caroténoïdes en fonction de l'éclairage. *Ann Hydrobiol* 1972;3:21-31.

- Fischer WJ, Dietrich DR. Pathological and biochemical characterization of Microcystin-induced hepatopancreas and kidney damage in carp (*Cyprinus carpio*). *Toxicology and Applied Pharmacology* 2000;164:73-81.
- Fischer WJ, Hitzfeld BC, Tencalla F, Eriksson JE, Mikhailov A, Dietrich DR. Microcystin-LR toxicodynamics, induced pathology, and immunohistochemical localization in livers of Blue-green algae exposed Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Toxicological Sciences* 2000;54:365-73.
- Fitzgeorge RB, Clark SA, Keevil CW. Routes of intoxication. In: Codd GA, Jefferies TM, Keevil CW, Rosser E. *Detection methods for Cyanobacterial toxins*. Cambridge, UK: The Royal Society of Chemistry; 1997. p. 69-77.
- Ford SL, Abayaasekara DRE, Persaud SJ, Jones PM. Role of phosphoprotein phosphatases in the corpus luteum: identification and characterization of serine/threonine phosphoprotein phosphatases in isolated rat luteal cells. *J Endocrinol* 1996;150:205-11.
- Freitas De Magalhaes V, Moraes Soares R, Azevedo SMFO. Microcystin contamination in fish from the Jacarepagua Lagoon (Rio de Janeiro, Brazil): ecological implication and human health risk. *Toxicon* 2001; 39:1077-85.
- Gaete V, Canelo E, Lagos N, Zambrano F. Inhibitory effects of *Microcystis aeruginosa* toxins on ion pumps on the gill of freshwater fish. *Toxicon* 1994;32:121-7.
- Garnier. Influence de la temperature sur l'accumulation, le renouvellement et l'efficacité photosintétique des pigments d' *Oscillatoria subbrevis* Schmidle (Cianophyceae). *Physiol. Veg.* 1974;2:273-318.
- Gorham PR, Carmichael WW. Hazards of freshwater blue-green algae (cyanobacteria). In: Lembi CA, Waaland JR (Ed.). *Algae and human affairs*. Cambridge: Cambridge University Press; 1988. p. 403-33.
- Harada & Tsuji. Persistence and decomposition of Hepatotoxic microcystins produced by Cyanobacteria in natural environment. *J Toxicol Toxin Rev* 1998;17(3): 385-403.
- van den Hoek C, Mann DG, Jahns HM. *Algae. An introduction to phycology*. Cambridge: Cambridge University Press; 1995.
- International Code of Botanical Nomenclature*. Utrecht: International Association for plant Taxonomy; 1972.
- International Code of Nomenclature of Bacteria*. Washington, DC: American Society for Microbiology; 1975.
- Konopka A. (a) Physiological ecology of a metalimnic *Oscillatoria rubescens* population. *Limnol Oceanogr* 1982; 27:1154-61;
- Konopka A. (b) Buoyancy regulation and vertical migration by *Oscillatoria rubescens* in Crooked Lake, Indiana. *Br Phytol J* 1982;17: 427-42.
- Kotak BG, Kenefick SL, Fritz DL, Rousseaux CG, Prepas EE, Hrudey SE. Occurrence and toxicological evaluation of cyanobacterial toxins in Alberta lakes and farm dugouts. *Water Research* 1993;27:495-506.
- Kurmayer R, Juttner F. Strategies for the co-existence of zooplankton with the toxic cyanobacterium *Planktothrix rubescens* in Lake Zurich. *J. of Plankton Research* 1999;21(4):659-83.
- Lakshmana PV, Bhattacharya R, Parida MM, Jana AM, Bakshar ASB. Freshwater cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* (UTEX 2385) induced DNA damage *in vivo* and *in vitro*. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 1998;5:1-6.
- Lankoff A, Kolataj A. Influence of microcystin-YR and nodularin on the activity of some proteolytic enzymes in mouse liver. *Toxicon* 2001;39(2001):419-23.
- Marchesoni V. Il fitoplancton del Lago di Nemi prima e dopo l'abbassamento del suo livello (1923-1939). *Intern Rev Hydrobiol* 40:305-44.

- Margaritora FG, Stella E, Ferrara O. Struttura e dinamica dello zooplancton di un lago vulcanico dell'Italia centrale (lago Albano, Lazio). *Riv Idrobiol* 1988;27:129-47.
- Mc Dermott CM, Nho CW, Howard W, Holton B. The cyanobacterial toxin, microcystin-LR, can induce apoptosis in a variety of cell types. *Toxicon* 1998;36(12):1981-96.
- Meriluoto JAO, Eriksson JE. Rapid analysis of peptide toxins in cyanobacteria. *J of Chromatography* 1988;438:93-8.
- Nishiwaki-Matsushima R, Tetsuya O, Nishiwaki S, Suganuma M, Kohyama K, Ishikawa T, Carmichael WW, Fujiki H. Liver tumor promotion by the cyanobacterial cyclic peptide toxin microcystin-LR. *J Cancer Res. Clin. Oncol.* 1992;118:420-4.
- Odum E. *Basi di ecologia*. Padova: Ed. Piccin. 1988.
- Oshima Y, Minami H, Takano Y, Yasumoto T. Ichtyotoxins in a freshwater dinoflagellate *Peridinium polonicum*. In: Okaichi T, Anderson D, Nemoto O. Red Tides: biology, environmental science and toxicology. *Elsevier Science Publishing* 1989; 375-8.
- Ottaviani M, Bonadonna L (Ed.). *Metodi analitici per le acque destinate al consumo umano. Vol. 2. Parte 2. Metodi microbiologici*. Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2000. (Rapporti ISTISAN 00/14 Pt.2).
- Ottaviani M, Bonadonna L (Ed.). *Metodi di analisi per le acque destinate al consumo umano*. Roma: Istituto Superiore di Sanità; 1997. (Rapporti ISTISAN 97/8).
- Penaloza R, Rojas M, Vila I, Zambrano F. Toxicity of a soluble peptide from *Microcystis* sp. To zooplankton and fish. *Freshwater Biol* 1990;24:233-40.
- Pietsch C, Wlengand C, Ame MV, Nicklish A, Wunderlin D, Pflugmacher S. The effects of Cyanobacterial crude extract on different aquatic organism: evidence for Cyanobacterial toxin modulating factors. *Environmental Toxicology* 2001;16:535-42.
- Pilotto LS, Douglas RM, Burch MD, Cameron S, Beers M, Rouch GJ, Robinson P, Kirk M, Cowie CT, Hardiman S, Moore C, Attewell RG. Health effects of exposure to cyanobacteria (blue-green algae) during recreational water-related activities. *Australian New Zealand J Public Health* 1997;21(6):562-6.
- Reynolds P. Cyanobacterial waterblooms. In: Callow ME (Ed.). *Advances in botanical research*. London: Academic Press; 1987. p. 67-143.
- Ripka *et al.* Generic assignments, strains Histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. *J Gen Microbiol* 1979;3:1-61.
- Romanowska-Duda Z, Mankiewicz J, Tarczynska M, Walter Z, Zalewski M. The effects of toxic Cyanobacteria (Blue-green algae) on water plants and animal cells. *Polish J Environ Studies* 2002; 11(5):561-6.
- Skulberg & Skulberg. Planktic species of *Oscillatoria* (Cyanophyceae) from Norway. Characterization and classification. *Algol Stud* 1985;38/39:157-74.
- Skulberg OM, Carmichael WW, Codd GA, Skulberg R. Taxonomy of toxic Cyanophyceae (Cyanobacteria). In: Falconer IR (Ed.). *Algal toxins in seafood and drinking water*. London: Academic Press; 1993. p. 130-45.
- Stainer RY. The position of cyanobacteria in the world or phototrophs. *Carlsb Res Commun* 1977;42:77-98.
- Stella E, Ferrero I, Margaritora FG. Alterations of the plankton in a much polluted lake in central Italy (Latium), the volcanic lake Nemi.- *Verh. Internat. Verein. Limnol.* 1978;20:1049-54.
- Stella E. Il Lago di Albano; la fisiografia e le società pelagiche. *Bollollettino di Pesca, Piscicoltura e Idrobiologia* 1950;4.
- Ueno Y, Satoshi Nagata, Tomoaki Tsutsumi, Akihiro Hasegawa, Mariyo Watanabe, Ho-Dong Park, Gong-Chao Chen, Gang Chen, Shun-Zhang Yu. Detection of microcystins, a blue-green algal

- hepatotoxin, in drinking water sampled in Haimen and Fusui, endemic areas of primary liver cancer in China, by highly sensitive immunoassay. *Carcinogenesis* 1996;17(6):1317-21.
- Utkilen H, *et al.* Buoyancy regulation in a red *Oscillatoria* unable to collapse gas vacuoles by turgor pressure. *Arch Hydrobiol* 1985;102:319-29.
- Valutazione della situazione ambientale del lago di Nemi.* Roma: Provincia di Roma e Università degli Studi di Roma "La Sapienza"; 1987.
- van Liere, *et al.* Growth of *Oscillatoria agardhii* Gom. *Hydrobiol Bull* 1975;9:62-70.
- Vasconcelos V, Amorim A. Dynamics of microcystins in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Toxicon* 1999;37: 1041-1052.
- Volterra L, D'ancona U. Osservazioni preliminari sulle modificazioni idrobiologiche avvenute nel lago di Nemi durante e in seguito ai lavori di abbassamento eseguiti per il ricupero delle navi romane. *R. Accademia Lincei* 1931;Serie 6°, vol 13.
- Walsby AE. The permeability of blue-green algal gas-vacuole membranes to gas. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 1969;178:301-26.
- Watanabe MF, Park HD, Kondo F, Harada KI, Hayashi H, Okino T. Identification and estimation of microcystins in freshwater mussels. *Natural Toxins* 1997;5:31-5.
- Yu SZ. Drinking water and primary liver cancer. In: Tang ZY, Wu MC, Xia SS (Ed.). *Primary liver cancer.* Berlin, Heidelberg, New York: Springer, China Academic Publishers; 1989. p. 30-7.
- Yu SZ. Primary prevention of hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol Hepatol* 1995;10:674-82.
- Zakaria A Mohamed. Accumulation of Cyanobacterial Hepatotoxins by *Daphnia* in some Egyptian irrigation canals. *Ecotoxicology Environ Safety* 1999;50:4-8.

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

*Stampato da Ditta Grafiche Chicca & C. snc
Via di Villa Braschi 143, 00019 Tivoli (Roma)*

Roma, dicembre 2004 (n. 4) 12° Suppl.