



RAPPORTI ISTISAN 20|25_{Rev}

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

Cianobatteri: linee guida per la gestione della contaminazione da biotossine in popolazioni ittiche di interesse alimentare

M. Bruno, V. Messineo, R. De Pace, P. Gallo



AMBIENTE
E SALUTE

ISTITUTO SUPERIORE DI SANITÀ

**Cianobatteri: linee guida
per la gestione della contaminazione da biotossine
in popolazioni ittiche di interesse alimentare**

Milena Bruno (a), Valentina Messineo (a),
Rita De Pace (b), Pasquale Gallo (c)

(a) Servizio Grandi Strumentazioni e Core Facilities, Istituto Superiore di Sanità, Roma
(b) Istituto Zooprofilattico Sperimentale Puglia e Basilicata, Foggia
(c) Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Mezzogiorno, Napoli

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

Rapporti ISTISAN
20/25 Rev.

Istituto Superiore di Sanità

Cianobatteri: linee guida per la gestione della contaminazione da biotossine in popolazioni ittiche di interesse alimentare.

Milena Bruno, Valentina Messineo, Rita De Pace, Pasquale Gallo

2020, 61 p. Rapporti ISTISAN 20/25 Rev.

La produzione di pesce d'acqua dolce in Italia è stata stimata in 32000 tonnellate/anno (7% della produzione totale nel 2005). Anche in Italia studi su diversi laghi affetti da fioriture cianobatteriche hanno documentato fenomeni di accumulo delle tossine prodotte nella fauna ittica. Questi eventi naturali, attraverso gli emissari, possono addirittura arrivare a interessare le coste marine fiancheggiando le foci. Le cianotossine più diffuse (microcistine, cilindrospermopsine, β -N-metilammino-L-alanina) richiedono una ricerca specifica nei tessuti con metodi immunologici e strumentali; vengono presentati i principali metodi utilizzati, singoli o in associazione, per la rilevazione. La maggior parte degli scenari di esposizione al rischio da cianotossine non tiene conto dell'esposizione potenziale attraverso il consumo di pesce; a seguito di questo non sono state ancora stabilite linee guida per le concentrazioni di tossine nei tessuti di pesci. Molti studi mostrano che i limiti generali proposti dall'Organizzazione Mondiale della Sanità potrebbero non essere adeguati a proteggere da tutti i possibili livelli di rischio; vengono riportati i metodi di elaborazione dei limiti soglia per i rischi acuto, cronico e cancerogeno.

Parole chiave: Cianobatteri; Cianotossine; Bioaccumulo; Fauna ittica; Limiti di consumo; Rischio acuto; Rischio cronico; Rischio cancerogeno

Istituto Superiore di Sanità

Cyanobacteria: guidelines for the management of biotoxins contamination in fish populations of food interest.

Milena Bruno, Valentina Messineo, Rita De Pace, Pasquale Gallo

2020, 61 p. Rapporti ISTISAN 20/25 Rev. (in Italian)

Freshwater fish production in Italy has been estimated at 32,000 tonnes/year (7% of total production in 2005). Also, in Italy studies on different lakes affected by cyanobacterial blooms have documented phenomena of accumulation of toxins produced in fish fauna. These natural events, through the emissaries, can even reach the sea coasts flanking the mouths. The most common cyanotoxins (microcystins, cylindrospermopsins, β -N-metilammino-L-alanina) require specific tissue research using immunological and instrumental methods; here are presented the main methods used, single or in combination, for the detection. Most cyanotoxin risk exposure scenarios do not take into account potential exposure through fish consumption. As a result, guidelines for toxin concentrations in fish tissues have not yet been established. Many studies show that the general limits proposed by the World Health Organization may not be adequate to protect against all possible levels of risk; methods of drawing up threshold limits for acute, chronic and carcinogenic risks are here reported.

Key words: Cyanobacteria; Cyanotoxins; Bioaccumulation; Fish fauna; Consumption limits; Acute risk; Chronic risk; Carcinogenic risk

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

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

Citare questo documento come segue:

Bruno M, Messineo V, De Pace R, Gallo P. *Cianobatteri: linee guida per la gestione della contaminazione da biotossine in popolazioni ittiche di interesse alimentare*. Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2020. (Rapporti ISTISAN 20/25 Rev.).

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

Registro della Stampa - Tribunale di Roma n. 114 (cartaceo) e n. 115 (online) del 16 maggio 2014

Direttore responsabile della serie: *Paola De Castro*

Redazione: *Sandra Salinetti e Manuela Zazzara*

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



INDICE

1. Panoramica generale	1
1.1. Microcistine	3
1.2. Anatossine.....	5
1.3. BMAA	6
1.4. Cilindrospermopsine	10
1.5. Tossine secondarie	11
1.6. Presenza di microcistine nei pesci.....	16
1.7. Cianotossine nei mitili	17
2. Metodi di analisi	19
2.1. Estrazione clorofilla a da acqua	19
2.2. Sedimentazione e conta delle cellule	19
2.3. Estrazione tossine da acqua.....	20
2.4. Estrazione di microcistine da tessuti ittici.....	20
2.5. Estrazione di cilindrospermopsine da tessuti ittici	20
2.6. Estrazione di BMAA da tessuti ittici	21
2.7. Analisi con anticorpi monoclonali	21
2.7.1. Analisi di microcistine	21
2.7.2. Analisi di cilindrospermopsine	21
2.7.3. Analisi di BMAA.....	22
2.8. Analisi chimica strumentale di microcistine	22
2.8.1. Analisi in triplo quadrupolo LC-MS/MS	23
2.8.2. Analisi Ion Trap LC/ESI-MS/MS	24
2.8.3. Analisi MALDI-ToF/MS	24
2.8.4. Analisi LC/ESI-Q-TOF/MS-MS.....	25
2.9. Analisi chimica strumentale di cilindrospermopsine	25
2.9.1. Analisi in triplo quadrupolo LC-MS/MS	25
3. Frequenza di contaminazione in Italia	26
3.1. Vie di contaminazione della fauna ittica	26
3.2. Diffusione delle contaminazioni ittiche in acqua dolce	26
3.3. Cianotossine nei mitili in Italia	34
3.4. Persistenza delle microcistine nei metodi di cottura	35
4. Metodi di valutazione del rischio	37
4.1. Sviluppo e utilizzo dei limiti di consumo basati sul rischio.....	37
4.2. Limiti di consumo per effetti cancerogeni e cronici.....	43
Bibliografia	45

1. PANORAMICA GENERALE

Quando l'ingresso antropogenico di nutrienti nei sistemi d'acqua dolce inizia ad alterare la biomassa totale e la composizione delle comunità algali, emerge una serie di problemi ecologici e sanitari. Globalmente, la dominanza dei cianobatteri nel fitoplancton d'acqua dolce sta crescendo, come il verificarsi di fioriture tossiche e ci si aspetta che il riscaldamento climatico peggiori la frequenza e la durata di questo tipo di fioriture. Le fioriture tossiche d'acqua dolce (*Harmful Algal Blooms*, HAB) sono generalmente causate da cianobatteri.

I cianobatteri, conosciuti anche come alghe verdi-azzurre, sono procarioti fotosintetici di antica origine. Essi esistono da almeno 2,7 miliardi di anni, sono considerati i maggiori produttori primari di materia organica e sono stati i primi organismi ad aver rilasciato ossigeno nell'atmosfera primitiva (Badger & Price, 2003). Una caratteristica interessante dei cianobatteri è la loro ampia distribuzione geografica, che riflette la variazione genotipica e fenotipica del gruppo (Soares, 2009). Si possono trovare in ambienti lacustri e marini, ma molte specie sono in grado di vivere in habitat terrestri, dove sono importanti nell'ecosistema e nel ciclo dei nutrienti. Altre specie sono in grado di prosperare sotto stress ambientale, come gli ambienti estremi dell'Antartide o delle sorgenti termali, o addirittura sopravvivere per lunghi periodi nella completa oscurità (Chorus & Bartram, 1999; Kehr *et al.*, 2011). Le barriere coralline, specialmente quelle degradate, sono un esempio del tipo di habitat dove i cianobatteri sono sempre più dominanti, a causa della loro capacità di tollerare determinati ambienti e condizioni associate agli impatti antropici e ai cambiamenti climatici (Paul, 2008).

Questo gruppo di organismi riesce a tollerare enormi cambiamenti nella salinità e nella temperatura, la capacità di sopravvivere anche a bassa intensità luminosa offre loro un vantaggio competitivo estremamente elevato in questi ambienti (Chorus & Bartram, 1999).

I cianobatteri possono moltiplicarsi rapidamente nelle acque superficiali e formare fioriture quando prevalgono condizioni favorevoli, quali temperatura elevata, luce intensa, pH elevato e aumento della disponibilità di nutrienti, in particolare fosforo e azoto, rilasciati artificialmente da attività antropogeniche (Dantas *et al.*, 2011). Occasioni di fioriture cianobatteriche sono state sempre più spesso rilevate nei laghi e nei bacini idrici di tutto il mondo (Falconer & Humpage, 2005) a causa dell'eutrofizzazione antropogenica, della modifica del bacino e dei cambiamenti climatici (Paerl & Huismann, 2008; Conley *et al.*, 2009).

Poiché i cianobatteri tossici non sono in grado di colonizzare e riprodursi negli ospiti umani o animali per causare malattie, non sono elencati tra i patogeni presenti nell'acqua nel settore idrico, portando a una possibile sottovalutazione del rischio per la salute. Il 75% dei campioni d'acqua monitorati e contaminati da cianobatteri contiene anche metaboliti tossici (Sivonen & Jones, 1999) che sono una causa riconosciuta di avvelenamento del bestiame e umano (Falconer, 2005; Bowling, 1992; Steyn, 1945; Jochimsen *et al.*, 1998; Carmichael *et al.*, 2001; Behm, 2003). In alcuni paesi (es. Sudafrica) i cianobatteri tossici rappresentano un rischio ambientale crescente e grave per il bestiame e gli animali selvatici, mentre il rischio umano potrebbe derivare dall'esposizione cronica attraverso l'approvvigionamento idrico contaminato (Oberholster *et al.*, 2005). Essi sono capaci di produrre un'ampia varietà di metaboliti tossici secondari, le cianotossine, eterogenee in struttura, attività e stabilità i cui effetti negativi sono stati osservati da oltre un secolo. Questi metaboliti possono essere rilasciati in acqua direttamente o a seguito di lisi cellulare con implicazioni importanti per le specie acquatiche direttamente interessate, e per la salute umana e del bestiame. Studi hanno riferito che anche i cambiamenti climatici globali possono favorire specie cianobatteriche pericolose, aumentando i loro tassi di crescita, dominanza, persistenza, distribuzione geografica e attività (Paerl *et al.*, 2009; Bláha *et al.*, 2009). Gli impatti sugli esseri umani

comprendono interruzione dei servizi municipali di fornitura d'acqua, chiusura di siti ricreativi e malattie. Gli organismi che vivono in un ambiente affetto da presenze massive di cianobatteri tossici sono immersi in acqua contenente cellule tossiche e/o tossine dissolte. Essi non sono minacciati solo dall'ingestione dei cianobatteri e delle loro tossine: le cellule tossiche e l'acqua contaminata fluiscono attraverso le loro branchie mentre loro si nutrono, si riproducono e si sviluppano in quell'acqua (Rodger *et al.*, 1994; Zimba *et al.*, 2001; Xie *et al.*, 2005).

Molti cianobatteri si trovano sotto forma di colonie o filamenti che possono esercitare un effetto meccanico di influenza sul processo di filtrazione degli individui zooplanctonici (Ferrão-Filho *et al.*, 2009). Perciò gli organismi acquatici possono essere profondamente influenzati nelle loro dinamiche di popolazione dalle tossine cianobatteriche, rispetto agli animali terrestri. Presenze massive di cianobatteri tossici sono state associate a morie ittiche gravissime (Rodger *et al.*, 1994; Jewel *et al.*, 2003; Toranzo *et al.*, 1990). Inoltre, sono state dimostrate chiare differenze nella sensibilità delle specie ittiche ai cianobatteri tossici (sia sospensioni cellulari che materiali di fioritura) e anche alle microcistine (Malbrouck & Kestermont, 2006).

Ricerche passate hanno dimostrato che le cianotossine si concentrano attraverso le reti trofiche (Karjalainen *et al.*, 2005; Smith & Haney, 2006; El Ghazali *et al.*, 2010; Lance *et al.*, 2014): la loro biomagnificazione dipende dal tipo e dalle caratteristiche chimiche delle specifiche tossine. È stato riportato il bioaccumulo di cianotossine in animali acquatici come pesci, molluschi e zooplancton (Amorin & Vasconcelos, 1999), il che indica che il consumo orale di tessuti animali contenenti cianotossine è possibile e può condurre a tossicità per gli uomini.

Il consumo di pesci da acque affette da fioriture cianobatteriche è una importante via di esposizione umana alle cianotossine: circa il 40% della produzione mondiale di pesce viene dalle acque dolci (Linch *et al.*, 2016) e cianotossine sono state rilevate in pesce d'acqua dolce in tutto il mondo (Lee *et al.*, 2017).

Anche metodi diversi di quantificazione delle cianotossine possono causare variabilità nella loro determinazione lungo il pattern naturale di distribuzione, dando luogo artificialmente a sovrastime o sottostime nei vari passaggi. Un modo per spiegare la concentrazione di cianotossine nei tessuti di fauna ittica selvatica è determinare come l'esposizione ambientale possa influenzare l'accumulazione di tossine nel pesce. Per esempio Amé *et al.* (2010) trovarono una significativa correlazione positiva tra la microcistina dissolta nelle acque del lago di Los Padres (Argentina) e la concentrazione di microcistina nel fegato del planctivoro *Odontesthes bonariensis*, mentre la microcistina intracellulare non era correlata.

Altri studi hanno trovato alte concentrazioni di microcistine in tessuti ittici da sistemi con alte concentrazioni nell'acqua (Amrani *et al.*, 2014; Jiao *et al.*, 2014; Nchabeleng *et al.*, 2014). Contrariamente, sono state osservate anche correlazioni negative (Wilson *et al.*, 2008; Bruno *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2013a). Mentre negli studi individuali non è evidente una relazione consistente, un numero crescente di studi su campo hanno misurato le cianotossine nei pesci in tutta una serie di livelli trofici e tipi tissutali.

Diversi laghi italiani sono stati studiati per la presenza di popolazioni cianobatteriche che causano periodiche fioriture con produzione di tossine (Messineo *et al.*, 2009) e contaminazione dei pesci (Bruno *et al.*, 2009). Gli effetti acuti che possono essere visti includono una ridotta sopravvivenza e diminuiti movimenti natatori, che possono anche includere la paralisi completa (Landsberg *et al.*, 2013). Sono presenti anche effetti cronici, come riduzione della fecondità e del tasso di crescita della popolazione, che possono apparire come conseguenza di concentrazioni sub-letali. Tuttavia, gli effetti dipendono dalla specie, dal tipo di tossina prodotta e dalla concentrazione presente (Ferrão-Filho *et al.*, 2009).

Nell'uomo, l'esposizione alle cianotossine può verificarsi in vari modi, tuttavia la via orale è la più frequente e importante. Ciò avviene principalmente attraverso l'acqua potabile o il consumo di cibi contaminati, ma si può anche verificare tramite l'ingestione di acqua durante le attività

ricreative. Inoltre, sia l'esposizione cutanea che l'inalazione sono possibili (Luesch, 2008). Fioriture tossiche possono riapparire periodicamente in ambienti idrici e le persone possono essere cronicamente esposte a cianotossine a dosi relativamente basse. Tossine conosciute come microcistine, nodularine e cilindrospermopsine possono causare danni al fegato e ai reni, citotossicità, neurotossicità, tossicità cutanea, disturbi gastrointestinali e altri problemi. Questi effetti possono verificarsi in pochi minuti di esposizione o possono comparire dopo giorni (Costa *et al.*, 2012).

Mentre la ricerca principale è stata rivolta allo studio della tossicità, alcuni studi hanno dimostrato che i cianobatteri producono anche composti con proprietà biologiche di tipo farmaceutico e interesse biotecnologico. Importanti effetti farmacologici descritti includono attività antitumorali, antinfiammatorie e antibiotiche (Costa *et al.*, 2012).

I cianobatteri producono una matrice elaborata di metaboliti secondari che esibiscono una vasta gamma di bioattività (Luesch *et al.*, 2001) e stanno quindi diventando una fonte eccezionale di composti importanti per nuovi farmaci (Dixit *et al.*, 2013).

1.1. Microcistine

La maggior parte degli studi si è focalizzata sugli eptapeptidi microcistine (Figura 1), che possono essere accumulati in tessuti ittici diversi (Lance *et al.*, 2014) (principalmente il fegato) e nello zooplankton (Hauser-Davis *et al.*, 2015).

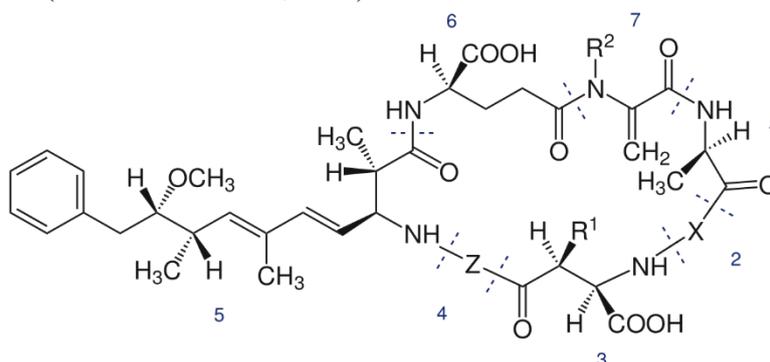


Figura 1. Scheletro base della molecola delle microcistine: 1-D-Alanina, 2-Amino Acido L-variabile, 3-Aceto D-Metil Aspartico, 4- Amino Acido L-variabile, 5-AddA: Acido 3-ammino-9-metossi-2,6,8-trimetil-10-fenildeca-4,6-dienoico, 6-Aceto D-glutammico, 7-N-Metilideidroalanina

I fattori che influenzano le concentrazioni di microcistine nei pesci includono il livello specifico nell'ambiente, combinato con il periodo di esposizione e con i processi metabolici ittici (Jia *et al.*, 2014; Gurbuz *et al.*, 2016). Le microcistine sono presenti in un'ampia gamma di sistemi acquatici e sono potenti epatotossine nonché promotori tumorali. Il caldo clima mediterraneo favorisce la fioritura dei cianobatteri in acque eutrofiche, che possono iniziare in primavera e durare fino a dicembre (Cook, 2004) con microcistine presenti durante tutto l'anno (Papadimitriou *et al.*, 2010). Le microcistine si accumulano principalmente nel fegato ma possono essere trovate anche in muscoli, visceri e persino cervello degli animali acquatici (Magalhaes *et al.*, 2001; Kagalou *et al.*, 2008; Papadimitriou *et al.*, 2009). Le sensibilità specie-specifiche alle microcistine sono state interpretate come il risultato di differenze anatomiche, fisiologiche e comportamentali tra i vari ordini ittici (Fisher & Dietrich, 2000; Tencalla, 1995).

Tuttavia, c'è poca informazione finora sulle differenze di sensibilità alle microcistine tra pesci della stessa specie. In più, c'è una questione aperta sull'accumulo stagionale di microcistine nelle differenti classi di lunghezze di una specie ittica. Durante il decadimento delle fioriture (Berg *et al.*, 1987) o da popolazioni cianobatteriche attivamente riprodotte (Sivonen, 1990), grandi quantità di microcistine vengono rilasciate in acqua, causando un significativo rischio sanitario per bestiame, selvatici e uccelli (Chorus, 2001; Carmichael, 2001; Mohamed *et al.*, 2003). Benché l'accumulo di microcistine nei pesci e in altri organismi acquatici sia un fenomeno conosciuto (De Figuereido *et al.*, 2004; Ibelings & Chorus, 2007; Kotak *et al.*, 1996; Magalhaes *et al.*, 2003), non sono state stabilite linee guida generalmente accettate per le concentrazioni di microcistine nei tessuti ittici, e la maggior parte degli scenari di esposizione alle microcistine non considera la potenziale esposizione attraverso il consumo di pesci.

Le potenti tossine chiamate microcistine, una famiglia di oltre 100 varianti tossiche (Gorham *et al.*, 2020) prodotte da molte specie cianobatteriche (Chorus & Bartram, 1999), sono inibitori degli enzimi PP1 e PP2A, e note per essere epatotossiche (Codd, 1995; Dawson, 1998), promotori tumorali (Nishiwaki-Matsushima *et al.*, 1991, 1992) e possibilmente cancerogeni umani (Grosse *et al.*, 2006). Quando le microcistine vengono rilasciate nell'acqua durante il decadimento della fioritura, una vasta gamma di organismi acquatici sono direttamente esposti alle tossine in soluzione. Focolai di morie ittiche su larga scala sono stati associati al verificarsi massiccio di fioriture di cianobatteri nei corpi idrici (Zimba *et al.*, 2001, 2006; Jewel *et al.*, 2003).

Studi sulle contaminazioni ittiche hanno mostrato sensibilità specie-specifiche alle microcistine; l'assunzione delle cianotossine nei pesci deriva principalmente dall'ingestione orale e, in misura minore, da assorbimento attraverso l'epitelio delle branchie (Ernst *et al.*, 2006).

Le microcistine possono concentrarsi in vari tessuti di pesci (Xie *et al.*, 2005): epatopatie, nefropatie e patologie delle branchie sono presenti nei pesci esposti a cianotossine, a causa della specifica inibizione di fosfatasi proteiche e altri effetti a valle, come un aumento dei valori degli enzimi epatici nel siero.

Diminuzione dello sviluppo nelle forme giovanili (Malbrouck & Kestermont, 2006) e cambiamenti comportamentali (Baganz *et al.*, 2004) sono stati osservati dopo l'immersione di pesci in acqua contenente microcistine; quest'ultimo effetto è probabilmente causato dalla capacità di queste tossine di attraversare la barriera emato-encefalica, trasportate da anioni che fungono da vettori di polipeptidi (Fischer *et al.*, 2005; Cazenave *et al.*, 2006).

Le microcistine sono considerate tra i gruppi tossici più pericolosi, capaci di avvelenamento acuto e cronico grave. Sono sintetizzate non ribosomicamente da una peptidasi sintetica maggiore e da un complesso enzimatico di polichetido sintasi; il cluster genico responsabile è stato sequenziato (Nishizawa *et al.*, 2000; Tillet *et al.*, 2000) e la sua produzione di tossine sembra essere attivata e disattivata in modo intermittente (Wood *et al.*, 2010).

La Microcistina – LR, la variante più studiata di questo gruppo, è un promotore tumorale molto efficace (classificato come 2B nella scala cancerogena dell'International Agency for Research on Cancer, IARC) (IARC, 2006) la cui azione, mediata dall'inibizione delle fosfatasi proteiche PP1/PP2A, induce un danno ossidativo al DNA (Zegura *et al.*, 2003), l'attivazione dei proto-oncogeni c-jun, c-fos, c-myc (Li *et al.*, 2009) e del fattore nucleare Nrf2 (fattore 2 correlato all'eritroide 2 del fattore nucleare) (Gan *et al.*, 2010), la repressione dei geni soppressori dei tumori bax, gadd45a e del proto-oncogene junb (Fonseca *et al.*, 2018).

Studi su laghi inquinati hanno messo in evidenza il rischio di esposizione umana alle microcistine attraverso entrambe le vie diretta (acqua potabile, attività ricreative) e indiretta (consumo di pesce) (Zhang *et al.*, 2009; Chen *et al.*, 2009).

La tossicità delle microcistine nei pesci dipende dall'equilibrio tra accumulo e metabolismo (Ito *et al.*, 2002) e le sensibilità osservate specie-specifiche sono state interpretate come il risultato di differenze anatomiche, fisiologiche e comportamentali tra i vari ordini di pesci

(Tencalla & Dietrich, 1997; Fischer & Dietrich, 2000); le capacità di disintossicazione attraverso la via glutatione-S-transferasi sono anch'esse specie-specifiche (Cazenave *et al.*, 2006).

In passato il rischio per i consumatori umani di pesci eviscerati era tradizionalmente considerato basso, perché si pensava che le microcistine si accumulassero principalmente nel fegato di pesce. Studi recenti, tuttavia, hanno rilevato concentrazioni di microcistine pari a 337,3 µg/kg (*Tilapia rendalli*) (Magalhaes *et al.*, 2001), 102 µg/kg (*Oreochromis niloticus*) (Mohamed *et al.*, 2003), 96,5 µg/kg (*Hypophthalmichthys molitrix*) (Chen *et al.*, 2006) e 28 µg/kg (*Oncorhynchus mykiss*) (Wood *et al.*, 2006) nel tessuto muscolare di pesci selvatici o di allevamento, indicando che anche il consumo di tessuto muscolare ittico potrebbero costituire una minaccia per la salute umana. Inoltre le microcistine possono essere trasferite lungo la catena alimentare (Smith & Haney, 2006), rappresentando una potenziale minaccia per i consumatori umani non solo per la loro presenza nel pesce crudo, ma anche per la loro stabilità e concentrazione durante la cottura (Bruno *et al.*, 2009) e per l'aumento delle microcistine libere nel tessuto di pesce durante una cottura specifica, come l'ebollizione (Zhang *et al.*, 2010). Questo potenziale pericolo ha portato allo sviluppo di diverse tecniche di estrazione e metodi analitici per la rivelazione di microcistine in tessuti ittici. Diversi metodi sono stati descritti in letteratura, basati sul test biologico di inibizione della proteinfosfatasi, su test immunochimici (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*, ELISA), sul test biologico in topo, su analisi HPLC con rivelazione UV. Tuttavia, questi metodi hanno mostrato alcune limitazioni, perché mancano di selettività nell'identificazione delle singole cianotossine nel campione, e talvolta possono anche essere influenzati dalla presenza di attività endogene (es. saggio biologico di inibizione della proteinfosfatasi). Anzi la sensibilità dei metodi basati su HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*) è riconosciuta non adeguata nel determinare i bassi livelli di contaminazione di cianotossine.

Sebbene l'ELISA basato su anticorpi sia policlonali che monoclonali sia risultato sensibile e affidabile, le tecniche analitiche basate sulla cromatografia liquida accoppiata alla spettrometria di massa (*Liquid Chromatography-Mass Spectrometry*, LC-MS) sono oggi considerate la scelta migliore per uno studio moderno di contaminazione da cianotossine, sia in acqua che nei tessuti. Queste tecniche possono essere utilizzate per screening e conferma, permettendo di identificare in modo univoco i singoli composti, a livelli di ppb o sub-ppb; per questi motivi, l'analisi LC-MS si adatta ai fini di entrambe le funzioni di controllo e di monitoraggio per la valutazione della sicurezza alimentare e della protezione dei consumatori (per una revisione utile vedi Lawton & Edwards, 2008).

1.2. Anatossine

Le fioriture cianobatteriche dannose nei laghi sono state descritte per decenni; nei fiumi, tuttavia, le prime segnalazioni di decessi di animali da cianobatteri bentonici tossici in molte regioni si sono avute solo negli ultimi 20 anni (Wood *et al.*, 2007). I cianobatteri bentonici tossici nei fiumi sono stati documentati in molti paesi e i taxa bentonici sono stati trovati produrre un ampio spettro di quelle cianotossine, anche se la maggior parte dei decessi animali segnalati in relazione ai cianobatteri bentonici sono stati associati alla presenza di anatossina-a (ANTX) e/o omoanatossina-a (HANTX) (per una review vedere Quiblier *et al.*, 2013).

L'anatossina-a e l'omoanatossina sono potenti neurotossine prodotte da alcuni ceppi planctonici e bentonici dei generi *Anabaena*, *Oscillatoria*, *Aphanizomenon* e *Cylindrospermum* (Bouma-Gerson *et al.*, 2018). Numerose intossicazioni mortali di animali, da anatossina-a e omoanatossina-a, sono state segnalate in tutto il mondo (Gugger *et al.*, 2005; Puschner *et al.*, 2010; Legno *et al.*, 2007). Questi alcaloidi si legano strettamente al recettore dell'acetilcolina nicotinic, nella gamma sub-nanomolare, e quindi provocano la morte degli animali quasi immediatamente dopo

l'ingestione (Wonnacott & Gallagher, 2006). L'anatossina-a, in quanto agonista competitiva dell'acetilcolina, può legarsi a specifici recettori della membrana, in particolare alle giunzioni neuromuscolari, influenzando la trasmissione del segnale tra neuroni e muscoli, causando sovrastimolazione delle cellule muscolari (Carmichael, 1994; Aràoz *et al.*, 2010).

Gli effetti acuti nei vertebrati includono una rapida perdita di coordinazione, una diminuzione dell'attività locomotoria, una paralisi dei muscoli scheletrici e respiratori periferici, causando sintomi come perdita di coordinazione, contrazione, respirazione irregolare, tremori, andatura alterata e convulsioni prima della morte da asfissia acuta indotta da arresto respiratorio (Dittmann & Wiegand, 2006).

Forse perché l'anatossina-a è molto instabile e labile nell'acqua (Stevens & Krieger, 1991) e perché nessun effetto cronico era stato descritto nei mammiferi (Fawell *et al.*, 1999), questa tossina è stata considerata una minore minaccia ambientale rispetto ad altre cianotossine.

Nonostante gli effetti neurotossici acuti dell'anatossina-a, la conseguenza della proliferazione di biofilm cianobatterici produttori di anatoossine-a sulla salute dell'ecosistema e sugli organismi acquatici rimane in gran parte sconosciuta.

Nonostante le fioriture di cianobatteri tossici siano state associate a una diminuzione della biodiversità di macro-invertebrati (Aboal *et al.*, 2002), pochi studi hanno valutato gli effetti tossicologici di questi composti sugli organismi acquatici (Carneiro *et al.*, 2015; Osswald *et al.*, 2007b; Anderson *et al.*, 2018). In alcuni esperimenti condotti su carpe e pesci rossi, sono stati osservati difetti comportamentali come il rapido movimento opercolare, il nuoto anormale (Osswald *et al.*, 2007a) e la rigidità muscolare. Carmichael *et al.* (1999) hanno descritto anche le alterazioni della frequenza cardiaca negli embrioni di pesce zebra dopo un'esposizione all'anatossina.a. A causa di tale scarsità di informazioni non esistono ancora dati riguardanti la capacità delle specie acquatiche di bioconcentrare e bioaccumulare anatoossine provenienti dall'assunzione orale e il successivo potenziale impatto tossicologico sugli organismi. In uno studio precedente, Osswald e i colleghi (2007) hanno scoperto che l'anatossina-a può essere bioaccumulata in carpe a livelli significativi (0,768 µg/g di peso della carpa). Non è ancora noto quale tipo di impatto ciò possa avere nelle reti alimentari acquatiche.

1.3. BMAA

La β-N-metilammino-L-alanina (BMAA) è un amminoacido non proteico (Figura 2) che è stato scoperto nel 1967 dai semi di *Cycas micronesica* sull'isola di Guam (Vega *et al.*, 1967).

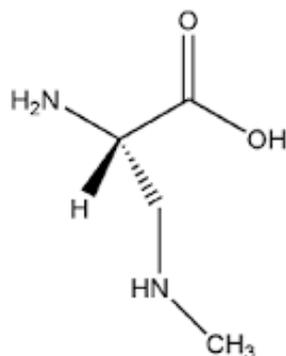


Figura 2. Struttura della BMAA

Questo composto neurotossico (Chiu *et al.*, 2011) è stato correlato all'alta incidenza di sclerosi laterale amiotrofica/complesso Parkinsonismo-demenza (SLA/PDC) osservato tra la popolazione indigena Chamorro. Questa ipotesi è stata poi criticata e respinta poi successivamente rafforzata nei primi anni 2000 (Karamyan, 2008). Un gruppo di ricerca ha dimostrato successivamente che la BMAA poteva essere prodotta da un cianobatterio simbiotico (*Nostoc species*) (Cox, 2003) e poteva essere biomagnificata all'interno dell'ecosistema di Guam, dai cianobatteri al cervello di persone che sono poi morte a causa della SLA/PDC (Cox *et al.*, 2003, Murch *et al.*, 2004), e che grandi quantità di BMAA possono essere rilasciate dalle proteine dopo l'idrolisi acida totale dei campioni (Cox *et al.*, 2003; Murch *et al.*, 2004). Dopo che Cox *et al.* (2005) hanno riferito che quasi tutti i cianobatteri possono produrre BMAA, altri gruppi hanno trovato BMAA in diversi ecosistemi in tutto il mondo (Metcalf *et al.*, 2008; Esterhuizen *et al.*, 2008; Johnson *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2010; Spáčil *et al.*, 2010), e tre modelli di magnificazione biologica sono stati suggeriti rispettivamente nel Mar Baltico (Jonasson *et al.*, 2010), nella baia della Florida (Brand *et al.*, 2010) e nel lago di Taihu, in Cina (Jiao, 2014).

Ci sono diversi meccanismi potenziali con cui la BMAA può causare lesioni neurologiche (Rao *et al.*, 2006; Lobner *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2010) e le esposizioni ambientali possono contribuire allo sviluppo di disturbi neurodegenerativi (Murch *et al.*, 2004; Pablo *et al.*, 2009).

La BMAA è prodotta da specie rappresentative di cianobatteri, diatomee e dinoflagellati (Cox *et al.*, 2005; Jiang *et al.*, 2014; Lage *et al.*, 2014). Queste specie sono distribuite a livello globale e presenti negli habitat terrestri, salmastri, d'acqua dolce e marina. BMAA è stata rilevata nella polvere del deserto nel Golfo Persico (Cox *et al.*, 2009) e in diversi corpi idrici, tra cui acque urbane nei Paesi Bassi (Faassen *et al.*, 2004), 11 laghi d'acqua dolce e un corpo idrico salmastro in Gran Bretagna (Metcalf *et al.*, 2008); in cianobatteri isolati dalle riserve d'acqua dolce sudafricane (Esterhuizen *et al.*, 2008) in quelli presenti in un'oasi del deserto di Gobi (Craighead *et al.*, 2008), e in acque marine e dolci di ecosistemi cinesi (Li *et al.*, 2010).

Le fioriture di fitoplancton produttore sono un fenomeno ricorrente anche nel Mar Baltico (Boesch *et al.*, 2006; Gallon *et al.*, 2002). Insieme alla rivelazione di BMAA nel cervello di pazienti canadesi che soffrivano di diverse malattie neurodegenerative (Pablo *et al.*, 2009), questi risultati hanno suggerito una possibile esposizione umana diffusa alla neurotossina BMAA e la sua implicazione globale nella SLA e anche nei morbi di Alzheimer e Parkinson.

Tuttavia, la presenza di BMAA nei cianobatteri e in altre matrici è stata controversa (Kruger *et al.*, 2012; Faassen *et al.*, 2014). L'esistenza di almeno tre isomeri naturali, l'acido 2,4 diamminobutirico (DAB), la N-2-ammino-etil-glicina (AEG) e l'ammino-N-metil-alanina (BAMA), può essere parzialmente coinvolta nella controversia sulla BMAA e ha evidenziato la necessità di metodi altamente selettivi per qualificare e quantificare in modo inequivocabile la BMAA dai suoi isomeri. Il DAB è un isomero neurotossico di BMAA (Kruger *et al.*, 2012) che è stato trovato per la prima volta nei cianobatteri nel 2008 (Rosen *et al.*, 2008), ma è stato anche ampiamente riportato nei procarioti e negli eucarioti (Banack *et al.*, 2010).

Tra tutti gli isomeri noti di BMAA, AEG e BAMA sono stati selezionati da due gruppi per lo sviluppo di metodi di rilevazione, perché potrebbero potenzialmente interferire con l'analisi della BMAA (Banack *et al.*, 2011; Jiang *et al.*, 2012). Infatti, L'AEG è stato trovato nei cianobatteri, e la sua produzione è stata suggerita essere altamente conservata (Banack *et al.*, 2012) mentre il BAMA è stato osservato nei molluschi del Mar Baltico (Jiang *et al.*, 2012).

La tossicità di questi due isomeri non è stata studiata finora, soprattutto per L'AEG. A oggi, due articoli hanno riportato BMAA in cianobatteri con metodi MS/MS selettivi utilizzando una derivatizzazione dei campioni (Jiang *et al.*, 2013; Berntzon *et al.*, 2013). Recentemente, è stata evidenziata la produzione di BMAA anche in diatomee e dinoflagellati (Jiang *et al.*, 2014; Lage *et al.*, 2014). Tuttavia, la forma libera di BMAA non è stata presa in considerazione. Non è chiaro perché essa non sia stata analizzata, poiché sembra ragionevole supporre che la magnificazione

biologica possa provenire più facilmente dal composto libero piuttosto che dalla forma coniugata di BMAA. Infatti, Dunlop *et al.* (2013) hanno riferito che la BMAA libera può essere incorporata erroneamente nelle neuroproteine umane al posto della serina in una linea cellulare *in vitro*, e questa incorporazione nelle proteine era stata inizialmente postulata come meccanismo della bioaccumulazione di BMAA nell'ecosistema di Guam.

Dalla scoperta della BMAA nel 1967, il legame tra BMAA e malattie neurodegenerative come la Sclerosi Laterale Amiotrofica (SLA), è ancora in discussione (Karamyan *et al.*, 2008, Banack *et al.*, 2010, Lee *et al.*, 2012).

Il consumo di organismi acquatici e frutti di mare contaminati è una possibile via di esposizione umana a BMAA. Potenziali associazioni di SLA sporadica con BMAA presenti negli organismi acquatici sono state recentemente ipotizzate a Chesapeake Bay, Maryland, USA (Field *et al.*, 2008) e nella laguna di Thau, in Francia (Masseret *et al.*, 2013) con metodi che utilizzano la derivatizzazione degli analiti.

Le concentrazioni di BMAA totale nelle cozze dello studio sulla Laguna di Thau, la più grande area lagunare della regione della Linguadoca-Rossiglione sulla costa meridionale francese, hanno mostrato un aumento dipendente dal tempo durante l'estate del 2009, mentre erano più stabili nelle ostriche. Le concentrazioni del DAB totale erano simili nelle due matrici di molluschi, rispettivamente tra 3,4-9,7 e 3,3-8,8 g/g di DW (*Dry Weight*, peso secco) in cozze e ostriche.

Per quanto riguarda la BMAA, le concentrazioni di AEG totali nelle cozze erano aumentate tra il 20 giugno e il 7 settembre. Il più alto contenuto di BMAA e isomeri presente nelle cozze può essere spiegato dalla loro attività di filtrazione generalmente più elevata rispetto alle ostriche (Masseret *et al.*, 2013). Durante l'estate 2009, due fioriture di fitoplancton dominate da diatomee (es. *Chaetoceros species*) sono state osservate all'inizio di luglio e alla fine di agosto nella Laguna di Thau (Pernet, *et al.*, 2012).

Le diatomee sono state recentemente ritenute produrre BMAA (Jiang *et al.*, 2014); l'insorgenza di tali microalghe oltre ai picocianobatteri (Masseret *et al.*, 2013) potrebbe spiegare la presenza di BMAA nei molluschi durante l'estate 2009.

Nel Mar Baltico nei mesi estivi (giugno-agosto), le fioriture di cianobatteri sono dominate dai generi cianobatterici *Nodularia* e *Aphanizomenon*, che hanno anche dimostrato di produrre BMAA (Cox *et al.*, 2005; Degerholm *et al.*, 2006; Jonasson *et al.*, 2006), fioriture più grandi di diatomee sono presenti in primavera (marzo-maggio). Jonasson *et al.* (2006) hanno evidenziato che lo zooplankton, che naturalmente si nutre di cianobatteri, contiene livelli chiaramente più elevati di BMAA rispetto ai produttori di BMAA. Inoltre, sono stati analizzati diversi tessuti ittici che contenevano concentrazioni fino a 200 volte superiori di BMAA rispetto ai cianobatteri. I risultati ottenuti in questo studio sul Mar Baltico hanno rivelato, per la prima volta, che la BMAA è stata biotrasferita in un ecosistema acquatico al di fuori di Guam.

Il Mar Baltico non è l'unica fonte di pesce commerciale in Svezia, un paese che contiene molti laghi, tra cui alcuni dei più grandi d'Europa.

Nel Mar Baltico, la BMAA è stata rivelata in diverse specie di pesci commerciali, sollevando la questione del bioaccumulo di BMAA nei sistemi lacustri svedesi. Qui è stata rivelata la presenza di BMAA in campioni d'acqua dal lago di Finjasjon e sono stati identificati i modelli di bioaccumulo sia nei pesci plancto/bentivori che piscivori, secondo le specie ittiche, il peso totale, il sesso e la stagione di raccolta. Per la prima volta è stato utilizzato un gran numero di individui ittici per trarre conclusioni sul bioaccumulo di BMAA in una comunità ecologica chiusa sulla base di un approccio statistico.

Si può concludere che i modelli di alimentazione (plancto/bentivori) e l'aumento dell'età dei pesci possono portare a una maggiore concentrazione di tessuto di BMAA.

Il cianobatterio *Aphanizomenon klebahnii*, precedentemente noto come produttore di BMAA (Cox *et al.*, 2005) era la potenziale fonte di BMAA nel lago di Finjasjön durante il periodo di

campionamento. Tuttavia, le recenti scoperte di produttori di BMAA tra i gruppi delle diatomee e dei dinoflagellati (Jiang *et al.*, 2014; Lage *et al.*, 2014) hanno sollevato la questione se le altre specie di fitoplancton presenti (cioè *Ceratium hirundinella*, *Cryptomonas species*, *Fragilaria crotonensis* e *Asterionella formosa* (Annadotter *et al.*, 2011) possano essere anch'esse fonte di BMAA.

Due delle più alte concentrazioni di BMAA sono state registrate in campioni cerebrali di esemplari femminili di *P. fluviatilis* di circa 200 g (teoricamente grandi individui). Queste concentrazioni di BMAA rappresentano probabilmente l'effetto cumulativo della precedente alimentazione su zooplancton e bentos insieme alla successiva alimentazione su prede ittiche contaminate da BMAA. Insieme alla specie, il peso totale dell'individuo era statisticamente significativo in relazione alle concentrazioni di BMAA: gli individui più pesanti e probabilmente più anziani della stessa specie contenevano concentrazioni di BMAA più elevate.

Quindi, in un sistema in cui BMAA è continuamente biodisponibile, un organismo bioaccumula BMAA per tutta la sua vita, quindi gli individui più anziani conterranno concentrazioni più elevate di BMAA. L'influenza del peso dell'organismo sulla quantità di BMAA può anche spiegare le varianze registrate in base al sesso e alla stagione. Le femmine possono avere tassi di crescita più elevati (Cox, 1983) e sono spesso più grandi dei maschi. Quindi le femmine possono consumare grandi quantità di prede potenzialmente contaminate con BMAA e questo può spiegare la maggiore quantità di BMAA nel loro tessuto cerebrale. Poiché la maggior parte degli individui catturati in primavera erano femmine, questa stagione ha prodotto anche concentrazioni più elevate di BMAA. Nel complesso, la BMAA si trova meno frequentemente e a concentrazioni più basse nel tessuto muscolare dei pesci rispetto al tessuto cerebrale.

Le concentrazioni complessive di BMAA nei tessuti di pesce del lago di Finjasjön erano simili a quelle dei tessuti ittici del Mar Baltico (Jonasson *et al.*, 2010) anche se inferiori a quelle trovate mediamente nei pesci provenienti dalle acque costiere del sud della Florida, vale a dire 58 ± 41 µg/g in peso umido nel muscolo, 588 ± 81 µg/g in peso umido nel fegato, e 1450 ± 687 µg/g in peso umido nel rene (Mondo *et al.*, 2014) o nei pesci dal lago di Taihu in Cina, dove i valori di BMAA nel muscolo dei pesci variano da 0,07 a 35,91 µg/g in peso secco (Jiao *et al.*, 2014).

Questa variazione potrebbe essere dovuta a fattori biologici, poiché i sistemi acquatici svedesi sono meno colpiti dalla BMAA, anche se una spiegazione più probabile è la differenza metodologica tra gli studi. La rivelazione di BMAA e mercurio nel tessuto muscolare di *A. brama* e *S. lucioperca* è notevole, in quanto la BMAA a concentrazioni non tossiche potenzia la neurotossicità del mercurio (Rush *et al.*, 2012), la neurotossicità sinergica di BMAA e mercurio può quindi minacciare la salute umana nonostante concentrazioni di mercurio inferiori al livello consentito dall'UE. Nel loro insieme, i dati qui presentati indicano la diffusa presenza naturale di BMAA nel lago di Finjasjön: questa constatazione, unitamente alla co-presenza di BMAA e mercurio, solleva interrogativi sull'attuale potenziale rischio per la salute pubblica, dal momento che le specie ittiche analizzate vengono spesso catturate e consumate dalla popolazione circostante la città di Hässleholm.

Il collegamento suggerito tra la BMAA e l'insorgenza di malattie neurodegenerative e l'individuazione di questa cianotossina negli organismi acquatici ha stimolato la ricerca sul potenziale rischio di esposizione umana associato all'approvvigionamento di prodotti alimentari da corpi idrici eutrofizzati in tutto il mondo.

Il bacino della diga di Hartbeespoort nella provincia nord-occidentale del Sud Africa ha persistenti fioriture cianobatteriche ed è ampiamente utilizzato dai pescatori, molti dei quali consumano il loro pescato. La vendita commerciale di specie ittiche raccolte da questo serbatoio come parte di una recente strategia di bonifica biomanipolatrice può rappresentare un ulteriore pericolo.

BMAA e Microcistine (MC) sono stati rivelati nei pesci provenienti da questo serbatoio. Livelli di BMAA fino a 1630 ng/g di peso secco e concentrazioni di MC fino a 29,44 ng/g di peso secco sono stati misurati nei pesci provenienti durante un'estesa fioritura, con una chiara correlazione tra la quantità totale di BMAA determinata nel tessuto muscolare del pesce e la loro posizione relativa nella rete alimentare del bacino della diga di Hartbeespoort.

È interessante notare che i pesci provenienti da questo serbatoio in inverno, quando le fioriture cianobatteriche dense erano mancanti, avevano livelli di BMAA fino a 3055 ng/g di peso secco.

1.4. Cilindrospermopsine

Le cilindrospermopsine (*Cylindrospermopsin*, CYN) sono una classe composta da cinque analoghi chimici: CYN, 7-epi-CYN, 7-deoxy-CYN, 7-deoxydesulfo-CYN e 7-deoxydesulfo-12-acetyl-CYN. La cilindrospermopsina è stata isolata per prima dal cianobatterio *Cylindrospermopsis raciborskii* che fu trovato in una riserva artificiale di acqua potabile durante una epidemia di epatoenterite a Palm Island nel Queensland settentrionale, Australia, nel 1979.

La cilindrospermopsina (CYN) (Figura 3) è un alcaloide solfato-guanidinico nefrotossico, timotossico ed epatotossico, con un radicale 5-sostituito-2,4-diossipirimidina (uracile), per un peso molecolare di 415 g/mol (Banker, 1997). È un potente inibitore della sintesi delle proteine e può causare la morte cellulare, con il fegato come organo bersaglio principale.

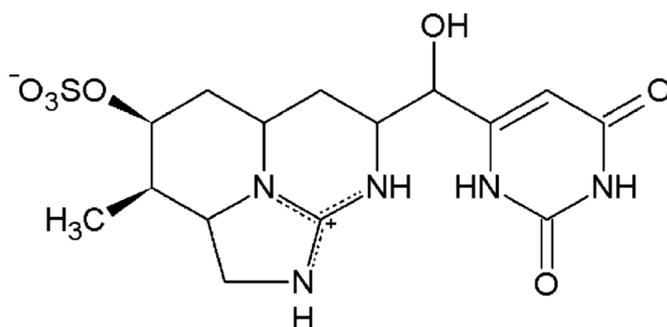


Figura 3. Struttura della cilindrospermopsina

Le cilindrospermopsine, la seconda classe di cianotossine per frequenza di rilevazione in Italia, sono state oggetto di particolare interesse scientifico nell'ultima decade a causa del loro diffondersi dalle aree tropicali a quelle temperate, in apparente accordo con il manifestarsi dei fenomeni legati al *global warming*.

Oltre che sul fegato, a seguito di avvelenamento da CYN sono stati descritti anche effetti tossici su reni, polmoni, cuore e timo (Terao, 1994). Nel topo sono state dimostrate reazioni di sensibilizzazione cutanea prodotte dalla tossina pura o da sospensioni acquose di *C. raciborskii* contenenti CYN (Stewart, 2006) oltre a tossicità fetale dopo esposizione in gestazione avanzata (Rogers, 2007).

La mutagenicità di CYN è stata recentemente dimostrata *in vitro* ed esiste forte evidenza anche per la sua cancerogenicità in vivo: frammentazione e modificazione del DNA (Shaw, 2000; Shen, 2002; Maire, 2010) sono state osservate nei fegati di topi trattati, mentre tutta una gamma di anomalie citogenetiche sono state osservate in cellule linfoblastoidi umane esposte a CYN, con formazione di micronuclei centromero-negativi indicanti rottura del DNA a doppia elica (Humpage, 2000). L'attività genotossica è causata dall'abilità della tossina di indurre rotture

dell'elica del DNA, con perdita di interi cromosomi per i danni alla funzione centromero/cinetocore.

Inoltre, la CYN induce risposte da stress in fibroblasti umani coltivati e cellule HepG2, che causano l'attivazione del fattore di trascrizione p53 (Bain, 2007). A basse dosi la CYN sopprime la sintesi proteica glutatione-coniugata, probabilmente inibendo la traduzione ribosomiale attraverso il legame con una proteina associata al sistema di traduzione eucariotico (Froschio, 2001, 2008); ma a maggiori concentrazioni domina un processo più rapidamente tossico, metabolismo-dipendente: la sua tossicità acuta sembra essere mediata da metaboliti citocromo p 450-generati (Humpage, 2005).

Il primo episodio di avvelenamento umano da acqua potabile contaminata venne registrato a Palm Island (Australia) nel novembre 1979, quando una comunità aborigena fu interessata da un'epidemia di epatoenterite (Griffiths, 2003).

La CYN è stata provata avere tossicità ambientale verso gli anfibi (Kinnear, 2007) e attività antibatterica (Rasmussen, 2008). Recenti evidenze hanno provato che anche la crescita e il metabolismo dei vegetali (Vasas, 2002) come la germinazione del polline (Metcalf, 2004) sono inibiti dalla CYN, con implicazioni negative per le attuali pratiche di irrigazione a getto.

Ci sono a tutt'oggi pochi studi sull'accumulazione di CYN nella fauna ittica: la CYN è stata provata contaminare gamberi (*Cherax quadricarinatus*, fino a 4,3 µg/g) e pesci (*Melanotaenia eachamensis*, fino a 1,2 µg/g) di un piccolo laghetto di acquacoltura australiano (Saker, 1999), e molluschi d'acqua dolce (*Anodonta cygnea*, fino a 2,52 µg/g) in uno studio di esposizione di 16 giorni (Saker, 2003). La presenza di cilindrospermopsina fu rivelata per la prima volta in Europa nel 2002 (Kiss, 2002) e in Italia nel 2004 (Manti *et al.*, 2005).

1.5. Tossine secondarie

Negli ultimi 20 anni molti altri gruppi di peptidi bioattivi sono stati scoperti nei cianobatteri: tra gli altri aeruginosine, microginine, cianopeptoline, anabaenopeptine, anabaenopeptilidi, microviridine e nostophycine. A oggi sono stati descritti più di 600 peptidi cianobatterici (per una revisione vedi Welker *et al.*, 2006).

L'interesse continuo e crescente deriva sia dalla sorveglianza dei sistemi acquatici, in particolare quando i composti tossici sollevano preoccupazioni di salute pubblica, sia da varie e diverse bioattività di strutture uniche con potenziali implicazioni farmacologiche (Welker *et al.*, 2006). Questi peptidi si trovano spesso nelle fioriture cianobatteriche, insieme a numerosi altri peptidi non ancora identificati (Fastner *et al.*, 2009; Welker *et al.*, 2004; Elkobi-Peer *et al.*, 2015).

Le anabaenopeptine sono peptidi ciclici unici che hanno la parte comune del peptide ciclico legata a tirosina, arginina, lisina e fenilalanina, attraverso un legame ureidico (Fujii, *et al.*, 1996; Fujii *et al.*, 2002). Gli anabaenopeptilidi sono depsipeptidi ciclici a 19 componenti contenenti legato un residuo unico, il 3-amino-6-idrossi-2-piperidone (Ahp) (Fujii *et al.*, 1996; Fujii *et al.*, 2002). Questi peptidi presentano diverse bioattività come l'inibizione della serina, della provapsina o della proteasi chimotripsina (Welker *et al.*, 2006; Elkobi-Peer *et al.*, 2015).

Una migliore comprensione della produzione e della tossicità di questi peptidi è essenziale per valutare i controlli ambientali e per guidare la valutazione del rischio da cianotossine (Tonk *et al.*, 2009). Le analisi di diversi ceppi tossici e non tossici di cianobatteri hanno dimostrato che i cianobatteri possono produrre microcistine e/o altri peptidi (Tonk *et al.*, 2009; Martins *et al.*, 2009; Saker *et al.*, 2005).

Pertanto, una comprensione completa delle possibili funzioni dei peptidi bioattivi e del loro impatto ecologico richiede di considerare i peptidi bioattivi come un gruppo, piuttosto che concentrarsi esclusivamente sulle microcistine. La presenza di microcistine (Gkelis *et al.*, 2005,

2010, 2014) e anabaenopeptine (Gkelis *et al.*, 2005, 2010, 2014) è già stata documentata in Grecia nelle fioriture dominate da *Microcystis* e/o *Anabaena* (*Dolichospermum*).

Le fioriture di cianobatteri sono state trovate in 10 dei 36 corpi d'acqua dolce esaminati nel lavoro di Gkelis *et al.*, (2015).

L'analisi HPLC dei campioni d'acqua ha portato all'identificazione di sei diversi picchi in 41 campioni su 101 campioni positivi all'HPLC, che avevano lo stesso tempo di ritenzione e gli stessi spettri di assorbimento UV nell'ultravioletto (*Ultraviolet Absorption Xpectra*) rispettivamente di MC-LR (Microcistina contenente Leucina e Arginina), MC-RR (Microcistina contenente Arginina e Arginina), MC-YR (Microcistina contenente Tirosina e Arginina), anabaenopeptina A, anabaenopeptina B e anabaenopeptilide 90.

Le concentrazioni di anabaenopeptine prodotte dalle popolazioni naturali sono state determinate per la prima volta nello studio sui laghi greci da Gkelis, Lanaras & Sivonen (2015). Nonostante le varie attività biologiche (es. Elkobi-Peer *et al.*, 2015; Itou *et al.*, 2009; Gkelis *et al.*, 2009) che le anabaenopeptine e i composti correlati mostrano, non esistono molti studi sulla loro presenza nelle fioriture (es. Welker *et al.*, 2009; Elkobi-Peer *et al.*, 2015; Gkelis *et al.*, 2005; Grach-Pogrebinsky *et al.*, 2003; Kurmayer *et al.*, 2011).

In un ceppo mutante di *Anabaena* 90, le anabaenopeptine furono trovate in maggiore concentrazione, probabilmente per compensare la mancanza di anabaenopeptilide (Repka *et al.*, 2004). Repka *et al.* 2004 suggerirono che le anabaenopeptine e gli anabaenopeptilidi, che appartengono entrambi alla famiglia degli inibitori della serina proteasi, hanno funzioni simili nella cellula. Inoltre, nel ceppo *Anabaena* 90, la diminuzione delle anabaenopeptine A e C è accompagnata da un aumento del contenuto di anabaenopeptilide 90B (Tonk *et al.*, 2009).

In questo studio, l'anabaenopeptilide 90A è stato l'unico peptide trovato in un campione dal lago di Mikri Prespa e l'anabaenopeptina UA1 è stata l'unico trovato in sei campioni in una fioritura dominata da *Microcystis wesenbergii*.

Allo stesso modo, nel lago di Averno (Italia) anabaenopeptine B e F sono state trovate in assenza di microcistine (Ferranti *et al.*, 2008).

Tali risultati sostengono il suggerimento di Tonk *et al.* (2009) che cianopeptoline, anabaenopeptine e anabaenopeptilidi sono prodotti costitutivi e quindi la loro produzione assomiglia alla produzione costitutiva di microcistine.

Le prove provenienti dallo studio dei ceppi, tuttavia, sono contraddittorie: nessuno dei ceppi portoghesi di *Microcystis aeruginosa* che producono microcistine è stato osservato contenere microginina, microviridina, anabaenopeptina, o aruginosinamide (Tonk *et al.*, 2009). Anabaenopeptine e aruginosinamide erano anche assenti nei genotipi che producono microcistine (Fastner *et al.*, 2001).

Welker *et al.* (2004) hanno segnalato un'alta percentuale di coproduzione di microcistina e cianopeptolina. Tuttavia, l'alta concentrazione di anabaenopeptina (>1000 µg/L) trovata in alcuni campioni indica che ci può essere qualche impatto, almeno sull'ecologia e la struttura della rete alimentare degli ecosistemi acquatici, a causa della presenza di anabaenopeptine e composti correlati.

Recentemente, un ceppo di *Microcystis flos-aquae* che produce anabaenopeptina è stato osservato inibire fortemente la crescita di un'ameba d'acqua dolce, dimostrando che i composti bioattivi tossici diversi dalle MC sono di grande importanza per il pascolo delle amebe (Urrutia-Cordero *et al.*, 2013).

Negli ultimi decenni una varietà di altri cianopeptidi oltre le microcistine è stata identificata in colture pure e in biomasse raccolte da eventi di fioritura cianobatterica (Beverdorf *et al.*, 2017; Bogiatti *et al.*, 2017; Flores & Caixach, 2015; Saker *et al.*, 2005; Welker *et al.*, 2004).

Negli anni '60 del secolo scorso, alcuni primi studi hanno riferito la produzione di aruginosine da parte di *Microcystis aeruginosa*, un genere cianobatterico rinomato per la

produzione di microcistine (Herbert & Holliman, 1964; Holliman, 1969; Murakamie *et al.*, 1995; Namikoshi & Rinehart, 1996).

Nonostante la crescente produzione scientifica, la pubblicazione di studi sui cianopeptidi diverse dalle microcistine rappresenta meno del 10% degli studi scientifici. La sfida principale per una valutazione sistematica del rischio è la grande diversità dei cianopeptidi.

I peptidi costituiscono oltre il 60% dei composti attivi prodotti dai cianobatteri (Chlipala *et al.*, 2011). Oltre a più di 240 microcistine, un minimo di 500 cianopeptidi che vanno da 400 a 1900 Dalton sono stati identificati strutturalmente fino a oggi e dalla loro varietà deriva la complessità del sistema di denominazione (Meriluoto *et al.*, 2017; Welker & von D'ohren, 2006). I cianopeptidi sono costituiti da peptidi ciclici e lineari non-ribosomici che possono contenere anche peptidi non-proteinogenici residui e modifiche post-traduzionali. Welker & von Dohren hanno presentato una classificazione dei cianopeptidi basata su sottostrutture molecolari (Welker & von Dohren, 2006).

Ogni classe contiene una sottostruttura caratteristica con una biosintesi condivisa, mentre le variazioni dei monomeri definiscono le diverse varianti all'interno di ogni classe.

Ad esempio, le microcistine sono eptapeptidi con la caratteristica Adda moiety (3-ammino-9-metossi-2,6,8-trimetil-10-fenil-deca-4,6-dienoico acido) e le diverse varianti con i monomeri alterati in due posizioni. La variazione è tipicamente espressa aggiungendo il codice di una lettera dell'aminoacido, in modo che la Microcistina-LR si riferisce alla variante con leucina (L) e arginina (R) nelle posizioni (2) e (4), rispettivamente.

Tuttavia, il codice di una lettera è limitato agli amminoacidi standard e altri richiedono suffissi più elaborati. Le nodularine sono esapeptidi con una struttura simile alle microcistine, la frazione -Adda (-acido 3-ammino-9-metossi-2,6,8-trimetil-10-fenil-deca-4,6-dienoico). Ogni classe contiene una sottostruttura conservata peculiare e blocchi di costruzione variabili.

Oltre alle microcistine, più di due elementi costitutivi monomerici possono variare in questi peptidi, con una conseguente grande serie di combinazioni di isoformi all'interno di ogni classe di cianopeptidi. Tra i cianopeptidi, le cianopeptoline contengono più composti (circa il 36%), seguite da microginine (circa il 14%), aeruginosine (13%), criptofiline e anabaenopeptine (circa 9% ciascuno).

Esistono diversi sinonimi per la stessa classe di cianopeptidi o singoli composti perché nessun sistema di denominazione standardizzato è stato introdotto all'inizio.

Ad esempio, la classe delle cianopeptoline è anche nota come microcistidi, micropeptine, aeruginopeptine o oscillapeptine e le aeruginosine sono anche note come microcine o spumigine.

Nella vecchia letteratura, per i nomi dei cianopeptidi si è spesso scelto di fare riferimento al taxon da cui il composto era stato isolato ed è stato aggiunto un suffisso facendo riferimento alle proprietà strutturali compresi residui caratteristici, peso molecolare o desmetilazione.

Ulteriori dettagli aggiuntivi di alcuni cianopeptidi e dei loro sistemi di denominazione possono essere trovati in studi completi (Chlipala *et al.*, 2011; Van Wagoner *et al.*, 2007; Welker & von D'ohren, 2006).

La probabilità che i cianopeptidi si trovino nell'ambiente dipende dalla presenza di cianobatteri possessori di geni per produzione di tossine e che questi geni siano effettivamente espressi. L'analisi del genotipo può rivelare cluster genici indicativi delle vie di sintesi metabolica per i cianopeptidi (Kurmayer, 2011).

La biosintesi dei cianopeptidi coinvolge complessi di sintesi peptidiche non-ribosomiche e sinteasi polichetide che possono essere conservate attraverso il genoma cianobatterico (Kurmayer *et al.*, 2011, 2015; Neilan *et al.*, 2013). Per esempio, il codice a grappolo biosintetico e le proteine multidominio necessarie per produrre le microcistine sono state identificate nei generi *Microcystis*, *Planktothrix*, *Nostoc* e *Dolichospermum* (*Anabaena*) (Christiansen *et al.*, 2003;

Kosol *et al.*, 2009; Kurmayer & Christiansen, 2009; Merel *et al.*, 2013; Rantala *et al.*, 2004; Rouhiainen *et al.*, 2004; *et al.*, 2010).

Geni della biosintesi per microcistine, anabaenopeptine, aeruginosine, microginine, microviridine e cianopeptoline sono stati identificati nei cianobatteri comuni *Planktothrix rubescens* e *P. agardhii* così come in *Microcystis species* (Kurmayer *et al.*, 2016; Otten *et al.*, 2017).

L'analisi chimica verifica che i cianobatteri possono effettivamente attivare la loro capacità genetica di biosintetizzare cianopeptidi in modo efficace durante gli eventi di fioritura.

Una varietà di cianopeptidi è stata spesso osservata nei laghi, nei fiumi, negli estuari e nei bacini idrici colpiti dai cianobatteri in tutto il mondo, compresi studi in Italia, Grecia, Polonia, Portogallo, Israele, Svizzera e Finlandia (Ferranti *et al.*, 2013; Gkelis *et al.*, 2015; Grabowska *et al.*, 2014; Lifshits & Carmeli, 2012; Lopes *et al.*, 2012; Rohrlack *et al.*, 2009).

La quantificazione dei cianopeptidi è un prerequisito fondamentale per caratterizzare le potenziali concentrazioni di esposizione nelle acque superficiali dove proliferano i cianobatteri.

La maggior parte degli studi, tuttavia, riporta solo informazioni qualitative come le frequenze di rilevamento di cianopeptidi, come accennato in precedenza. A oggi, ci sono solo pochi studi sulla quantificazione di concentrazioni assolute di cianopeptidi oltre le microcistine.

Uno studio recente ha quantificato tre cianopeptoline, una microginina, due anabaenopeptine e cinque microcistine in campioni provenienti da sei laghi eutrofici negli Stati Uniti (Beverdors *et al.*, 2017).

Un altro studio ha valutato le concentrazioni di cinque anabaenopeptine, una cianopeptolina e dieci microcistine in laghi europei che utilizzano standard analitici isolati da estratti di biomassa. Qui, tutti i cianopeptidi sono stati rivelati con una frequenza dell'87% per le microcistine, 90% per cianopeptoline e 100% per anabaenopeptine (Chorus *et al.*, 2006).

Lo studio sui laghi europei ha inoltre dimostrato che la produzione di un cianopeptide di una specie cianobatterica può variare in laghi diversi e solo per alcuni cianopeptidi è correlata con il biovolume dei cianobatteri (Chorus *et al.*, 2006).

Inoltre, un recente studio degli Stati Uniti sul Bacino dei Grandi Laghi dimostra che il carico totale di cianopeptoline e anabaenopeptine all'ingresso di impianti di trattamento dell'acqua potabile può essere comparabile alle microcistine ed è anche correlato con l'abbondanza di cianobatteri (conta cellulare, clorofilla a) e con le concentrazioni di carbonio organico (assorbimento UV, torbidità) (Beverdors *et al.*, 2018).

Tali valutazioni quantitative sono rare a causa della mancanza di standard di riferimento per la maggior parte dei cianopeptidi che consentono di convertire un segnale di un cianopeptide presente nel campione da strumenti analitici di spettrometria di massa. Attualmente gli standard di riferimento di undici microcistine – MC -LR, -RR, -YR, -LA (Microcistina LA contenente Leucina, Alanina), -LF (Microcistina LF contenente Leucina, Fenilalanina), -LW (Microcistina LW contenente Leucina, Triptofano), -WR (Microcistina contenente triptofano e Arginina), -D-Asp3-LR (Microcistina contenente acido D-eritro-β-metilaspatico in posizione 3 demetilato-Leucina, Arginina), -D-Asp3-RR (Microcistina contenente acido D-eritro-β-metilaspatico in posizione 3 demetilato-Arginina, Arginina), -HtyR (Microcistina contenente una Omotirosina, Hty, in posizione 2 e Arginina, R, in posizione 4), -HilR (Microcistina contenente una Omoisoleucina, Hil, in posizione 2 e Arginina, R, in posizione 4) – sono commercialmente disponibili e parzialmente inclusi nei metodi analitici standardizzati (ISO, 20179:2005, US EPA Metodo 544), che possono raggiungere sensibilità nella bassa gamma nanomolare (es. per cromatografia liquida e spettrometria di massa).

Considerando che altri cianopeptidi vengono prodotti in concentrazioni simili alle microcistine durante la fioritura cianobatterica, è necessario valutare il loro potenziale (eco)tossicologico di rischio.

Un effetto comune osservato per i cianopeptidi è l'inibizione degli enzimi. In particolare, l'inibizione delle proteasi è stata spesso evidenziata per cianopeptoline, anabaenopeptine, aeruginosine e microginine con potenza inibitoria (*Inhibitory Concentration 50%*, IC50) fino al range nanomolare, paragonabile alle concentrazioni osservate durante eventi di fioritura.

Per cianopeptoline, anabaenopeptine e aeruginosine è stata osservata l'inibizione delle proteasi delle serine umane coinvolte nella coagulazione del sangue, cioè fattore VIa/VIIa, trombina, plasmina e callicreina (Bonjouklian *et al.*, 1996; Gademann *et al.*, 2010; Hanessian *et al.*, 2006; Kodani *et al.*, 1999; Kohler *et al.*, 2014; Schreuder *et al.*, 2016) e l'inibizione dell'elastasi pancreatica e leucocitaria per cianopeptoline e anabaenopeptine (Bubik *et al.*, 2008; Sedmak *et al.*, 2008).

Ulteriori test con proteasi hanno dimostrato inibizione di carbossipeptidasi A, B e leucina aminopeptidasi coinvolti nel metabolismo alimentare per cianopeptoline, anabaenopeptine e microginine (Ishida *et al.*, 1997, 1998, 2000a; Itou *et al.*, 1999; Kodani *et al.*, 1999; Murakami *et al.*, 2000; Walther *et al.*, 2009), inibizione degli enzimi che convertono l'angiotensina coinvolti nella regolazione della pressione sanguigna per le microginine (Kodani *et al.*, 1999; Okino *et al.*, 1993), e l'inibizione dell'attività di tripsina e chimotripsina per cianopeptoline e aeruginosine (Banker & Carmeli, 1999; Bister *et al.*, 2004; Bonjouklian *et al.*, 1996; Gademann *et al.*, 2010; Hanessian *et al.*, 2006; Kodani *et al.*, 1999; Kohler *et al.*, 2014; Raveh & Carmeli, 2009; Reshef & Carmeli, 2001; Sano & Kaya, 1995; Von Elert *et al.*, 2005).

È stato anche osservato che le microginine inibiscono la proteinfosfatasi tirosina di *Mycobacterium tuberculosis* (Muller *et al.*, 2006) e l'aerucyclamide ha mostrato attività contro cellule leucemiche e parassiti umani (Ishida *et al.*, 2000b; Portmann *et al.*, 2008b).

I cianopeptidi mostrano anche attività antimicrobiche, antifungine e antimicobatteriche come di recente riportato in letteratura (Swain *et al.*, 2017).

Un'altro effetto osservato comunemente è la tossicità contro il crostaceo pascolatore *Thamnocephalus platyurus* segnalata per microcistine, cianopeptoline, aeruginosine, microginine e aerucyclamidi, con valori LC50 nel range micromolare (mg/L) (Blom *et al.*, 2001, 2003; Bober & Bialczyk, 2017; Gademann *et al.*, 2010; Kohler *et al.*, 2014; Portmann *et al.*, 2008a, 2008b). Mentre le concentrazioni osservate nell'acqua di lago sono di un ordine di grandezza inferiore, dovrebbe essere osservata una concentrazione di esposizione molto più elevata in organismi che si nutrono direttamente di cellule cianobatteriche per ingestione di biomassa.

L'ipotesi che i cianobatteri producano queste molecole complesse per difendersi dai predatori è in linea con la tossicità osservata nei pascolatori.

Cianopeptidi sono stati rilevati nel tessuto di pesci esposti, rane, lumache e cozze, ma la tossicocinetica della distribuzione interna e bioaccumulo non è stata completamente compresa (Gkelis *et al.*, 2006).

Alcuni studi tossicologici sulle microcistine offrono spunti riguardo alla potenziale tossicità degli altri cianopeptidi, nei casi in cui si osservino effetti tossici che superino quelli attesi per le sole microcistine o in casi in cui i sintomi non possano essere associati con le microcistine.

Un esempio è il caso dell'esposizione umana a cianotossine tramite attività ricreative, in cui lo sviluppo del malessere veniva correlato con il numero di cianobatteri, ma alcuni sintomi come vomito, diarrea, e sintomi influenzali non potevano essere associati direttamente alla presenza di tossine epatotossiche note (microcistine) o a neurotossine (saxitossina e anatoxina) (Berg *et al.*, 2011; Pilotto *et al.*, 1997).

Ulteriori studi hanno spesso osservato che gli estratti dai mutanti *knock-out* dei geni della microcistina hanno anche causato effetti negativi sugli organismi acquatici e sulle linee cellulari (Baumann & Juttner, 2008; Best *et al.*, 2001; Dao *et al.*, 2013; Fastner *et al.*, 2003; Hulot *et al.*, 2012; Keil *et al.*, 2002; Liang *et al.*, 2017; Smutna *et al.*, 2014).

Ad esempio, la formazione di edema e code piegate nelle larve di pesce zebra e la disregolazione nei pesci sono state osservate anche dopo l'esposizione a estratti di cianobatteri che non producono microcistina (Keil *et al.*, 2002; Le Manach *et al.*, 2016). Informazioni sulla tossicità di altri cianopeptidi (criptoficine, tolitossine, scitoficine e microviridine) possono essere trovate in Chlipala *et al.*, 2011.

1.6. Presenza di microcistine nei pesci

La letteratura riguardante la tossicità delle microcistine per la fauna ittica e per lo zooplancton è veramente estesa.

Durante le fioriture le microcistine possono essere accumulate in crostacei dello zooplancton (*Daphnia parvula*, 1,78 µg di tossine/25 dafnidi) (Mohamed, 2001), in molluschi d'acqua dolce (*Anodonta wodiana*, *Unio douglasia* e *Cristaria plicata*, 1-5 µg/mollusco) (Watanabe *et al.*, 1997), e in molluschi marini allevati alla foce di fiumi eutrofizzati (*Mitilus galloprovincialis*, fino a 10,5 µg di microcistina/g di mollusco) (Vasconcelos, 1995). Il tempo di depurazione per questi è attestato intorno a undici giorni, con la tossina localizzata primariamente nel tratto digestivo.

Le microcistine influenzano lo sviluppo e la vitalità degli stadi giovanili nei crostacei zooplanctonici e nei pesci, e sono direttamente tossiche negli stadi adulti dei pesci tramite intossicazione epatica e danneggiamento dei meccanismi di trasporto delle cellule branchiali, in particolare le pompe di membrana Na^+/K^+ e $\text{Mg}^{2+}/\text{HCO}_3^-$ (pompe ioniche sodio/potassio e magnesio/idrogenocarbonato). Quest'ultimo dato, confermato sia per le carpe (*Ciprinus carpio*) (Zambrano & Canelo, 1996) che per la tilapia (*Oreochromis mossambicus*) (Bury *et al.*, 1996) porta come conseguenza la morte non solo per intossicazione epatica, ma anche per asfissia da distruzione del tessuto respiratorio branchiale.

Morie di pesci causate direttamente da esposizione a microcistine sono state documentate un po' ovunque (Jewel *et al.*, 2003); tra le ultime di notevole entità quelle dei salmoni (*Salmo salar*) allevati in Norvegia (malattia dei netpens) (Williams *et al.*, 1997), dei pescigatto (*Ictalurus punctatus*) allevati negli USA (Zimba *et al.*, 2001) e dei gamberi bianchi (Zimba *et al.*, 2006). Gli studi sulle contaminazioni ittiche hanno mostrato sensibilità specie-specifiche alle microcistine; l'assunzione di queste cianotossine nei pesci è causata primariamente dall'ingestione orale, e in modo minore dall'assorbimento attraverso l'epitelio branchiale (Ernst *et al.*, 2006).

Le microcistine possono concentrarsi in diversi tessuti ittici (Xie *et al.*, 2005): patologie epatiche, renali e branchiali sono presenti in pesci esposti alle cianotossine, per la specifica inibizione delle proteinfosfatasi e per altri effetti a cascata, come l'aumento dei valori epatoenzimatici nel siero. Diminuzioni nello sviluppo dei giovani pesci (Malbrouck & Kestermont, 2006) e mutamenti comportamentali (Baganz *et al.*, 2004) sono stati osservati dopo immersione dei pesci in acqua contenente microcistine, quest'ultimo effetto probabilmente a causa della abilità di queste tossine di attraversare la barriera ematoencefalica, trasportate da polipeptidi che trasportano anioni (Fischer *et al.*, 2005; Cazenave *et al.*, 2006).

La tossicità delle microcistine nei pesci dipende dall'equilibrio tra accumulo e metabolismo (Ito *et al.*, 2002), e le sensibilità specie-specifiche osservate sono state interpretate come il risultato di differenze anatomiche, fisiologiche e comportamentali tra i vari ordini ittici (Tencalla & Dietrich, 1997; Fischer & Dietrich, 2000); anche le capacità di disintossicazione per la via della glutatione-S-transferasi sono specie-specifiche (Cazenave *et al.*, 2006).

Nei pesci le microcistine vengono concentrate negli organi, primo tra tutti il fegato, e in misura minore nei tessuti muscolare e neuronale.

In passato il rischio dei consumatori umani di pesce eviscerato era tradizionalmente considerato basso, perchè si pensava che le microcistine si accumulassero principalmente nel fegato dei pesci.

Tuttavia nel corso degli anni gli studi hanno rivelato concentrazioni di microcistine fino a 337,3 µg/kg (*Tilapia rendalli*, Magalhaes *et al.*, 2001), 102 µg/kg (*Oreochromis niloticus*, Mohamed *et al.*, 2003), 96,5 µg/kg (*Hypophthalmichthys molitrix*, Chen *et al.*, 2006) e 28 µg/kg (*Oncorhynchus mykiss*, Wood *et al.*, 2006) nel tessuto muscolare di pesce selvatico o allevato, indicando che anche il consumo del muscolo ittico poteva arrivare a costituire una minaccia per la salute umana.

Va notato che l'Organizzazione Mondiale della Sanità (World Health Organization, WHO) ha raccomandato un TDI (*Tolerable Daily Intake*, assunzione giornaliera tollerabile dal complesso di tutte le matrici contaminate) di 0,04 µg/kg di peso corporeo/giorno, evidenziando che anche il consumo di muscolo di pesce potrebbe rappresentare una minaccia per salute umana.

1.7. Cianotossine nei mitili

La possibilità che le microcistine si accumulino in mitili selvatici di acqua dolce è ampiamente documentata (Prepas *et al.*, 1997; Watanabe *et al.*, 1997; Vanderploeg *et al.*, 2001; Yokoyama & Park, 2002; Chen & Xie 2005; Peng *et al.*, 2010). Numerosi studi hanno dimostrato la presenza di microcistine in acque di estuari eutrofizzati e in fiumi provenienti da laghi eutrofici (Vasconcelos 1995; Miller *et al.*, 2010).

Sono stati ipotizzati rischi di contaminazione di cozze marine selvatiche, ma gli studi di laboratorio sono stati eseguiti solo su modelli di bioaccumulo nei mitili comuni come *Mytilus galloprovincialis* (Lindholm *et al.*, 1999, Eriksson, *et al.*, 1989, Yokoyama *et al.*, 2003).

I metaboliti presenti nelle cellule cianobatteriche tossiche possono ridurre l'attività di disintossicazione della glutatione-S-transferasi (GST) nel mitile *Mytilus galloprovincialis* durante l'accumulo; come conseguenza, le tossine possono essere individuate nelle cozze subito dopo la contaminazione, anche dopo un giorno dall'inizio dell'assunzione cellulare.

L'attività di GST aumenta nel periodo di depurazione, quando il contatto con i cianobatteri viene depresso, causando un aumento periodico (ogni 4 giorni) dei livelli di microcistina nei tessuti, dovuto al rinnovo delle PPasi e al successivo rilascio di tossine non legate (Fernandes, 2009). Nonostante l'inibizione iniziale della GST, che avrebbe potuto essere sviluppata da cianobatteri tossici per causare la morte del predatore dovuta all'accumulo rapido ed elevato di tossine, la fisiologia di *Mytilus galloprovincialis* sembra abbastanza resistente alla contaminazione da microcistina, con bassa o nessuna mortalità osservata negli esperimenti di laboratorio (Vasconcelos, 1995; Amorim *et al.*, 1999).

La resistenza potrebbe essere dovuta alla capacità dell'organismo di rilevare ed eliminare le cellule tossiche cianobatteriche attraverso i palpi buccali, tentacoli sensoriali e fotorecettori, che intrappolano il cibo sospeso dirigendone il flusso verso la bocca (Vasconcelos *et al.*, 2007). Negli stessi esperimenti, le cozze hanno mostrato un periodo di depurazione piuttosto lungo, che va da 11 a 14 giorni, che potrebbe causare il trasferimento lungo la catena alimentare (Vasconcelos, 1995).

È noto il verificarsi di fioriture tossiche d'acqua dolce nei fiumi eutrofici, negli estuari e nei porti (Teixeira *et al.*, 1993; Freitas de Magalhães, 2001; Vasconcelos, 1994). I conseguenti rischi di contaminazione della fauna marina (pesci, gamberi e molluschi) sono stati ipotizzati e studiati in esperimenti di laboratorio (Watanabe *et al.*, 1997; Miller *et al.*, 2010; Amorim *et al.*, 1999).

Nel 2010 sono state trovate morte diverse lontre di mare, specie protette di mammiferi marini, a causa dell'intossicazione da microcistine nella baia di Monterey (Miller *et al.*, 2010).

Queste morti erano probabilmente dovute all'assunzione di prede (molluschi e gamberi) contaminate da fioriture tossiche, scaricate nell'oceano da tre fiumi ricchi di nutrienti, affluenti di laghi californiani eutrofizzati. Sfortunatamente, le prede selvagge delle lontre non erano disponibili per il campionamento e l'analisi della contaminazione da microcistine in quel caso. Pertanto, non è stato possibile stabilire alcuna relazione diretta tra fioriture di cianobatteri e intossicazioni della fauna marina. Un recente studio sul *Mytilus galloprovincialis* selvatico del Golfo di *Amvrakikos* (Grecia) ha mostrato l'accumulo di microcistina, a causa di fioriture tossiche locali delle specie cosmopolite eurialine *Synechococcus species* e *Synechocystis species* (Vareli *et al.*, 2012).

In un lavoro, lo stesso autore fa riferimento a una possibile contaminazione dell'allevamento di cozze, a causa del rilascio nell'oceano di microcistine prodotte nei laghi e in bacini artificiali. Sono stati denunciati casi sospetti anche nel Pacifico nord-occidentale e nella costa est del Canada (Vareli *et al.*, 2013).

Nel 2013 in America, nello stato di Washington, sono stati studiati quattro laghi eutrofizzati della zona dello stretto di Puget, complesso sistema a estuario di vie fluviali interconnesse e darsene, per valutare sia il trasporto di tossine nelle acque marine che il suo potenziale accumulo nei molluschi marini, in particolare le cozze. I letti di molluschi sono estesi in tutto lo stretto di Puget, e la raccolta ricreativa si verifica a valle dei laghi di studio: il lavoro si prefiggeva di valutare se il consumo di molluschi rappresentasse un rischio per la salute umana per l'esposizione alle MC. Il lavoro ha confermato il trasferimento di acqua dolce contaminata da microcistine verso l'acqua marina dello stretto di Puget, con successivo bioaccumulo di MC nelle cozze.

L'analisi ELISA ha stimato il livello massimo di concentrazione di MC nei laghi di origine in 2700 µg/L, fino a 0,34 µg/L nelle acque marine e 6,5 µg/kg nelle cozze. Le analisi di conferma in LC-MS/MS (*Liquid Chromatography with tandem Mass Spectrometry*) su campioni di acqua e di mitili hanno identificato (MC-LA, microcistina contenente gli aminoacidi Leucina ed Alanina) come tossina principale. Anche se sono stati riscontrati livelli di MC relativamente bassi nelle cozze, lo studio evidenzia che la potenziale preoccupazione per la sicurezza alimentare umana è giustificata e richiede ulteriori indagini (Preece *et al.*, 2015).

2. METODI DI ANALISI

La contaminazione da microcistine nei tessuti dei pesci è una rilevazione recente nei laghi italiani e il suo monitoraggio richiede tecniche di analisi veloci e precise, facili da applicare e capaci di fornire risultati in tempo reale. L'analisi chimica strumentale viene per lo più usata in senso confermativo e identificativo delle diverse varianti di microcistine.

Data la percentuale maggioritaria di tossine combinate direttamente alle cellule nei tessuti (in larga parte invisibili ai metodi strumentali) rispetto a quelle libere, e la necessità di usare i vari standard per il riconoscimento dei singoli composti, l'uso contemporaneo dell'analisi ELISA garantisce una rapida misurazione quantitativa del totale delle MC presenti, vantaggiosa dal punto di vista della valutazione del rischio. Gli studi effettuati sui laghi italiani hanno mostrato che i risultati dei test ELISA davano concentrazioni di MC da 3 a 8 volte superiori alla concentrazione calcolata dalle analisi LC-MS/MS (Bruno *et al.*, 2009).

2.1. Estrazione clorofilla *a* da acqua

La clorofilla è una molecola costituita da un anello porfirinico i cui quattro atomi centrali di azoto sono coordinati con uno ione Mg^{2+} centrale e una lunga catena idrocarburica laterale di fitolo. Essa ha la funzione di accettore di elettroni durante l'eccitazione provocata dai fotoni e consente quindi l'inizio della sintesi fotochimica che permetterà alle piante e alle alghe di avere un metabolismo di tipo autotrofo. Con la determinazione della clorofilla *a* presente in un campione prelevato è possibile valutare la quantità complessiva delle alghe che compongono il fitoplancton in sospensione. Dopo aver concentrato le cellule fitoplanctoniche su un filtro tramite filtrazioni di almeno 250 mL di campione, la clorofilla *a* viene estratta in soluzione acquosa di acetone al 90% e la sua determinazione viene effettuata mediante spettrofotometria, avvalendosi della capacità di tale pigmento di assorbire nelle lunghezze d'onda dello spettro visibile corrispondenti al rosso. Il picco di assorbimento della clorofilla *a*, infatti, cade tra 0,5 e 2,0 μm : 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) come indicato in Strickland & Parsons (1997) (Rapporto ISTISAN 00/14 Pt.2):

$$\mu g/L = [11,64 (A_{663} - A_{750}) - 2,16 (A_{645} - A_{750}) - 0,10 (A_{663} - A_{750})] Ve/Vf$$

dove: V_e = volume (mL) dell'estratto

V_f = volume (mL) del filtrato

2.2. Sedimentazione e conta delle cellule

I campioni vengono posti a sedimentare in appositi pozzetti di plexiglass con fondo trasparente e capacità di 25 mL per un periodo di 24-48 ore, poi esaminati all'invertoscopio. Le tecniche di conta algale usate sono quella per striscia 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:

$$C \times At/L \times W \times S \times V = N^{\circ}/mL$$

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 sovrappontenti fino a contare 100 unità della specie dominante. Il calcolo si esegue mediante la formula:

$$C \times At/Af \times F \times V = N^{\circ}/mL$$

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

2.3. Estrazione tossine da acqua

I campioni di acqua vengono estratti come segue: aliquote di fitoplancton fresco (10-130 mg) ottenute mediante centrifugazione di campioni di acqua, vengono sospese in 1 mL di acqua bidistillata sterile. La soluzione viene agitata, sonicata 5 minuti, a 30-40°C in un bagno a ultrasuoni (con agitazione per 20 secondi su vortex a metà del tempo), quindi centrifugata per 10 min a 11.000 r.p.m. (Beckman L5-55 Ultracentrifuge) per eliminare i residui. Il surnatante viene raccolto, il pellet viene nuovamente sospeso e l'intero processo viene ripetuto due volte. I due surnatanti sono uniti e analizzati per le microcistine intracellulari (Bruno *et al.*, 2009).

2.4. Estrazione di microcistine da tessuti ittici

Circa 5 g di tessuto vengono omogeneizzati per 15 secondi con 10 mL di metanolo (MeOH) al 100% (purezza per HPLC) e centrifugati a 5000 × g per 5 minuti. L'estrazione viene ripetuta sul pellet e i surnatanti raccolti vengono quindi filtrati su filtri di carta, i filtrati raggruppati e portati a un volume di 25 mL con MeOH al 100%; 5 mL del volume ottenuto vengono diluiti con 5 mL di acqua distillata e caricati su una cartuccia WatersTM Oasis HLB 1 cc Vac Cartridge preconditionata con 20 mL di MeOH al 100% seguiti da 20 mL di acqua distillata. La colonna viene lavata con 30 mL di acqua distillata e quindi 30 mL di MeOH al 20%. Le microcistine vengono poi eluite con 50 mL di MeOH al 100%. La frazione MeOH al 100% viene essiccata e quindi disciolta in acqua (2 mL). Questa sospensione viene conservata a -30°C per successive analisi di microcistine (MC) (Bruno *et al.*, 2012).

2.5. Estrazione di cilindropermopsine da tessuti ittici

Circa 5 g di tessuto vengono omogeneizzati in 10 mL 100% MeOH per 15 min, poi sonicati 5 min a 30-40°C in un bagno ultrasonico (a 25 kHz) a temperatura ambiente, per rompere le cellule. L'omogenato viene quindi centrifugato per 5 min a 5000 × g e il surnatante decantato e filtrato. L'estrazione viene ripetuta sul pellet, il campione viene centrifugato e il supernatante filtrato sullo

stesso filtro precedentemente utilizzato. Il filtro e l'imbuto vengono lavati tre volte con piccoli volumi di MeOH; i due estratti e i lavaggi vengono raccolti insieme, quindi essiccati con Rotavapor a 40°C; il residuo risospeso in 2 mL di acqua distillata viene poi conservato a -30°C fino all'analisi.

2.6. Estrazione di BMAA da tessuti ittici

Circa 5 g di tessuto muscolare vengono omogeneizzati per 15 min e poi liofilizzati. Il liofilizzato viene polverizzato e un'aliquota di 100 mg viene posta in una fiala di polipropilene con 3 mL di acido tricloroacetico 0,1 N (TCA), dispersa con agitazione su Vortex ed estratta su un mescolatore a rulli per 1,5 h. Dopo centrifugazione per 10 minuti a $3500 \times g$, il supernatante viene trasferito in provette filtranti (PVDF filter, 5 μm) e ulteriormente centrifugato per 10 minuti a 3500 g. Il supernatante viene poi purificato utilizzando cartucce a scambio cationico (Oasis-MCX, 6 cc, Waters) precedentemente condizionate e attivate con 5 mL di metanolo seguiti da 5 mL di acqua distillata; dopo il caricamento del campione la cartuccia viene lavata con 5 mL di acido cloridrico 0,1 N; la tossina viene eluita con 4 mL di soluzione di idrossido di ammonio al 2% in metanolo/acqua (75/25, v/v). La soluzione eluita viene poi essiccata a 50°C sotto una leggera corrente di azoto e il residuo disciolto in 5 mL di acqua distillata per l'esame ELISA.

2.7. Analisi con anticorpi monoclonali

2.7.1. Analisi di microcistine

Il test anti-ADDA (ABRAXIS, USA) è un ELISA competitivo indiretto per la rivelazione indipendente di congeneri di microcistine e nodularine. Si basa sul riconoscimento di microcistine, nodularine e loro congeneri per specifici anticorpi. La tossina, se presente in un campione, e un analogo del peptide microcistina immobilizzato sulla piastra, competono per i siti di legame degli anticorpi anti-microcistine/nodularine in soluzione. La piastra viene quindi lavata e viene aggiunto un secondo anticorpo-HRP (*Horseradish Peroxidase*, enzima perossidasi di rafano).

Dopo una seconda fase di lavaggio e aggiunta del substrato, nella soluzione viene generata una colorazione blu. L'intensità del colore è inversamente proporzionale alla concentrazione di microcistine presenti nel campione. La reazione colorimetrica viene interrotta dopo un tempo specifico e l'intensità del colore viene misurata utilizzando un lettore spettrofotometrico ELISA. Le concentrazioni dei campioni sono determinate da un'interpolazione usando la curva standard costruita con ogni lettura. Il test non distingue tra Microcistina-LR e altre varianti di microcistine, ma rileva la loro presenza globale. Il limite di rivelazione (*Limit of Detection*, LOD) per questo test, basato su MC-LR, è di 0,10 ppb ($\mu\text{g/L}$). I coefficienti di variazione (CV%) per gli standard sono inferiori al 10%; per i campioni inferiori al 15%.

2.7.2. Analisi di cilindrospermopsine

Campioni di acqua, estratti di cellule cianobatteriche ed estratti di tessuto vengono analizzati utilizzando l'ELISA Abraxis per cilindrospermopsine (Abraxis Bioscience CA), seguendo le istruzioni del produttore e utilizzando le concentrazioni di taratura suggerite. L'immunodosaggio ELISA di Abraxis dichiara come limite di rivelazione (*Limit of detection*, LOD) 0,04 ng/mL, con

coefficiente di variazione percentuale (CV%) inferiore al 10% per lo standard e inferiore al 15% per i campioni.

2.7.3. Analisi di BMAA

Il test attualmente disponibile (ABRAXIS, USA) è un test ELISA competitivo diretto basato sul riconoscimento della BMAA da parte di anticorpi specifici. BMAA, se presente in un campione, e un analogo BMAA-HRP competono per i siti di legame degli anticorpi anti-BMAA di coniglio in soluzione. Gli anticorpi BMAA sono poi legati da un secondo anticorpo immobilizzato sui pozzetti della piastra di microtitolazione. Dopo una fase di lavaggio e l'aggiunta della soluzione di substrato, viene generato un segnale di colore. L'intensità del colore blu è inversamente proporzionale alla concentrazione di BMAA presente nel campione. La reazione del colore viene fermata dopo un tempo specificato e il colore viene valutato utilizzando un lettore di micropiastre ELISA. Le concentrazioni dei campioni sono determinate per interpolazione utilizzando la curva standard costruita con ciascuna prova. Il LOD per questo test, basato su MC-LR, è di 4 µg/L. I coefficienti di variazione (CV%) per gli standard sono inferiori al 10%; per i campioni inferiori al 15%.

2.8. Analisi chimica strumentale di microcistine

Lo screening qualitativo rapido e l'identificazione accurata basata sulla massa esatta delle biotossine dei cianobatteri possono essere facilmente garantiti dal *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry* (MALDI-ToF/MS), che si estende su un ampio intervallo di massa molecolare, ideale per mostrare i segnali degli ioni molecolari dei composti nel campione. Tuttavia, l'accurata caratterizzazione della struttura di tutti i composti può essere ottenuta solo studiando i peculiari schemi di frammentazione mediante LC-Q-ToF-MS/MS (*Qualitative Tandem Liquid Chromatography Quadrupole Time Of Flight Mass Spectrometry*). È un dato di fatto che questo rivelatore di spettrometria di massa ibrido, composto da un quadrupolo (Q) e un analizzatore (ToF), è risultato altamente sensibile, selettivo e ripetibile nel misurare gli ioni caratteristici di ciascuna cianotossina studiata; questa tecnica è stata impiegata con successo nel confermare le tossine note, nonché nel chiarire la struttura molecolare di numerosi nuovi composti mai descritti in precedenza.

D'altra parte l'analisi LC-MS/MS che usa trappola ionica (*Ion Trap*) e il triplo quadrupolo LC-MS/MS offrono alta ripetibilità e sensibilità per identificare composti noti mirati, come alcune microcistine, ma potrebbero non riuscire a rivelare la presenza di derivati strutturali modificati o molecole meno abbondanti. Di conseguenza è degno di nota al giorno d'oggi il fatto che i rivelatori ibridi di massa (MS) che forniscono dettagli completi sulla struttura molecolare di molte diverse biotossine rappresentano l'approccio più moderno per "profilare" i livelli di contaminazione e valutare il rischio derivante per i consumatori, sia attraverso le acque dolci che attraverso gli alimenti. Per quanto riguarda l'analisi di conferma mediante tecniche di spettrometria di massa, è noto che il MALDI-ToF/MS è in grado di rivelare tutti i composti presenti nel campione, entro un ampio intervallo di rapporto massa-carica.

Le accurate misurazioni della massa sono utili per identificare la sostanza. Di solito, questa tecnica è meno sensibile e ripetibile rispetto al triplo quadrupolo e alla trappola ionica LC-MS, pertanto non è la scelta migliore per l'analisi quantitativa. Al contrario, il MALDI-ToF/MS è un potente strumento per lo screening rapido su un ampio intervallo di massa, consentendo la rivelazione simultanea di cianotossine da diversi gruppi in un singolo esperimento.

Il rivelatore di spettrometria di massa Q-ToF è altamente sensibile e ripetibile; il basso valore dei limiti di quantificazione (LOQ) che può raggiungere spiega la potenza di questo strumento analitico nell'identificare anche la contaminazione precoce delle microcistine nel tessuto del pesce.

Naturalmente, il rivelatore di spettrometria di massa Q-ToF può essere utilizzato anche per lo screening ad ampia gamma di massa del composto nel campione, sebbene venga applicato un meccanismo diverso per la ionizzazione del campione rispetto allo strumento MALDI-ToF/MS. È interessante notare che l'analisi LC/ESI-Q-ToF-MS/MS (*Liquid Chromatography Electrospray Ionization Quadrupole Time-Of-Flight Mass Spectrometry*) è stata applicata con successo per chiarire la struttura molecolare di una nuova microcistina dalla *Planktothrix rubescens* che fiorisce nel lago di Averno vicino Napoli, Italia meridionale (Ferranti *et al.*, 2008).

Infatti, la possibilità di ottenere modelli di frammentazione e di misurare con alta risoluzione la massa di ioni prodotto, consente di studiare la struttura molecolare di composti sconosciuti, anche quando sono presenti modificazioni non comuni dello scheletro e/o aminoacidi variabili.

2.8.1. Analisi in triplo quadrupolo LC-MS/MS

200 µl dell'estratto vengono filtrati attraverso un filtro di cellulosa rigenerato (0,2 µm di dimensione dei pori, 25 mm di diametro) e iniettati nel sistema LC-MS. Il cromatografo liquido è costituito da un sistema di pompa, un circuito di iniezione da 200 µl e una pre-colonna Alltima HP 5 µm C-18 (7,5 x 4,6 mm id) e colonna analitica (250 mm x 4,6 mm id) termostata a 35°C e interfacciata a uno spettrometro di massa a triplo quadrupolo da banco.

Il componente A della fase mobile è aceto nitrile contenente acido formico 10 mM e il componente B acido formico acquoso 10 mM. Il flusso è 1,0 mL/min, il profilo del gradiente di fase mobile è il seguente (t in minuti): t₀, A) 0%; t₅, A) 0%; t₆, A) 35%; t₁₁, A) 45%; t₁₂, A) 57%; t₁₇, A) 67%; t₁₈, A) 100%; t₂₀, A) 100%; t₂₁, 0%; t₃₀, A) 0%.

Una valvola deviatrice porta 400 µL/min dell'effluente della colonna LC nella sorgente di ioni operata in modalità PI solo tra 10 e 22 minuti della corsa cromatografica. Azoto di elevata purezza viene usato come gas di desolvatazione e di cortina; argon di elevata purezza viene usato come gas di collisione. Il gas del nebulizzatore è fissato a 650 L/h, mentre il gas del cono è impostato a 50 L/h; le temperature della sonda e della desolvatazione vengono mantenute, rispettivamente, a 100 e 350°C. L'impostazione della pressione del gas nella cella di collisione è di 3 mTorr.

La tensione capillare è di 3000 V e la tensione dell'estrattore di 0 V. Il potenziale di declusterizzazione, l'energia di collisione e altri parametri di trasmissione vengono ottimizzati per ciascun analita. La taratura dell'asse di massa di ciascun quadrupolo Q1 e Q3 a risoluzione di massa viene eseguita mediante infusione di una soluzione di sodio e ioduro di cesio a 10 µL/min

La risoluzione di massa unitaria è stabilita e mantenuta in ciascun quadrupolo di risoluzione di massa mantenendo una larghezza intera a metà picco di massimo ~ 0,7 amu.

Tutti i parametri della sorgente e dello strumento per il monitoraggio delle cianotossine vengono ottimizzati con soluzioni standard di 5 µg/mL infuse a 10 µL/min da una pompa a siringa.

La modalità di monitoraggio delle reazioni multiple (MRM) viene utilizzata per la quantificazione e identificazione selezionando almeno due reazioni di frammentazione per ciascun analita per il sistema di gestione dei dati di spettrometria di massa.

I limiti (ng/g) di rivelazione (LOD) per le microcistine sono: per -RR 1,6, per -YR 2,1, per -LR 2,3, per -LA 1,9, per -LW 1,7. I limiti di quantificazione (LOQ), rispettivamente: 1,6; 3,9; 4,0; 3,1 e 3,8 ng/g.

2.8.2. Analisi Ion Trap LC/ESI-MS/MS

Le analisi utilizzano un sistema *Thermo Fisher* LC/ESI-MS, dotato di pompa P2000, degassatore SCM 1000, autocampionatore AS1000 e spettrometro di massa trappola ionica LCQ Advantage con una sorgente ionica a elettrospray (ESI).

Viene eseguita la separazione cromatografica iniettando un volume di campione di 50 µl su colonna Synergi Max RP 80 Å in acciaio 250×3,0 mm con particelle da 4 µm a un flusso di 0,3 mL/min, usando 0,05% TFA (*TriFluorAcetic Acid*, acido trifluoroacetico) in acqua come fase mobile A e 0,05% di TFA in ACetoNitrile (ACN) come fase mobile B.

La cromatografia viene effettuata mediante gradiente lineare a temperatura ambiente, secondo il seguente programma: 2 minuti al 30% B, quindi dal 30% B alla volta dal 2 al 100% B in 16 minuti, trattenendo per 8 minuti, infine al 30% B in 3 minuti; il tempo di equilibrio tra le corse è di 12 min

Lo spettrometro di massa viene periodicamente tarato con soluzioni standard di Ultramark, caffeina e peptide Met-Arg-Phe-Ala. Gli spettri di massa vengono acquisiti nella modalità a ionizzazione positiva per MC-RR e MC-LR e nella modalità a ioni negativi per MC-LW e MC-LF. I parametri dello spettrometro vengono ottimizzati eseguendo il tune per lo ione $[M + H]^+$ di MC-RR, a m/z 1038,5, e lo ione $[M + H]^+$ di MC-LW, a m/z 1023,5. Il tune è eseguito alla velocità di flusso LC 0,3 mL/min

Vengono impostati i seguenti parametri sperimentali LC/ESI-MS/MS: temperatura capillare 300°C, tensione di spray 4,5 kV, numero microscan 3, tempo massimo di iniezione 200 ms. Altre condizioni sperimentali (energia di collisione, larghezza di isolamento) sono ottimizzate per ciascun composto; i cromatogrammi SRM (*Selected Reaction Monitoring*) vengono registrati selezionando almeno 2 ioni diagnostici per ciascuna microcistina. L'analisi LC/ESI-MS/MS viene eseguita monitorando i segnali dello ione precursore → transizioni ioniche del prodotto (monitoraggio della reazione selezionato, modalità SRM) dal set di dati LC/ESI-MS/MS di ciascuna MC; per migliorare la specificità del metodo, si introducono eventi MS3 sia per MC-LW che MC-LF, oltre agli eventi SRM per l'analisi MS/MS.

I cromatogrammi ottenuti estraendo i segnali ione precursore → segnale di transizione ionica del prodotto principale (SRM) dal set di dati LC/ESI-MS/MS vengono integrati per calcolare le curve di taratura. Le curve di taratura per la linearità del metodo di prova nel solvente vengono calcolate mediante regressione lineare, utilizzando soluzioni standard in metanolo nell'intervallo 10-75 ng/mL.

2.8.3. Analisi MALDI-ToF/MS

Gli esperimenti di spettrometria di massa vengono condotti da uno spettrometro di massa a tempo di volo dotato di un laser (337 nm, larghezza dell'impulso 3 ns). L'acido α -ciano-4-idrossicinnamico viene usato come matrice di dispersione del campione per l'iniezione.

Il campione (1 µL da una soluzione in acqua) viene caricato sul bersaglio ed essiccato. Successivamente, viene aggiunto 1 µL di una miscela composta da 10 mg/mL di acido α -ciano-4-idrossicinnamico in 0,1% TFA in H₂O/acetonitrile (1/1, v/v).

Per ogni campione, l'acquisizione dello spettro di massa è eseguita in modalità lineare o riflettore positiva accumulando 200 impulsi laser. La tensione di accelerazione è di 20 kV. La taratura della massa esterna viene eseguita con standard di peptidi a bassa massa.

Lo spettrometro di massa è tarato nell'intervallo di massa 500-2500 m/z utilizzando 1 µL di miscela peptidica standard a bassa massa; viene calcolata una risoluzione di 100.000.

2.8.4. Analisi LC/ESI-Q-TOF/MS-MS

Le analisi LC/ESI-Q-ToF-MS/MS vengono eseguite con uno spettrometro di massa ibrido quadrupolo-tempo di volo (Q-ToF), dotato di una sorgente ionica a elettrospray (ESI, *Electrospray Ion Source*) funzionante nella modalità a ioni positivi e un modello di sistema di pompa ad alta pressione nanoflow Cap LC.

I campioni (1 μL) vengono caricati nel sistema cromatografico che utilizza una colonna trappola 300 SB C18 5 mm \times 100 μm i.d. e le MC vengono separate con una colonna capillare C18 diametro di 15 cm \times 100 μm i.d. al flusso di 1 $\mu\text{L}/\text{min}$, utilizzando TFA acquoso allo 0,1% (fase mobile A) e TFA allo 0,1% in acetonitrile acquoso all'84% (fase mobile B).

La cromatografia viene eseguita mediante gradiente lineare a temperatura ambiente, secondo il seguente programma: dallo 0% B al tempo dallo 0 al 60% B in 40 minuti, quindi al 90% B in 5 minuti, infine allo 0% B in 5 minuti; il tempo di equilibrio tra le analisi è di 5 minuti.

L'analisi LC-MS viene eseguita operando sia in modalità MS (continua) sia in modalità MS/MS per l'acquisizione dipendente dai dati (*Data Dependent Acquisition*, DDA) degli spettri di frammentazione di ogni microcistina. Gli spettri vengono acquisiti alla velocità di 1 scansione/sec.

Le condizioni della sorgente sono: tensione capillare: 3000 V; tensione del cono: 100 V; Estrattore: 0 V; obiettivo RF: 60. La taratura dello spettrometro di massa viene effettuata sulla base degli ioni multipli caricati dal fibrinopeptide-Glu introdotti separatamente.

2.9. Analisi chimica strumentale di cilindrospermopsine

2.9.1. Analisi in triplo quadrupolo LC-MS/MS

I campioni vengono analizzati per determinare la concentrazione di CYN mediante analisi LC-MS/MS in triplo quadrupolo, secondo le raccomandazioni di Spoof *et al.*, (2006).

La quantificazione di CYN viene eseguita per interpolazione della curva di taratura standard esterna, calcolata sulla base del rapporto tra le aree di picco dell'analita e l'1,9-diaminononano utilizzato come standard interno. La quantificazione di CYN nei campioni viene eseguita aggiungendo con 15 μL di soluzione standard interna 0,5 mL di estratto e iniettando direttamente nell'apparato LC-MS/MS, dotato di un loop di iniezione da 500 μL , una pre-colonna C-18 HP 5- μm (7,5 \times 4,6 mm i.d.) e una colonna analitica C-18 HP 5- μm (250 mm \times 4,6 i.d.). La cromatografia viene eseguita a 35° C al flusso di 400 mL/min, utilizzando le seguenti fasi mobili: (A) acetonitrile e (B) acqua, entrambi acidificati con 10 mmol/L di acido formico; la separazione viene ottenuta con gradiente lineare secondo il seguente programma: t0, A 5 0%; T10, A 5 20%; T11, A 5 100%; T13, A 5 100%; T14, A 5 0%; T23, A 5 0% %; t11, A 5 100%; t13, A 5 100%; t14, A 5 0%; t23, A 5 0%.

Come gas di desolvatazione va usato azoto ad alta purezza, mentre come gas di collisione argon ad alta purezza.

Il gas nebulizzatore va impostato a 650 L/h, il gas del cono a 50 L/h; la sorgente ionica e la temperatura di desolvazione vanno mantenute, rispettivamente, a 110 e 350°C, la tensione capillare a 3000 V, la tensione del cono a 45 V.

Le transizioni da selezionare per modalità di monitoraggio multireazione (MRM) in ionizzazione positiva sono 416 m/z \rightarrow 194 m/z (energia di collisione 40 eV) e 416 m/z \rightarrow 336 m/z (energia di collisione 20 eV).

3. FREQUENZA DI CONTAMINAZIONE IN ITALIA

3.1. Vie di contaminazione della fauna ittica

Cyprinus carpio, *Carassius carassius*, *Mugil cephalus* e *Procambarus clarkii*, tipiche degli ambienti eutrofici, si nutrono di una vasta gamma di alimenti tra cui piante, piccoli crostacei, insetti acquatici, anellidi, molluschi, semi di piante infestanti, piante acquatiche, alghe e detriti. Le prime quattro specie, Solo *Dicentrarchus labrax* è carnivoro, con giovani che si nutrono di invertebrati, che assumono pesci con l'avanzare dell'età e adulti piscivori.

Inoltre, le prime 5 specie sono bentoniche, vivono tipicamente in fondali di fango, mentre *Atherina boyleri* è planctonica. *Salmo trutta lacustris* abita laghi e fiumi a flusso rapido. Spesso chiamato "trota salmonata" a causa dell'alimentazione anche di crostacei che danno alla carne un colore rosa, la trota si nutre non esclusivamente di plancton. *Leuciscus cephalus* si nutre di alghe, pezzetti di vegetazione e vari semi caduti nell'acqua. Si nutre anche di vermi, molluschi, crostacei e varie larve di insetti; un grosso cavedano mangia un numero considerevole di piccoli pesci, come cavedani, anguille, dace, scarafaggi e pesciolini; anche rane, gamberi, arvicole e giovani uccelli acquatici. Il gambero rosso di palude *Procambarus clarkii*, originario della Louisiana (USA) e del Messico nord-orientale, è una specie trapiantata in tutto il mondo, introdotta in Europa per la prima volta in Spagna, nel 1972. Presente in Italia dal 1990, è riuscita a colonizzare laghi e torrenti del nord Italia dopo la fuga da stagni inadeguati di acquacoltura. Questa specie molto tollerante è ben adattata nel bacino di Massaciuccoli (Toscana), dove le popolazioni possono raggiungere densità di persino 100 individui/m² (Barbaresi & Gherardi, 2000).

I cianobatteri sono componenti normali della dieta dei ciprinidi, che si nutrono di ceppi non tossici di *M. aeruginosa* in condizioni di campo (Northcott *et al.*, 1991). Negli studi compiuti in Italia, le prove hanno confermato le osservazioni di Chen *et al.*, (2006), in cui i ciprinidi (carpa d'argento) sembrano accumulare meno microcistine nei muscoli rispetto ad altre specie.

È stata trovata una correlazione negativa tra le concentrazioni di microcistina nel muscolo dei pesci e nell'acqua (risultati ELISA, dicembre 2004-giugno 2005); alcuni studi che misurano l'abbondanza di microcistine in campioni di muscolo di pesce hanno fornito una relazione negativa simile (Magalhaes *et al.*, 2001; Smith *et al.*, 2006; Wood *et al.*, 2006; Wilson *et al.*, 2008). Altri studi hanno mostrato relazioni positive (Magalhaes *et al.*, 2003; Chen *et al.*, 2006).

3.2. Diffusione delle contaminazioni ittiche in acqua dolce

La produzione di pesce d'acqua dolce in Italia è stata stimata in 32000 tonnellate/anno (7% della produzione totale, anno 2005). Alcuni studi sono stati svolti anche nel nostro Paese per indagare la presenza di contaminazioni da cianotossine nella fauna ittica commerciale dulcaquicola (es. Bogiatti *et al.*, 2005; Messineo *et al.*, 2008), utilizzando diversi metodi immunochimici e di rivelazione strumentale. In uno di questi, 155 campioni di pesci e crostacei raccolti in cinque laghi contaminati, vennero analizzati mostrando livelli di contaminazione da microcistine da 0,21 µg/kg fino a 14,6 mg/kg (Bruno *et al.*, 2012). In particolare, per fioriture di 100 milioni di cellule/L, la rivelazione di microcistine negli organi interni e nei muscoli dei pesci era stata contemporanea all'insorgere della fioritura. Tuttavia, in trenta giorni la disintossicazione dei pesci venne valutata in misura del 48% delle microcistine ingerite, per eliminazione attraverso le feci.

Il lago di Massaciuccoli (Toscana) è uno degli esempi studiati in queste ricerche (Tabella 1).

Tabella 1. LAGO DI MASSACIUCCOLI: campioni di pesci, varianti di microcistine presenti (ng/g)

Data di campionamento	Specie	Muscolo		Visceri		Uova	
		ELISA	LC-MS/MS	ELISA	LC-MS/MS	ELISA	LC-MS/MS
Giugno 2004	<i>C. carpio</i>	n.d.		n.d.			
	<i>C. carpio</i>	4,47		1,56			
	<i>C. carassius</i>	2,68	8,73	13,03	6,78		
	<i>C. carassius</i>	2,03		0,57			
	<i>C. carassius</i>	n.d.		n.d.			
	<i>M. cephalus</i>	1,37	0	14500	2745,9		
	<i>M. cephalus</i>	3,68		182,02			
	<i>M. cephalus</i>	36,42		4350,87			
	<i>P. clarkii</i>	28,46	0	100,94	39,37		
	<i>C. carpio</i>	1,31		26,21			
Dicembre 2004	<i>C. carassius</i>	n.d.		n.d.	13,35		
	<i>C. carassius</i>	1,89	0,35	19,81		2,6	0,32
	<i>C. carassius</i>	1,97		32,7			
	<i>M. cephalus</i>	n.a.		n.a.		5,2	n.a.
	<i>M. cephalus</i>	8,5		107,43	30,33		
	<i>M. cephalus</i>	6,6	9,35	29,23	8,11		
	<i>M. cephalus</i>	1,99		239,4	7,64		
	<i>P. clarkii</i>	11,25		25,71			
	<i>P. clarkii</i>	3,72		12,4			
	<i>P. clarkii</i>	2,84		9,47			
Giugno 2005	<i>A. boyeri</i>	30,02					
	<i>C. carpio</i>	n.d.		1,64			
	<i>C. carpio</i>	1,78		15,05			
	<i>C. carpio</i>	1,17		9,33			
	<i>C. carpio</i>	1,04	0	23,51	24,48		
	<i>C. carassius</i>	0,79	0	3,14	0		
	<i>C. carassius</i>	0,38		5,79			
	<i>C. carassius</i>	1,07		3,57			
	<i>P. clarkii</i>	4,73		1,5			
	<i>P. clarkii</i>	45,45		175			
Novembre 2005	<i>P. clarkii</i>	6,85		2,34			
	<i>C. carpio</i>	2,29	0	3,54		2,68	0
	<i>C. carpio</i>	2,72	0,81	8,86		17,08	24,18
	<i>C. carpio</i>	n.d.	0	1,95		2,61	0
	<i>C. carassius</i>	n.d.		1,02			
	<i>C. carassius</i>	n.d.		1,6			
	<i>C. carassius</i>	n.d.		2,4			
	<i>M. cephalus</i>	n.d.		14625,8			
	<i>M. cephalus</i>	0,58		3275			
	<i>M. cephalus</i>	3,23		393,39			
Luglio 2006	<i>P. clarkii</i>	12,8	0,77	32,6	47,21		
	<i>P. clarkii</i>	9,81		105,82			
	<i>P. clarkii</i>	2,68		0,37			
	<i>C. carpio</i>	1,53		n.a.			
	<i>C. carassius</i>	2,18		n.a.			
	<i>P. clarkii</i>	n.d.		3,07			
Agosto 2006	<i>D. labrax</i>	n.a.		1,22			
	<i>C. carpio</i>	n.d.		1,92		0,21	n.a.
	<i>C. carpio</i>	0,45		6,79			
	<i>C. carassius</i>	n.d.		1,4			
	<i>C. carassius</i>	n.d.		2,84			
	<i>M. cephalus</i>	0,71		328,8			
	<i>M. cephalus</i>	0,78		10,05			
	<i>P. clarkii</i>	1,51		6,37			
	<i>P. clarkii</i>	n.d.		1,50			
<i>P. clarkii</i>	n.d.		5,91				

Specie ittiche provenienti da acquacoltura locale

n.d.: < 0,16 ppb; n.a.: non analizzato

Procambarus clarkii* corpo; *Procambarus clarkii* testa

Il lago di Massaciuccoli ospita ogni anno fioriture di *Microcystis aeruginosa* una delle specie tossiche più diffuse in Italia, dalla primavera all'autunno inoltrato. Tutti i campioni analizzati (metodo ELISA) di acqua del lago di Massaciuccoli hanno mostrato la presenza di microcistine durante il periodo di studio 2004-2005. I laghi Fiastrone (Marche) e Albano (Lazio) ospitano estese fioriture di *Planktothrix rubescens* in inverno e in primavera. Il lago di Ripabianca (Regione Marche) ha forti fioriture della stessa specie. I 121 campioni di pesci e crostacei (*Mugil cephalus*, *Leuciscus cephalus*, *Carassius carassius*, *Cyprinus carpio*, *Dicentrarchus labrax*, *Atherina boyeri*, *Salmo trutta*, *Procambarus clarkii*), raccolti nei laghi Albano (Tabella 2), Fiastrone, Ripabianca e, da giugno 2004 ad agosto 2006, nel lago di Massaciuccoli, analizzati per la presenza di microcistine, hanno evidenziato positività nell'87% degli estratti di tessuti (muscoli, visceri e ovaie) per la presenza di microcistine, con valori di concentrazione che andavano da un minimo di 0,38 ng/g a un massimo di 14620 ng/g di peso corporeo.

Tabella 2. LAGO DI ALBANO: microcistine in campioni di pesce (ELISA, ng/g)

Data di campionamento	Specie	Muscolo	Visceri
Agosto 2006	<i>Salmo trutta lacustris</i>	n.d.	2,23
	<i>Salmo trutta lacustris</i>	n.d.	2,41

In particolare, risultarono contaminati il 95% dei campioni di visceri (valore massimo 14620 ng/g), il 71% dei campioni muscolari (valore massimo 36,42 ng/g) e il 100% dei campioni di ovaie (valore massimo 17,1 ng/g). *Mugil cephalus* e *Procambarus clarkii* sono risultate le specie con la più alta capacità di concentrazione e medie (Figura 4).

I campioni di muscolo di pesce hanno raggiunto una reattività fino a 125 volte maggiore rispetto ai campioni di acqua raccolti contemporaneamente. Sono state identificate sei varianti di microcistina nei tessuti di pesce di Massaciuccoli (Tabella 3).

Tra tutti i pesci, i visceri avevano il più alto contenuto di microcistine totali e il più alto contenuto medio di microcistine -LR e -LA (235,6 e 56,1 ng/g, rispettivamente). Il muscolo aveva rispettivamente 2,2 e 10 ng/g, quest'ultimo essendo anche il più alto contenuto di variante media tra tutte le microcistine muscolari. I visceri avevano anche il più alto contenuto medio di Microcistina -YR (82,34 ng/g) e -RR (5,1 ng/g), mentre i muscoli contenevano rispettivamente 1,71 ng/g e 0,04 ng/g. Il muscolo aveva un contenuto medio di desmetil MC-RR (6,8 ng/g) superiore ai visceri (0,86 ng/g). Tutte le varianti di microcistine rilevate nell'acqua (a eccezione della Microcistina -LR del dicembre 2004 e della Microcistina -LA del novembre 2005) sono state generalmente trovate nei tessuti dei pesci delle varie specie (Figura 4), compatibilmente con la minore sensibilità del metodo LC-MS/MS rispetto all'ELISA. *P. clarkii* non aveva desmetil -LR in alcun tessuto e *C. carpio* non aveva desmetil-MC-RR mentre la Microcistina -LR è stata trovata in ogni tessuto.

La più alta quantità di microcistine totali è stata trovata nel pesce onnivoro *Mugil cephalus* (2.745,95 ng/g nei visceri e 9,35 ng/g nei muscoli), seguito dai gamberi *P. clarkii* (47,21 ng/g nella testa).

Il valore più alto di desmetil-MC-RR è stato rilevato nei muscoli del *Leuciscus cephalus* del lago di Fiastrone, durante una fioritura duratura di *P. rubescens*, principale produttore di questa particolare variante. *C. carassius* ha mostrato un più alto contenuto di microcistine nei muscoli. In media, il contenuto totale di microcistine nel muscolo era più alto nei pesci onnivori *Leuciscus cephalus* (lago di Fiastrone e lago di Ripabianca) seguiti dai pesci onnivori *C. carassius* e *C. carpio*.

Il confronto tra analisi LC-MS/MS ed ELISA (vedi Tabella 1) ha mostrato una capacità di rivelazione inferiore nel primo metodo.

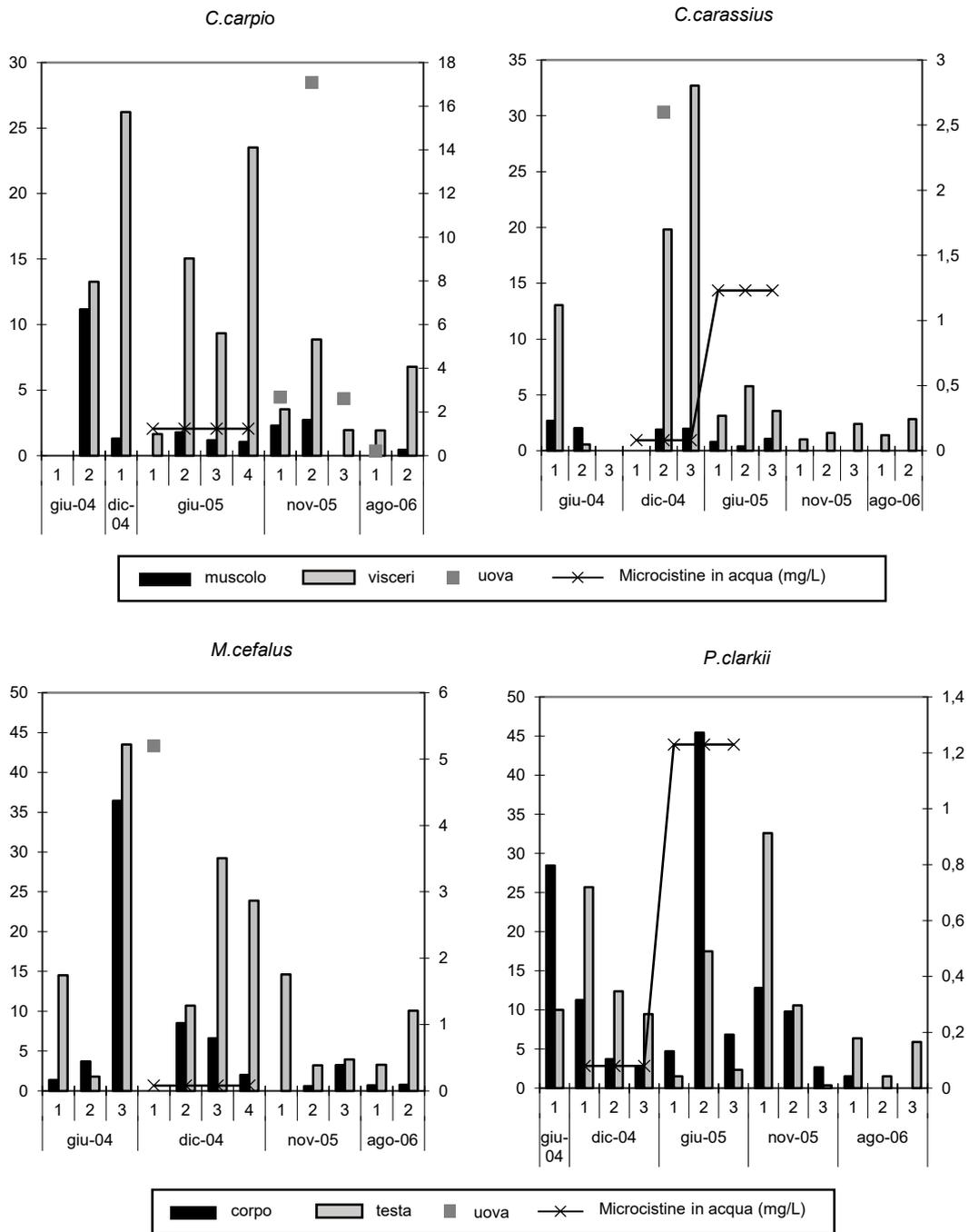


Figura 4. LAGO DI MASSACIUCCOLI: contenuto di microcistine nell'acqua e in quattro specie di pesci presenti (ELISA, ng/g)

Tabella 3. MASSACIUCCOLI, FIASTRONE E RIPABIANCA: campioni di pesce, varianti di microcistine presenti (LC-MS/MS, ng/g)

Data e luogo di campionamento	Campione	Dem MC-RR	MC-RR	MC-YR	Dem MC-LR	MC-LR	MC-LA	Total MC
Giugno 2004 Massaciuccoli	<i>C. carassius</i> visceri	0	0	0	6,77	0	0	6,77
	<i>C. carassius</i> muscolo	0	0,24	1,12	0	1,95	5,41	8,73
	<i>M. cephalus</i> visceri	6,29	23,36	666,21	0	1601,28	448,8	2745,95
	<i>P. clarkii</i> testa	0	0	1,95	0	2,77	34,65	39,37
Dicembre 2004 Massaciuccoli	<i>C. carassius</i> muscolo	0,35	tracce	0	0	0	0	0,35
	<i>C. carassius</i> ovaie	0,32	tracce	0	0	0	0	0,32
	<i>M. cephalus</i> visceri°	0	2,09	3,18	25,10	0	0	30,33
	<i>M. cephalus</i> muscolo°	3,22	0	3,44	2,68	0	0	9,35
	<i>M. cephalus</i> visceri	2,91	0	2,48	2,72	0	0	8,11
	<i>M. cephalus</i> visceri	0	0	0	0	7,64	0	7,64
Giugno 2005 Massaciuccol	<i>C. carpio</i> visceri	0	0	6,88	0	17,60	0	24,47
Novembre 2005 Massaciuccoli	<i>C. carpio</i> muscolo	tracce	0	0,36	0	0,46	0	0,82
	<i>C. carpio</i> ovaie	tracce	0	7,72	0	9,17	7,28	24,18
	<i>P. clarkii</i> testa°	0	0	6,81	0	10,91	24,5	47,21
	<i>P. clarkii</i> corpo°	0,77	0	0	0	0	0	0,77
Marzo 2005 Fiastrone	<i>L. cephalus</i> visceri°	0	0	0	259,02	0	0	259,02
	<i>L. cephalus</i> muscolo°	26,59	0	0	0	0	0	26,59
Settembre 2004 Ripabianca	<i>L. cephalus</i> muscolo	4,11	0	1,99	1,87	2,57	15,74	26,30

DEM: variante demetilata della Microcistina RR

In generale, l'analisi con LC-MS/MS non ha rivelato la presenza di microcistina negli estratti di tessuto fino a 3,5 ng/g; con concentrazioni più elevate i valori variavano dal 30% al 3,3% rispetto ai corrispondenti rilevamenti ELISA.

Ciò era probabilmente dovuto alla indisponibilità all'identificazione in LC-MS/MS delle microcistine legate. Le microcistine si legano all'interno degli epatociti mediante il trasporto degli acidi biliari (Bishoff, 2001), in una forma a basso contenuto tossico (Williams *et al.*, 1997) che successivamente provoca un lento rilascio nel sangue (Soares *et al.*, 2006).

La forma legata può ancora essere rivelata dagli anticorpi monoclonali, ma non dal metodo LC-MS/MS.

Per un uomo adulto che pesa 60 kg e ingerisce 300 g di porzione di muscolo di pesce, il livello di microcistine del 17,2% dei campioni muscolari del lago di Massaciuccoli analizzati dal 2004

al 2005 era addirittura di 5,6 volte il valore TDI raccomandato di 0,04 µg/kg di peso corporeo/giorno suggerita dalla WHO (Chorus & Bartram, 1999).

Tencalla *et al.* (1994) hanno mostrato che le trote muoiono entro 96 ore se intossicate con *Microcystis* congelata alla dose di 6,6 mg di microcistine/kg a settimana.

La presenza di una concentrazione tra 4 e 14 µg/g in diversi campioni di visceri suggerisce che le concentrazioni di microcistine in questi pesci nel lago di Massaciuccoli erano vicine a un livello sub-letale o letale. Tuttavia, le microcistine possono accumularsi a livelli che, sebbene non letali per il pesce, possono essere oltre i limiti raccomandati del consumo di microcistine per l'acqua potabile.

Campionamenti effettuati nel periodo 2006-2009 nel lago di Vico, che ospita una popolazione di *Planktothrix rubescens* con una fioritura invernale prolungata hanno mostrato contaminazioni da microcistine nella specie ittica zooplanctivora *Coregonus lavaretus*, la specie zoobentivora *Tinca tinca* e le specie carnivore *Lepomis gibbosus*, *Perca fluviatilis* e *Esox lucius* (Tabella 4 e 5).

Tabella 4. LAGO DI VICO: contenuto di microcistine (ELISA, ng/g) in campioni di pesci di varie specie

Pesce	Periodo (mese/anno)									
	3/2006	6/2007	1/2008	2/2008	3/2008	4/2008	5/2008	6/2008	11/2008	3/2009
<i>Coregonus lavaretus</i> 1 muscolo	0,21	1,99	26,56	2,19	0,85	2,58	1,99	1,68	0,71	
<i>Coregonus lavaretus</i> 1 visceri	411,5	1,37	39,19	28,57		39,53	7,7	7,7		4,3
<i>Coregonus lavaretus</i> 1 visceri/ovaie				2,14						
<i>Coregonus lavaretus</i> 2 muscolo	n.d.	1,05	0,76	2,53		1,01	1,45	1,42	n.d.	
<i>Coregonus lavaretus</i> 2 visceri	3,68	19,65	3,16	42,17		6,96	11,03	25,4	2,97	
<i>Coregonus lavaretus</i> 3 muscolo		0,80	n.d.	2,43		1,906	0,49	1,35	n.d.	
<i>Coregonus lavaretus</i> 3 visceri		1,84	18,01	43,2		10,46	8,58	5,94	3,33	
<i>Coregonus lavaretus</i> 4 muscolo									0,33	
<i>Coregonus lavaretus</i> 4 visceri									2,41	
<i>Lepomis gibbosus</i> 1 muscolo	0,83									
<i>Lepomis gibbosus</i> 2 muscolo	1,40									

Tabella 5. LAGO DI VICO: concentrazione di microcistine determinate con ION TRAP LC/ESI-MS/MS (ng/g) in alcuni pesci

Campione	MC-RR	MC-LR	MC-YR	MC-LF	MC-LW
<i>Perca fluviatilis</i> 1	n.d.	n.d.	n.d.	14	n.d.
<i>Perca fluviatilis</i> 2	n.d.	n.d.	n.d.	21	n.d.

Dei 34 pesci del lago il 93,3% sono risultati contaminati, con valori di concentrazione compresi tra un minimo di 0,21 e un massimo di 411,5 ng/g di peso corporeo. Le microcistine sono state ritrovate nel 97% dei campioni di visceri (da 1,37 a 411,5 ng/g con una concentrazione media di 29,84 ng/g), nell'87% dei campioni muscolari (da 0,21 a 26,56 ng/g con una concentrazione media di 13,32 ng/g) e nel campione di ovaia.

Nel gennaio 2008 la concentrazione di microcistina nei campioni di muscolo di pesce (*Coregonus lavaretus*) ha raggiunto 26,56 ng/g. Per valutare il significato del rischio rappresentato dall'EDI (*Estimated Daily Intake*, assunzione giornaliera stimata) (Figura 5) dei nostri dati sono stati usati sia i valori TDI della WHO di Chorus e Bartram (1999) sia i valori TDI (*Tolerable Daily Intake*) della *Environment Protection Agency* statunitense (USEPA) più recenti (2006).

Nella regione del lago di Vico, i pesci sono normalmente consumati come piatto principale preferito dalla primavera all'autunno.

Di solito i pesci vengono consumati arrostiti e i visceri spesso non vengono completamente rimossi (fegato, in particolare).

Per un adulto che pesa 60 kg e ingerisce 300 g di porzione di muscolo di pesce (Magalhaes *et al.*, 2003; Mohamed *et al.*, 2003), secondo le recenti linee guida US EPA basate su Heinze (1999) e sviluppate per il rischio acuto e cronico (0,006 e 0,003 microcistina µg/kg di peso corporeo/giorno, rispettivamente, USEPA, 2006), il livello di microcistina nel 54,8% dei campioni muscolari del lago di Vico analizzati da marzo 2006 a marzo 2009 era addirittura di 22 volte superiore a quello del raccomandato valore TDI per rischio acuto, mentre i visceri positivi per microcistine (27 campioni) hanno superato anche di 343 volte questo valore.

Il valore TDI (0,04 µg/kg di peso corporeo/giorno) (Chorus & Bartram, 1999) proposto dalla WHO per un adulto di 60 kg di peso corporeo che ingerisce 300 g di pesce commestibile, è stato superato da un campione di muscolo (3,3 volte, gennaio 2008) e dal 59,2% dei campioni di visceri.

La pesca professionale in acqua dolce nel lago di Vico inizia ufficialmente non prima di aprile, a causa delle basse temperature e dei forti venti invernali tipici di questa zona.

Nella nostra indagine, in questa stagione di pesca legale, una percentuale del 57% di pesce campionato (organi commestibili) e il 54,8% (tessuto muscolare) e il 100% (organi commestibili) di pesce secondo il TDI provvisorio USEPA, si è rivelato non sicuro per i consumatori.

Durante uno studio svolto nel periodo novembre 2013-novembre 2014 nel lago di Occhito (Foggia), un lago eutrofizzato riserva idrica per la provincia di Foggia, 31 campioni ittici prelevati mensilmente da sette specie diverse evidenziarono una concentrazione di BMAA variabile da 297 a 947 ng/g.

I valori maggiori erano presenti dall'estate all'autunno inoltrato (Tabella 6).

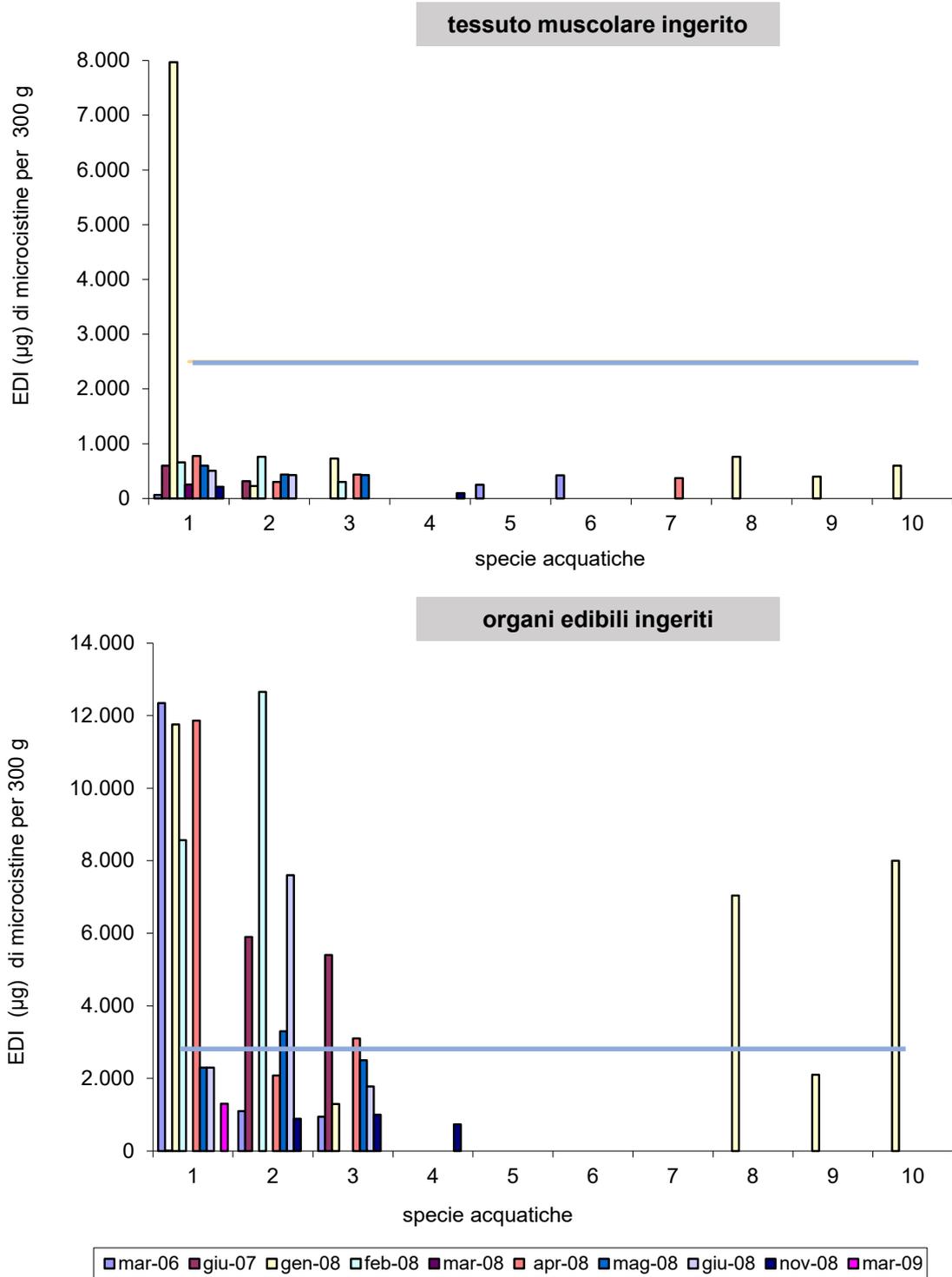


Figura 5. LAGO DI VICO: assunzione giornaliera stimata (EDI, *Estimated daily intake*) di microcistine per muscolo e organi edibili di *Coregonus lavaretus* (1-4), *Lepomis gibbosus* (5-6), *Esox lucius* (7), *Tinca tinca* (8-10). Linea orizzontale: WHO (60 kg di peso corporeo) TDI per microcistine per l'uomo

Tabella. 6. LAGO DI OCCHITO: contenuto di BMAA in campioni di pesci di varie specie (ELISA, ng/g)

Specie	2013					2014					2015	
	4 nov	23 nov	26 feb	17 mar	3 apr	29 apr	22 giu	28 lug	25 ago	25 set	27 ott	26 gen
Cavedani <i>S. cephalus</i>											687	947
Alborelle <i>A. arborella</i>	427	383	423	518	453					86		
Rovella <i>R. rubilio</i>		543		435	677						678	
Persico trota <i>M. salmoides</i>					41		362			937	707	
Carassi <i>C. carassius</i>					52	297			509	408		
Carpe <i>C. carpio</i>	512	511			485	415	543	377	344	316		
Barbi <i>B. barbuis</i>	617			434	383							

3.3. Cianotossine nei mitili in Italia

In Italia nel 2009 si verificò una forte e prolungata fioritura tossica (della durata di quattro mesi) di *Planktothrix rubescens* nel bacino di acqua potabile di Occhito (Foggia), che causò gravi problemi di gestione.

Le riprese video dei voli in elicottero mostrarono un denso scum rossastro che galleggiava lungo l'emissario, fiume Fortore, fino al mare.

I campioni di acqua di mare analizzati con test immunochimico ELISA fornirono valori di microcistine compresi tra 0 e 0,61 µg/L (maggio 2009).

Analisi effettuate nel maggio del 2009 su campioni di *Mitilus galloprovincialis* (cozze) prelevate lungo l'areale costiero di Lesina evidenziarono contaminazioni da microcistine fino a 0,3 µg/g di peso fresco, mentre vongole della stessa zona risultavano molto meno contaminate (max 0,002 µg/g di peso fresco), senza dubbio grazie alla loro localizzazione bentonica).

Un campione del bivalve bentonico *Chamelea gallina* diede valori da 1 a 2,3 ng/g (maggio 2009).

Queste analisi dimostrarono la capacità di contaminazione della grande biomassa di *Planktothrix rubescens* che veniva convogliata a mare dal fiume Fortore in uscita dalla diga di Occhito: pur essendo un organismo che non resiste all'acqua marina, la popolazione composta era così grande e compatta da sopravvivere abbastanza per poter raggiungere gli allevamenti di mitili sulla costa, interessando le trecce planctoniche.

Solo pochi campioni di pesci prelevati dall'Occhito poterono essere esaminati in quella occasione: in particolare i muscoli di 2 carpe pescate a maggio, che mostrarono un massimo di 1,93 ng/g di peso fresco (Bruno *et al.*, 2009).

La Microcistina demetilata RR (desMe-MC-RR), variante marcatore tipico delle fioriture di *P. rubescens* (Barco *et al.*, 2004), fu la principale tossina presente in tutti i campioni di acqua e frutti di mare. A seguito della contaminazione da microcistine, nel 2009 l'autorità sanitaria locale vietò il commercio di cozze, al fine di prevenire possibili contaminazioni dei consumatori.

In autunno/ inverno 2010 si verificò la ricomparsa della fioritura, ma in minore estensione e si verificò una minore contaminazione delle cozze. Le cozze e le vongole vengono consumate principalmente come piatto crudo o cucinate secondo le ricette tradizionali, e il contenuto di microcistina nelle cozze non è influenzato dall'ebollizione (Morais *et al.*, 2008).

Per quanto riguarda il peso umano di 60 kg e l'ingestione da 100 a 300 g di porzione di cozze, il livello di microcistina del 80% dei campioni di cozze analizzati nel 2009 e del 19% dei campioni di cozze analizzati nel 2010 è stato addirittura di 4 volte nel primo caso e 3 volte nel secondo caso maggiore del limite TDI di 0,04 µ/kg. peso corporeo/giorno suggerito dalla WHO (Chorus & Bartram, 1999).

Queste evidenze dimostrano che anche i mitili marini possono essere contaminati da microcistine rappresentando un rischio per la salute del consumatore ed essere causa di un danno economico se le acque interne colpite da eutrofizzazione tossica e comunicanti con acque costiere, non vengono gestite con specifici piani di bonifica.

In conclusione, la presenza di microcistine nella fauna acquatica è un fenomeno diffuso in diverse acque dolci in Italia, che dimostra la necessità di tecniche analitiche adeguate e multiple per un'efficace rilevazione, e di misure proattive prima che le microcistine raggiungano l'acqua inducendo nel tessuto ittico concentrazioni rischiose per la salute della fauna ittica e dei consumatori.

3.4. Persistenza delle microcistine nei metodi di cottura

Sono state testate diverse ricette di cottura per verificare il degrado delle microcistine in cottura.

Tre campioni di muscolo di pesce di tre specie diverse sono stati cotti in tre ricette di cottura diverse ma comuni, a temperatura medio-alta in presenza di diverse spezie (Tabella 7).

Il metodo di cottura al forno ha dimostrato di provocare in media il più alto abbattimento del peso (43%) rispetto alla frittura (16,3%) e alla brasatura (31%), ma nessuna degradazione delle tossine, con conseguente concentrazione efficace delle microcistine nel tessuto muscolare del pesce (28%).

Le altre due ricette di cottura hanno ottenuto una parziale degradazione delle microcistine, con conseguente abbattimento del 36,3% e 81,6%, rispettivamente.

Questi buoni risultati sembrano essere dovuti alla presenza di spezie (o forse del pomodoro), piuttosto che alla temperatura o al tempo di cottura (Bruno *et al.*, 2009).

Tabella 7. Microcistine in campioni di pesce cotti (ELISA, ng/g)

Specie (tessuto muscolare)	<i>M. cephalus</i>	<i>C. carassius</i>	<i>C. carpio</i>	<i>C. carpio</i>	<i>C. carpio</i>	<i>M. cephalus</i>	<i>C. carpio</i>	<i>M. cephalus</i>	<i>C. carpio</i>
Peso prima della cottura (g)	36	12	7	22	5	10	47	6	76
Peso dopo al cottura (g)	24	6	4	20	3	9,9	30	5	44
Peso cotto/peso crudo %	66	50	57	91	60	99	64	83	58
Metodo di cottura	Al forno	Al forno	Al forno	Frittura	Frittura	Frittura	Brasatura	Brasatura	Brasatura
Tempo di cottura (min)	15	15	15	7-8	7-8	7-8	10	10	10
Temperatura di cottura (°C)	150	150	150	Fiamma moderata	Fiamma moderata	Fiamma moderata	Fiamma moderata	Fiamma moderata	Fiamma moderata
Erbe/specie	Olio d'oliva aglio rosmarino coriandolo	Olio d'oliva aglio rosmarino coriandolo	Olio d'oliva aglio rosmarino coriandolo	Farina olio di oliva comune salvia prezzemolo	Farina olio di oliva comune salvia prezzemolo	Farina olio di oliva comune salvia prezzemolo	Olio di oliva salvia comune prezzemolo pomodoro	Olio di oliva salvia comune prezzemolo pomodoro	Olio di oliva salvia comune prezzemolo pomodoro
Quantità MCYST/tessuto crudo (ng/g)	36,42	1,97	2,72	1,78	4,47	3,23	4,47	8,5	2,11
Quantità MCYST/tessuto cotto (ng/g)	42,7	2,2 .	4,23	<0,16	3,8	3	0,93	2,31	<0,16

4. METODI DI VALUTAZIONE DEL RISCHIO

4.1. Sviluppo e utilizzo dei limiti di consumo basati sul rischio

Le diverse modalità di alimentazione delle varie specie di pesci possono essere uno dei motivi per cui la presenza di microcistine viene rilevata anche quando mancano fioriture di *M. aeruginosa*; gli studi hanno fornito prove del fatto che vie diverse dal tratto gastrointestinale sono importanti per l'assorbimento delle microcistine da parte dei pesci (Tencalla *et al.*, 1994; Xie *et al.*, 2005). Secondo Wilson *et al.*, le concentrazioni di microcistine nei pesci sono una conseguenza diretta di vari fattori concomitanti, come la circolazione delle acque e l'accumulo nelle prede planctoniche durante la successione stagionale delle popolazioni cianobatteriche o il ritardo temporale tra i vari componenti biologici.

Queste variazioni possono essere responsabili di diverse evidenze negli studi sul campo, in cui i parametri possono essere studiati con approcci diversi (es. contenuto di microcistina extracellulare o intracellulare).

Nei nostri studi abbiamo osservato che le misurazioni ELISA delle microcistine totali nell'acqua possono essere significativamente più elevate se, invece di analizzare l'intero campione d'acqua (es. dopo la sonicazione), i compartimenti intracellulari ed extracellulari vengono analizzati separatamente e i valori risultanti sommati.

Elevate concentrazioni di microcistina si possono trovare con quantità di cellule basse (Wood *et al.*, 2006).

Pertanto, in caso di persistenza delle tossine dopo la lisi cellulare e la morte, la conta cellulare da sola potrebbe non fornire una valida indicazione sulle concentrazioni di microcistina al fine di evitare conseguenze tossicologiche.

Nei nostri studi sono stati rilevati valori diversi di microcistine nelle analisi ELISA e triplo quadrupolo LC-MS/MS degli stessi campioni.

Differenze nelle concentrazioni totali di microcistine misurate con LC-MS/MS o ELISA nel tessuto di pesce sono state osservate in altri studi (Magalhaes *et al.*, 2001; Lawrence *et al.*, 2001; Rapala *et al.*, 2002; Mountford *et al.*, 2004; Wood *et al.*, 2006).

L'analisi LC-MS/MS negli studi italiani, basandosi sugli standard disponibili, ha selezionato solo sei varianti, quindi è possibile che non siano state identificate tutte le microcistine contenute nei campioni. In questi casi le stesse tecniche di estrazione sono state adottate per le analisi immunologiche e strumentali, al fine di eseguire entrambi i tipi di misurazione a partire dalla stessa efficienza di estrazione.

Yuan *et al.*, (2006) hanno fornito prove del fatto che le tecniche strumentali utilizzate hanno un'importanza fondamentale nell'equivalenza delle misurazioni (es. tra i risultati ELISA e LC-MS/MS); per esempio la disponibilità di microcistine libere e legate per il nostro metodo analitico LC-MS/MS può aver motivato le differenze riscontrate nei risultati dei nostri studi.

La porzione di microcistine legate covalentemente infatti non è rivelabile con i metodi di estrazione con solventi organici convenzionali, e può rappresentare fino al 38-99% delle microcistine totali contenute nei tessuti (Smith *et al.*, 2010).

Ciò può portare a una considerevole sottovalutazione, fino ad alcuni ordini di grandezza, del contenuto totale di MC e, di conseguenza, del rischio per la salute umana correlato (Peng *et al.*, 2010; Ottand *et al.*, 2006), perché le tossine combinate vengono rilasciate durante la digestione per una via metabolica tossicamente attiva (Smith *et al.*, 2010; Kondo *et al.*, 1992). Pertanto, anche

se i valori tossici vengono misurati effettivamente, è ancora difficile che vengano comunque analizzati esattamente.

La WHO ha fissato un valore di assunzione giornaliera tollerabile (TDI) provvisorio per esposizione acuta alla Microcistina-LR di 0,04 µg/kg di peso corporeo e ha fissato un valore orientativo per la Microcistina-LR nell'acqua potabile di 1 µg/L, basato sull'ipotesi che l'80% dell'esposizione sia attribuibile al consumo di acqua (De Figuereido *et al.*, 2004; Falconer *et al.*, 1999; WHO 1998).

Anche se è ormai noto che un accumulo di MC si verifica nei pesci e in altri organismi acquatici (Ibelings *et al.*, 2007; Magalhães *et al.*, 2003; Kotak *et al.*, 1996), non sono state stabilite linee guida ampiamente accettate per le concentrazioni di MC in tessuti di pesci e la maggior parte degli scenari di esposizione alle MC non tiene conto dell'esposizione potenziale attraverso il consumo di pesce.

È importante notare che le linee guida della WHO per l'acqua potabile e i relativi valori TDI sono stati sviluppati sulla base della tossicità del congenere Microcistina-LR.

Studi (Poste *et al.*, 2011) condotti su grandi laghi temperati e tropicali che sostengono importanti attività commerciali, sportive e di pesca per sussistenza, hanno dimostrato l'ampia prevalenza delle microcistine in intervalli di concentrazione già segnalati in Africa, America Settentrionale, America Meridionale e Cina, confermando che l'accumulo di microcistine nei pesci è materia di preoccupazione globale.

L'ELISA anti-ADDA utilizzato in questi studi, e descritto più sopra, è "congenere indipendente", e come tale le relative misurazioni della concentrazione di microcistine non sono direttamente comparabili con le linee guida basate sui valori di Microcistina-LR, esse possono infatti includere alte concentrazioni di congeneri con tossicità diversa, minore o maggiore, da quella della Microcistina-LR.

Tuttavia, le concentrazioni totali di microcistine sia nei pesci che nell'acqua di questi laghi spesso hanno superato i valori TDI della WHO, confermando che anche se i congeneri di microcistine presenti non sono i congeneri più tossici, essi possono ancora costituire un rischio considerevole per i consumatori.

In questo senso le attuali linee guida WHO per la quantificazione del rischio possono non riflettere adeguatamente il potenziale di esposizione alle microcistine che la matrice ittica può rappresentare. Particolarmente preoccupanti sono le comunità di pescatori rivieraschi che consumano acqua e piccoli pesci provenienti dai siti di studio tropicali, dove vi è il rischio cronico di esposizione alle microcistine durante tutto l'anno, con potenziali effetti per la salute pubblica. In un altro recente lavoro di review (Flores *et al.*, 2018) sono stati utilizzati dati per comprendere meglio le concentrazioni di cianotossine osservate nei pesci selvatici. Sono stati raccolti dati da studi su campo provenienti da laghi di tutto il mondo, che riportavano concentrazioni di cianotossine in acque dolci lentiche, per valutare l'accumulo di cianotossine nei pesci d'acqua dolce in tutto il mondo.

L'obiettivo era: (1) determinare se le concentrazioni di cianotossine nei pesci sono riflesso dei livelli di cianotossine nell'acqua in cui i pesci risiedono, e (2) identificare eventuali differenze nell'accumulo di tossine tra i tipi di tessuti e le modalità di alimentazione dei pesci (carnivora, onnivora, planktivora).

È stato ipotizzato che, su scala globale, le concentrazioni di cianotossine nei tessuti dei pesci siano positivamente correlate alle concentrazioni di cianotossine nell'acqua. Ci si aspettava che un test su scala globale rivelasse grandi schemi nel modo in cui le cianotossine si accumulano nei pesci per identificare i gruppi di alimentazione che possono essere inclini a un maggiore accumulo di tossine.

Sono stati esaminati 115 studi e letteratura grigia, di cui 58 studi sul campo di acqua dolce soddisfacevano i criteri di ricerca e sono stati quindi selezionati per l'analisi. Di questi 58 studi,

quasi il 90% erano su microcistine (MC), mentre il resto includeva β -N-metilammino-L-alanina (BMAA), il suo isomero, acido 2,4-diamminobutirrico dicloridrato (DABA), l'antossina-a (ATX), la cilindrospermopsina (CYN) e la saxitossina (STX).

Gli studi selezionati fornivano concentrazioni di cianotossine nei tessuti dei pesci da sole o in coppia con campioni d'acqua che erano stati raccolti durante lo stesso periodo di campionamento del pesce.

Gli studi hanno riguardato 99 sistemi di acqua dolce, compresi laghi, stagni e bacini, in 23 paesi diversi.

Con l'utilizzo dell'analisi *bootstrap*, è stata trovata la prova di una correlazione positiva tra MC intracellulare in acqua e MC nei tessuti di pesce, il che suggerisce che l'aumento delle concentrazioni di MC in sistemi lentici può comportare concentrazioni di MC più elevate nei pesci. Le MC si trovano spesso a concentrazioni più elevate nello stato intracellulare che in quello extracellulare, tranne che alla fine di un ciclo di fioritura (Cazenave *et al.*, 2005).

Pesci e altri organismi che si nutrono di cianobatteri possono ingerire direttamente MC. Durante la senescenza di una fioritura, le tossine intracellulari possono essere rilasciate in acqua. La via dominante di esposizione dei pesci è sconosciuta, ma il trasferimento attraverso la catena trofica e il trasferimento diretto tramite ingestione di cellule e immersione in acqua contaminata da MC sono state dimostrate in esperimenti di laboratorio (Soares *et al.*, 2004; Smith & Haney, 2006; Sieroslawska *et al.*, 2012).

Ci si aspettava di trovare le microcistine in concentrazioni sempre più elevate dal pesce carnivoro a quello onnivoro al planktivoro. È stato rilevato, tuttavia, che gli onnivori in genere avevano la più alta concentrazione di microcistine nei tessuti. I pesci onnivori possono essere esposti alle tossine attraverso quasi tutte le vie possibili, attraverso l'immersione in un "bagno tossico" di tossine disciolte nell'acqua, per ingestione di piante, animali o altre sostanze potenzialmente tossiche.

In ogni caso, le MC difficilmente attraversano liberamente le membrane cellulari, ma piuttosto sono trasportate da polipeptidi organici di trasporto (Fischer *et al.*, 2010). Pertanto, la distribuzione di questi recettori nei tessuti dei pesci può indicare la via di esposizione più comune. Il numero di potenziali vie di esposizione per i pesci onnivori aiuta a spiegare il loro alto grado di concentrazione di tossine rispetto ad altre modalità di alimentazione.

Le revisioni tossicologiche dell'USEPA possono includere valori di dose di riferimento orale (RfD, *Reference Dose*) e concentrazione di riferimento dell'inalazione (RfC, *Reference Concentration*) per durata di esposizione cronica e inferiore al ciclo di vita, e una valutazione della cancerogenicità. L'RfD e l'RfC forniscono informazioni quantitative da utilizzare nelle valutazioni del rischio di effetti sulla salute noti o che si presume siano prodotti attraverso una modalità non lineare (soglia presuntiva) di azione (USEPA, 2015). Questi valori di riferimento sono definiti come una stima di esposizione, caratterizzata dalla durata e dal percorso, della popolazione umana (compresi i sottogruppi sensibili), che probabilmente sarà senza un rischio apprezzabile di effetti negativi.

I valori di riferimento possono essere derivati per esposizione acuta (<24 ore), a breve termine (fino a 30 giorni), subcronica (fino al 10% della durata media) e cronica (per tutta la durata della vita), considerando tutte le esposizioni continuative per tutta la durata specificata. Il valore di riferimento è derivato da un BMDL (*Benchmark Dose Level*, livello dose di riferimento, un limite statistico inferiore di confidenza rispetto alla dose di riferimento), un livello senza effetti avversi osservati (*No Observed Adverse Effect Level*, NOAEL), il più basso livello con effetto avverso osservato (*Lowest Observed Adverse Effect Level*, LOAEL) o un altro punto di partenza adeguato con fattori di incertezza/variabilità applicati per riflettere le limitazioni dei dati utilizzati. La RfD è espressa in unità di mg/kg/giorno e la RfC in unità di mg/m³ di aria inalata (USEPA, 2006).

La valutazione della cancerogenicità fornisce informazioni sul pericolo cancerogeno potenziale della sostanza in questione e stima quantitativamente il rischio derivante dall'esposizione orale e dall'esposizione per inalazione.

Le informazioni includono un giudizio basato sul peso dell'evidenza della probabilità che l'agente sia un cancerogeno per l'uomo e le condizioni in cui gli effetti cancerogeni possono essere espressi.

Le stime quantitative del rischio sono presentate in tre modi. Il fattore di pendenza è il risultato dell'applicazione di una procedura di estrapolazione a basso dosaggio ed è presentato come rischio per mg/kg/giorno. Il rischio unitario è la stima quantitativa in termini di entrambi i rischi per µg/L per ingestione di acqua (RfD) o rischio per µg/m³ per inalazione di aria (RfC).

Un'altra forma in cui si può presentare il rischio è l'acqua potabile o la concentrazione nell'aria che provoca rischi di cancro dell'ordine di 1 su 10.000; 1 su 100.000; o 1 su 1.000.000 (USEPA, 2015). Il BMDL (*Benchmark Dose Level*, livello dose di riferimento, un limite statistico) di 6 µg/kg/giorno dai dati di Heinze (1999) è il BMDL più basso tra i set di dati modellati ed è stato utilizzato come punto di partenza (*Point of Departure*, POD) per la RfD a breve termine.

Dividendo il BMDL di 6 µg/kg/giorno per un fattore di incertezza composito (*Uncertainty Factor*, UF) di 1000 questo si traduce in un RfD a breve termine per MC-LR di 6×10^{-6} mg/kg/giorno:

$$\text{RfD a breve termine} = \text{BMDL} \div \text{UF} = 6 \text{ } \mu\text{g/kg/giorno} \div 1000 = 0,006 \text{ } \mu\text{g/kg/giorno}$$

L'UF composito di 1000 include un fattore 10 per l'estrapolazione interspecie, un fattore di 10 per tenere conto della variabilità interindividuale nella popolazione umana e un fattore di 10 per limitazioni del database: non ci sono informazioni sul grado in cui gli esseri umani di vario genere, età, stato di salute o composizione genetica potrebbero variare nella risposta alle microcistine ingerite. Ci sono alcuni dati che lo suggeriscono: i roditori adulti o anziani possono essere più suscettibili dei giovani roditori alla tossicità acuta di MC-LR (Ito *et al.*, 1997a). Inoltre, studi con estratti di alghe suggeriscono la possibilità che i topi maschi possono essere più sensibili delle femmine all'esposizione orale agli estratti di alghe (Falconer *et al.*, 1988); tuttavia, la rilevanza di questo risultato per l'esposizione umana alla microcistina non è chiara.

Non sono disponibili informazioni sulla tossicità di microcistine purificate nell'uomo e non sono disponibili dati sulle differenze tossicocinetiche tra animali ed esseri umani e sulla disposizione delle microcistine ingerite. Dati limitati su studi *in vitro* suggeriscono che gli epatociti umani possono essere più suscettibili agli effetti di MC-LR rispetto agli epatociti di ratto (Yea *et al.*, 2001; Batista *et al.*, 2003), a sostegno dell'uso di un UF di 10. Un UF di 10, infine, viene utilizzato per tenere conto delle carenze nel database. Le carenze del database includono la mancanza di uno studio dettagliato sulla tossicità dello sviluppo, uno studio sulla neurotossicità, uno studio della tossicità riproduttiva su più generazioni e informazioni di supporto sulla tossicità sistemica in una seconda specie.

Gli HA (*Health Advisories*, avvisi sanitari) descrivono concentrazioni non normative di contaminanti dell'acqua potabile di cui non si prevede che effetti negativi sulla salute si verifichino per durate di esposizione specifiche (es. 1 giorno, 10 giorni o una vita) (USEPA, 2015). Gli HA contengono anche un margine di sicurezza per proteggere i membri sensibili della popolazione. Essi fungono da orientamento tecnico informale per aiutare i funzionari federali, statali e locali, nonché i gestori dei sistemi idrici pubblici o comunitari, nella protezione della salute pubblica, e non devono essere interpretati come norme legalmente esecutive.

La scelta dei parametri biomedici (*endpoint*) per la valutazione degli HA può essere calibrata sia per periodi di esposizione a breve termine (1 giorno e 10 giorni) che per periodi di esposizione a vita, utilizzando informazioni sugli *endpoint* tossicologici di interesse non cancerogenico

(cronico) e cancerogenico. Dove siano disponibili dati, la scelta degli endpoint rifletterà popolazioni suscettibili e/o più altamente esposte (USEPA, 2015).

Un HA di 1 giorno è in genere calcolato per un bambino (da 0 a 12 mesi o bambino di 10 kg), presupponendo una singola esposizione acuta alla sostanza chimica ed è generalmente derivato da uno studio della durata inferiore a sette giorni.

Un HA di 10 giorni è in genere calcolato per un bambino (sempre da 0 a 12 mesi o bambino di 10 kg), presupponendo un periodo limitato di esposizione di una o due settimane, ed è generalmente derivato da uno studio di durata da 7 a 30 giorni.

Un HA a vita è derivato per un adulto (>21 anni o adulto di 80 kg), e presuppone un periodo di esposizione lungo tutta la vita (circa 70 anni) di solito è derivato da uno studio cronico di durata di due anni, ma gli studi subcronici possono essere utilizzati regolando il fattore di incertezza impiegato nel calcolo.

Riguardo agli agenti cancerogeni, i documenti HA forniscono in genere le concentrazioni nell'acqua potabile associate a rischio (da 1 caso di cancro in eccesso ogni diecimila persone esposte, fino a 1 caso di cancro in eccesso per milione di esposti) per i cancerogeni dei gruppi A e B e per quelli classificati come cancerogeni conosciuti o probabili (USEPA, 1986, 2005).

I rischi cancerogenici non vengono forniti per gli agenti cancerogeni del gruppo C o per quelli classificati come indicativi, a meno che il rischio di cancro non sia stato quantificato. Per ogni *endpoint* di valutazione l'EPA utilizza una o più misure di effetto (riferite anche come punto di partenza), che descrivono il cambio di attributo dell'*endpoint* di valutazione in risposta all'esposizione chimica per sviluppare valori di riferimento acuti, a breve termine, a termine più lungo (subcronici) o cronici quando i dati sono disponibili. Le misure di effetto selezionate rappresentano gli impatti sulla sopravvivenza, la crescita, la funzione del sistema, la riproduzione e lo sviluppo. Questo modello concettuale fornisce informazioni utili per caratterizzare e comunicare i potenziali rischi per la salute legati all'esposizione alle cianotossine nell'acqua potabile.

Dopo la valutazione degli studi disponibili ai fini dell'inclusione nell'HESD (*Health Effects Support Document*, documento di supporto per gli effetti sulla salute) e nell'HA, lo studio critico viene selezionato sulla base di fattori come la durata dell'esposizione, il percorso di esposizione, la sensibilità delle specie, il confronto del punto di partenza con altri studi disponibili che dimostrano un effetto e l'affidabilità dello studio (USEPA, 1999).

Una volta scelto un punto di partenza per la quantificazione, i fattori di incertezza appropriati per lo studio selezionato vengono applicati al punto di partenza per tenere conto della variabilità e dell'incertezza nei dati disponibili.

Per le microcistine sono disponibili dati sulla tossicità e l'esposizione che hanno permesso lo sviluppo di un HA di 10 giorni. L'EPA ha utilizzato misure di effetto e stime dell'esposizione per derivare le HA di 10 giorni utilizzando la seguente equazione:

$$HA = (NOAEL \text{ o } LOAEL \text{ o } BMDL) / (UF \text{ DWI} / BW)$$

dove: NOAEL o LOAEL = No (mg/kg di peso corporeo/giorno) da uno studio di durata appropriata (da 7 a 30 giorni).

Quando i dati disponibili sono adeguati, è possibile eseguire la modellazione della dose di riferimento (BMD) per determinare il punto di partenza per il calcolo delle HA. L'approccio "dose di riferimento" prevede la modellazione dose-risposta per ottenere livelli di dose corrispondenti a un livello di risposta specifico vicino alla fascia bassa della gamma osservabile dei dati (USEPA, 2012). Il limite di confidenza inferiore del 95% è definito il livello di dose di riferimento (BMDL).

I fattori di incertezza (UF) rappresentano: (1) variabilità intraspecifica (variazione della suscettibilità tra gli individui); (2) variabilità interspecifica (incertezza nell'estrapolare i dati dagli

animali all'uomo; (3) incertezza nell'estrapolazione da un LOAEL a un NOAEL; e (4) incertezza associata all'estrapolazione quando la banca dati è incompleta (USEPA, 1999; 2002).

Per i bambini, un rapporto normalizzato tra l'ingestione di acqua potabile e il peso corporeo (*Drinking Water Intake/ Body Weight*, DWI/BW) è stato calcolato utilizzando i dati per i neonati (dalla nascita a 21 anni di età), l'EPA ha aggiornato l'ipotesi di un peso corporeo di default a 80 kg sulla base dei dati del NHANES (*National Health and Nutrition Examination Survey*, Indagine nazionale sull'esame sanitario e nutrizionale) dal 1999 al 2006.

Il BW aggiornato rappresenta il peso medio per gli adulti dai 21 anni in su. L'EPA ha aggiornato il DWI (ingestione di acqua potabile) di default a 2,5 L/giorno, arrotondato da 2,546 L/giorno (USEPA, 2011a).

Questo tasso rappresenta la stima singola del consumatore per l'ingestione diretta e indiretta dell'acqua pubblica al novantesimo percentile per gli adulti dai 21 anni in su.

Questo HA di 10 giorni viene applicato alle microcistine totali utilizzando la Microcistina-LR come surrogato. L'HA di 10 giorni è considerato protettivo degli effetti negativi non cancerogenici sulla salute per un'esposizione di 10 giorni alle microcistine nell'acqua potabile. L'HA di 10 giorni per neonati allattati con biberon e bambini piccoli in età prescolare è calcolato come segue:

$$\text{HA di 10 giorni} = (50 \mu\text{g/kg/giorno}) / (1000 \times 0,15 \text{ L/kg/giorno}) = 0,3 \mu\text{g/L}$$

dove: 50 $\mu\text{g/kg/giorno}$ è il LOAEL per gli effetti epatici nei ratti ibridi maschi di 11 settimane esposti alla Microcistina-LR nell'acqua potabile per 28 giorni (Heinze, 1999); 1000 è l'UF composito che comprende un 10 per la variabilità intraspecifica (*Intraspecies Uncertainty Factor*, UFH), un 10 per le differenze interspecifiche (*Interspecies Uncertainty Factor*, UFA), un 3 per l'estrapolazione da LOAEL a NOAEL (*LOAEL Uncertainty Factor*, UFL) e un 3 per le incertezze nel database (*Database Deficiency Factor*, UFD); 0,15 L/kg/giorno è l'assunzione di acqua potabile normalizzata per unità di peso corporeo nel corso del primo anno di vita, in base al novantesimo percentile del consumo di acqua potabile e al peso corporeo medio (USEPA, 2011a).

L'HA di 10 giorni di 0,3 $\mu\text{g/L}$ è considerato protettivo degli effetti negativi non cancerogenici per i neonati alimentati con biberon e i bambini in età prescolare per una esposizione di 10 giorni a microcistine nell'acqua potabile.

L'HA di 10 giorni per i bambini dall'età scolare fino agli adulti è calcolato come segue:

$$\text{HA di 10 giorni: } (50 \mu\text{g/kg/giorno}) / (1000 \times 0,03 \text{ L/kg/giorno}) = 1,6 \mu\text{g/L}$$

dove: 50 $\mu\text{g/kg/giorno}$ è il LOAEL per gli effetti sul fegato nei ratti ibridi maschi di 11 settimane esposti alla Microcistina-LR nell'acqua potabile per 28 giorni (Heinze, 1999); 1000 è l'UF composito che comprende un fattore 10 per la variabilità intraspecifica (UFH), un fattore 10 per le differenze interspecifiche (UFA), un fattore 3 per l'estrapolazione da LOAEL a NOAEL (UFL) e un fattore 3 per le incertezze nel database (UFD); 0,03 L/kg/giorno è l'assunzione di acqua potabile per peso corporeo unitario in base ai valori di default degli adulti di 2,5 L/giorno e 80 kg (USEPA, 2011a).

L'HA di 10 giorni di 1,6 μL è considerato protettivo degli effetti negativi non cancerogenici sulla salute per i bambini dall'età scolare fino agli adulti per una esposizione di 10 giorni a microcistine nell'acqua potabile.

4.2. Limiti di consumo per effetti cancerogeni e cronici

Le fioriture di cianobatteri si verificano più frequentemente e con crescente gravità a causa del cambiamento climatico globale e dell'eutrofizzazione dei corpi idrici, mettendo in pericolo il valore ricreativo degli stessi e la sicurezza delle forniture di acqua potabile. I pericoli legati alla contaminazione cianobatterica sono stati riconosciuti e affrontati dalle autorità – WHO, EFSA (*European Food Safety Authority*) e USEPA. Per la gestione delle fioriture cianobatteriche è stato proposto il principio di precauzione, il che significa che la fioritura è considerata pericolosa fino a quando non ne sia dimostrata la sicurezza (Otten *et al.*, 2005). Nonostante i sintomi gastrointestinali siano il malessere più segnalato e diffuso dopo l'esposizione orale alle tossine cianobatteriche, la ricerca si concentra principalmente sulla tossicità delle tossine isolate, cioè MC epatotossiche e CYN, specificatamente per gli organi interni. Dopo l'esposizione orale, via di esposizione più importante per l'uomo, l'epitelio intestinale è esposto alle più alte concentrazioni di tossine, ed è la prima barriera che deve essere superata dalle tossine per raggiungere il flusso sanguigno e successivamente, essere distribuite ad altri organi/recettori di tossicità come il fegato. Tuttavia, gli effetti gastrointestinali e immunomodulatori non sono stati affrontati ancora sufficientemente, compresi i dati che consentono di valutare quantitativamente le relazioni dose-risposta per gli esiti avversi acuti e cronici nel tratto gastrointestinale in risposta a singoli componenti tossici delle fioriture acquatiche o alla loro miscela complessa.

I disturbi dell'equilibrio immunologico, compresa l'infiammazione prolungata, possono aprire la strada ad altre condizioni croniche, tra cui la carcinogenesi (Ullman *et al.*, 2011). Esiste una notevole lacuna di dati per quanto riguarda l'esposizione (cronica) per via orale ai componenti delle fioriture cianobatteriche, che può essere coperta da studi epidemiologici abbinati a un monitoraggio approfondito delle tossine cianobatteriche e dell'abbondanza di composti associati alle fioriture.

Inoltre, sottopopolazioni sensibili come i bambini e le persone con infiammazioni gastrointestinali croniche (es. la malattia di Crohn) sono esposti a un rischio più alto, che deve essere considerato negli studi di valutazione del rischio. Questi gruppi soffrono più spesso e per enteriti più gravi, dato che il sistema immunitario della mucosa è ancora in fase di sviluppo o in uno stato permanentemente infiammato. Inoltre, per quanto riguarda il potenziale cancerogeno e genotossico delle microcistine, l'esposizione cronica a basso livello può contribuire al carcinoma del colon negli anni successivi (Ullman *et al.*, 2011; Falconer *et al.*, 1999; Falconer *et al.*, 2006; Miller *et al.*, 2017). Recenti studi (Greer *et al.*, 2018) hanno dimostrato che circa l'1,1 % della dose di microcistine -LR (2 µg/kg/giorno) somministrate oralmente nel cibo di maiali nel corso di 13 settimane veniva ritenuto dal 50% di questi nel tessuto epatico, dal quale col tempo possono essere rilasciate in circolo. Questi risultati hanno sottolineato il rischio rappresentato dalla possibilità di accumulo di questa tossina nel tessuto epatico umano esposto cronicamente a dosi subacute.

Nella complessa miscela naturale delle tossine da fioriture cianobatteriche, molteplici fattori possono contribuire all'effetto negativo osservato sul tratto gastrointestinale e sull'associato sistema immunitario delle mucose. Tuttavia, anche le tossine isolate sono segnalate per l'influenza negativa sull'intestino tenue (MC-LR e CYN) o lo stomaco (CYN), sottolineando l'importanza di ulteriori indagini su questo sistema pertinente.

Persino la MC-LR, per la quale le scarse prove sull'irritazione del tratto gastrointestinale sono più evidenti, dovrebbe essere riconsiderata come enterotossina.

Come già affermato più sopra, non sono ancora disponibili dati scientifici bastanti a definire una certa soglia di protezione dall'effetto cancerogenico delle microcistine, anche se soglie di protezione dagli effetti cronici vengono proposte considerando livelli di tossine sempre più bassi. La variante -LR è stata la microcistina più studiata da questo punto di vista, almeno per gli effetti

acuti, ma recenti studi (Xiao *et al.*, 2018) presentano la tesi che le varianti finora conosciute abbiano attitudini diverse per le varie esposizioni (acuta e cronica), e che quelle finora sospettate avere una tossicità minore (tra cui la MC-RR) per l'effetto acuto, siano in realtà più nocive nell'esposizione cronica.

La sempre più numerosa acquisizione di evidenze riguardanti l'esposizione cancerogena umana, piuttosto che da modelli animali, depone per la validità dell'approccio cautelativo nei riguardi della presenza di tossine algali nell'alimento consumato, verso la quale è comunque opportuna l'informazione pubblica e la raccomandazione per l'esclusione dal consumo.

BIBLIOGRAFIA

- Aboal M, Puig MA, Mateo P, Perona E. Implications of cyanophyte toxicity on biological monitoring of calcareous streams in north-east Spain. *Journal of Applied Phycology* 2002;14(1):49-56.
- Amé MV, Galanti LN, Menone ML, Gerpe MS, Moreno VJ, Wunderlin DA. Microcystin-LR, -RR, -YR and -LA in water samples and fishes from a shallow lake in Argentina. *Harmful Algae* 2010;9:66-73.
- Amorim A, Vasconcelos V. Dynamics of microcystins in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Toxicon* 1999;37(7):1041-52.
- Amrani A, Nasri H, Azzouz A, Kadi Y, Bouaïcha N. Variation in cyanobacterial hepatotoxin (microcystin) content of water samples and two species of fishes collected from a shallow lake in Algeria. *Arch Environ Contam Toxicol* 2014;66:379-89.
- Anderson B, Voorhees J, Phillips B, Fadness R, Stancheva R, Nichols J, Wood SA. Extracts from benthic anatoxin-producing *Phormidium* are toxic to 3 macroinvertebrate taxa at environmentally relevant concentrations. *Environmental toxicology and chemistry* 2018;37(11):2851-59.
- Annadotter H, Forssblad J. *Limnologisk Undersökning av Finjasjön; Hässleholms kommun*. Tekniska kontoret & RegitoAB: Vittsjö (Svezia); 2011. pp. 1-71.
- Aráoz R, Molgó J, De Marsac NT. Neurotoxic cyanobacterial toxins. *Toxicon* 2010;56(5):813-28.
- Azevedo, SMF, Carmichael, WW; Jochimsen, EM. Human intoxication by microcystins during renal dialysis treatment in Caruaru-Brazil. *Toxicology* 2002;181:441-46
- Badger MR, Price GD. CO₂ concentrating mechanisms in cyanobacteria: molecular components, their diversity and evolution. *J Exp Bot* 2003;54:609-22.
- Baganz D, Staaks G, Pflugmacher S, Steinberg CEW. A comparative study on microcystin-LR induced behavioural changes of two fish species (*Danio rerio* and *Leucaspis delineatus*). *Environ Toxicol* 2004;19:564-70.
- Banack SA, Caller TA, Stommel EW. The cyanobacteria derived toxin beta-N-methylamino-L-alanine and amyotrophic lateral sclerosis. *Toxins* 2010;2:2837-50.
- Banack SA, Downing TG, Spáčil Z, Purdie EL, Metcalf JS, Downing S, Esterhuizen M, Codd GA, Cox PA. Distinguishing the cyanobacterial neurotoxin β -N-methylamino-L-alanine (BMAA) from its structural isomer 2,4-diaminobutyric acid (2,4-DAB). *Toxicon* 2010;56:868-79.
- Banack SA, Metcalf JS, Jiang L, Craighead D, Ilag LL, Cox PA. Cyanobacteria produce N-(2-aminoethyl) glycine, a backbone for peptide nucleic acids which may have been the first genetic molecules for life on Earth. *PLoS One* 2012;7:e49043-e49043.
- Banack SA, Metcalf JS, Spáčil Z, Downing TG, Downing S, Long A, Nunn PB, Cox PA. Distinguishing the cyanobacterial neurotoxin beta-N-methylamino-L-alanine (BMAA) from other diamino acids. *Toxicon* 2011;57:730-38.
- Banker R, Carmeli S, Hadas O, Teltsch B, Porat R, Sukenik A. Identification of cylindrospermopsin in the cyanobacterium *Aphanizomenon ovalisporum* (Cyanophyceae) isolated from lake Kinneret, Israel. *J Phycol* 1997;33:613-6.
- Banker R, Carmeli S. Inhibitors of serine proteases from a waterbloom of the cyanobacterium *Microcystis species Tetrahedron* 1999;55(35):10835-844.
- Barbaresi S, Gherardi F. The invasion of the alien crayfish *Procambarus clarkii* in Europe, with particular reference to Italy. *Biological Invasions* 2000;2:259-64.
- Barco M, Flores C, Rivera J, Caixach J. Determination of microcystin variants and related peptides present in a water bloom of *Planktothrix (Oscillatoria) rubescens* in a Spanish drinking water reservoir by LC/ESI-MS. *Toxicon* 2004;44(8):881-86.

- Batista TG, de Sousa JS, Suput. Microcystin-LR causes the collapse of actin filaments in primary human hepatocytes. *Aquat Toxicol* 2003;65(1):85-91.
- Baumann HI, Juttner F. Inter-annual stability of oligopeptide patterns of *Planktothrix rubescens* blooms and mass mortality of *Daphnia* in Lake Hall-wilersee. *Limnologica* 2008;38(3e4):350-59.
- Behm D. Coroner cites algae in teen's death. *Milwaukee Journal Sentinel* 2003.
- Berg K, Skulberg OM, Skulberg R. Effects of 335 decaying toxic blue green algae on water quality – a laboratory study. *Arch Hydrobiol* 1987;108(4):549-63.
- Berg KA, Lyra C, Niemi RM, Heens B, Hoppu K, Erkoma K, Sivonen K, Rapala J. Virulence genes of *Aeromonas* isolates, bacterial endotoxins and cyanobacterial toxins from recreational water samples associated with human health symptoms. *J Water Health* 2011;9(4):670-79.
- Bergman B, Söderbäck E. Phosphorus-limited growth dynamics in two Baltic Sea cyanobacteria, *Nodularia* sp. and *Aphanizomenon* sp. *FEMS Microbiol Ecol* 2006;58:323-32.
- Berntzon L, Erasmie S, Celepli N, Eriksson J, Rasmussen U, Bergman B. BMAA Inhibits Nitrogen Fixation in the Cyanobacterium *Nostoc* sp. PCC 7120. *Mar Drugs* 2013;11:3091-108.
- Best JH, Eddy FB, Codd GA. Effects of purified microcystin-LR and cell extracts of *Microcystis* strains PCC 7813 and CYA 43 on cardiac function in brown trout (*Salmo trutta*) alevins. *Fish Physiol Biochem* 2001;24(3):171-78.
- Beversdorf LJ, Rude K, Weirich CA, Bartlett SL, Seeman M, Kozik C, Biese P, Gosz T, Suha M, Stempa C, Shaw C, Hedman C, Piatt J, Miller TR. Analysis of cyanobacterial metabolites in surface water and raw drinking waters reveals more than microcystin. *Water Res* 2018;140:280-90.
- Bischoff K. The toxicology of microcystin-LR: occurrence, toxicokinetics, toxicodynamics, diagnosis and treatment. *Vet Human Toxicol* 2001;43(5):294-97
- Bister B, Keller S, Baumann HI, Nicholson G, Weist S, Jung G, Sussmuth RD, Juttner F. Cyanopeptolin 963A, a chymotrypsin inhibitor of *Microcystis* PCC 7806. *J Nat Prod* 2004;67 (10):1755-57.
- Bláha L, Pavel B, Blahoskav M. Toxins produced in cyanobacterial water blooms—Toxicity and risks. *Interdiscip. Toxicol.* 2009; 2:36-41.
- Blom JF, Robinson JA, Juttner F. High grazer toxicity of [D-Asp (3) (E)-Dhb(7)]microcystin-RR of *Planktothrix rubescens* as compared to different microcystins. *Toxicon* 2001;39(12):1923-32.
- Bober B, Bialczyk J. Determination of the toxicity of the freshwater cyano- bacterium *Woronichinia naegeliana* (Unger) Elenkin. *J Appl Phycol* 2017;29(3):1355-62.
- Boesch D, Hecky R, Chair CO, Schindler D, Seitzinger S. *Eutrophication of Swedish Seas*. Valhallavägen: Swedish Environmental Protection Agency; 2006.
- Bogialli S, Bortolini C, Di Gangi IM, Di Gregorio FN, Lucentini L, Favaro G, Pastore P, Liquid chromatography-high resolution mass spectrometric methods for the surveillance monitoring of cyanotoxins in freshwaters. *Talanta* 2017;170:322-30.
- Bogialli S, Bruno M, Curini R, Di Corcia A, Laganà A, Mari B. Simple assay for analyzing five microcystins and nodularin in fish muscle tissue: hot water extraction followed by Liquid Chromatography-tandem Mass Spectrometry. *J Agric Food Chem* 2005; 53:6586-92.
- Bogialli S, Bruno M, Curini R, Di Corcia A, Fanali C, Laganà A. Monitoring algal toxins in lake water by Liquid Chromatography tandem Mass Spectrometry. *Environ Sci Technol* 2006;40:2917-23.
- Bonjouklian R, Smitka TA, Hunt AH, Occolowitz JL, Perun TJ, Doolin L, Stevenson S, Knauss L, Wijayarathne R, Szweczyk S, Patterson GML. A90720A, a serine protease inhibitor isolated from a terrestrial blue-green alga *Microchaete lohtakensis*. *Tetrahedron* 1996;52(2):395-404.
- Bouma-Gregson K, Kudela RM, Power ME. Widespread anatoxin-a detection in benthic cyanobacterial mats throughout a river network. *PloS One* 2018;13(5)e0197669.

- Bowling L. The cyanobacterial (blue-green algal) bloom in the darling/barwon river system, november-december 1991. *Sydney: Dept. of Water Resources, Technical Services Division New South Wales*. 1992.
- Brand LE, Pablo J, Compton A, Hammerschlag N, Mash DC. Cyanobacterial blooms and the occurrence of the neurotoxin, beta-N-methylamino-L-alanine (BMAA), in South Florida aquatic food webs. *Harmful Algae* 2010;9:620-35.
- Bruno M, Melchiorre S, Messineo V, Volpi F, Di Corcia A, Aragona I. Microcystin detection in contaminated fish from Italian lakes using ELISA immunoassays and LC-MS/MS analysis. In: Gault PM, Marler HJ (Ed.). *Handbook on cyanobacteria: biochemistry, biotechnology and applications*. New York, NY: Nova Science Publishers, Inc.; 2009. p. 191-210.
- Bruno M, Gallo P, Messineo V, Melchiorre S. Risk associated with microcystin presence in the environment: the case of an Italian lake (Lake Vico, central Italy). *International Journal of Environmental Protection* 2012;2(4):34-41.
- Bubik A, Sedmak B, Novinec M, Lenarcic B, Lah TT. Cytotoxic and peptidase inhibitory activities of selected non-hepatotoxic cyclic peptides from cyanobacteria. *Biol Chem* 2008;389(10):1339-46.
- Carmichael WW, Biggs DF, Gorham PR. Toxicology and pharmacological action of *Anabaena flos-aquae* toxin. *Science* 1975;187(4176): 542-44.
- Carmichael WW. Health effects of toxin producing cyanobacteria: “The CyanoHABs” *Hum. Ecol. Risk Assess.* 2001;7(5):1393-1407.
- Carmichael WW. The toxins of cyanobacteria. *Scientific American* 1994 270(1):78-86.
- Carneiro M, Gutierrez-Praena D, Osorio H, Vasconcelos V, Carvalho AP, Campos A. Proteomic analysis of anatoxin-a acute toxicity in zebrafish reveals gender specific responses and additional mechanisms of cell stress. *Ecotoxicology and environmental safety*. 2015;120:93-101.
- Cazenave J, Wunderlin DA, De los Angeles Bistoni M, Ame MV, Krause E, Pflugmacher S, Wiegand C. Uptake, tissue distribution and accumulation of microcystin-RR in *Corydoras paleatus*, *Jenynsia multidentata* and *Odontesthes bonariensis*. A field and laboratory study. *Aquatic Toxicology* 2005; 75:178-190.
- Cazenave J, Wunderlin DA, Bistoni M, de los Á Amé MV, Krause E. Uptake, tissue distribution and accumulation of microcystin-RR in *Corydoras paleatus*, *Jenynsia multidentata* and *Odontesthes bonariensis*. *Aquat Toxicol* 2005;75:178-190.
- Chen J, Xie P, Zhang D, Ke Z, Yang H. In situ studies on the bioaccumulation of microcystins in the phytoplanktivorous silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) stocked in Lake Taihu with dense toxin Microcystis blooms. *Aquaculture* 2006;261:1026-38.
- Chen J, Zhang D, Xie P, Wang Q, Ma Z. Simultaneous determination of microcystin contaminations in various vertebrates (fish, turtle, duck and water bird) from a large eutrophic Chinese lake, Lake Taihu, with toxic Microcystis blooms. *Sci Total Environ* 2009b; 407:3317-22.
- Chen J, Xie P. Seasonal dynamics of the hepatotoxic microcystins in various organs of four freshwater bivalves from the large eutrophic Lake Taihu of subtropical China and the risk to human consumption. *Environmental Toxicology*, 2005;20(6):572-84.
- Chen J, Xie P, Zhang D, Ke Z, Yang H. In situ studies on the bioaccumulation of microcystins in the phytoplanktivorous silver carp stocked in Lake Taihu with dense toxic Microcystis blooms. *Aquaculture* 2006;261:1026-28.
- Chiu AS, Gehring MM, Welch JH, Neilan BA. Does α -amino- β -methylaminopropionic acid (BMAA) play a role in neurodegeneration? *Int J Environ Res Public Health* 2011;8:3728-46.
- Chlipala GE, Mo S, Orjala J. Chemodiversity in freshwater and terrestrial cyanobacteria - a source for drug discovery. *Curr Drug Targets* 2011;12(11):1654-73.

- Chorus I, Bartram J. *Toxic cyanobacteria in water: A guide to their public health consequences, monitoring and management*. Boca Raton, FL: CRC Press; 1999.
- Chorus I, Fastner J. Recreational exposure to cyanotoxins. In: Chorus I (Ed.). *Cyanotoxins: occurrence, causes, consequences*. Berlin: Springer; 2001. p. 190-99.
- Christiansen G, Fastner J, Erhard M, Borner T, Dittmann E. Microcystin biosynthesis in *Planktothrix*: genes, evolution, and manipulation. *J Bacterio*. 2003;185(2):564-72.
- Codd GA. Cyanobacterial toxins: occurrence, properties and biological significance. *Water Sci Technol* 1995;32:149-56.
- Cohen SA. Analytical techniques for the detection of alpha-amino-beta-methylaminopropionic acid. *Analyst* 2012;137:1991-2005.
- Combes A, El Abdellaoui S, Sarazin C, Vial J, Mejean A, Ploux O, Pichon V, Group B. Validation of the analytical procedure for the determination of the neurotoxin β -N-methyl amino-L-alanine in complex environmental samples. *Anal Chim Acta* 2013;771:42-9.
- Conley DJ, Paerl HW, Howarth RW, Boesch DF, Seitzinger SP, Havens KE, Lancelot C, Likens GE, Controlling eutrophication: nitrogen and phosphorus. *Science* 2009;33:1014-15.
- Cook CM, Vardaka E, Lanaras T. Toxic cyanobacteria in Greek freshwaters, 1987-2000: Occurrence, toxicity, and impacts in the Mediterranean region. *Acta Hydrochim Hydrobiol* 2004;32:107-24.
- Costa M, Costa-Rodrigues J, Fernandes MH, Barros P, Vasconcelos V, Martins R. Marine cyanobacteria compounds with anticancer properties: A review on the implication of apoptosis. *Mar Drug* 2012;10:2181-207.
- Cowx IG. Review of the methods for estimating fish population size from survey removal data. *Aquac Res* 1983;14:67-82.
- Cox PA, Banack SA, Murch SJ, Rasmussen U, Tien G, Bidigare RR, Metcalf JS, Morrison LF, Codd GA, Bergman B. Diverse taxa of cyanobacteria produce beta-N-methylamino-L-alanine, a neurotoxic amino acid. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005;102:5074-78.
- Cox PA, Banack SA, Murch SJ. Biomagnification of cyanobacterial neurotoxins and neurodegenerative disease among the Chamorro people of Guam. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:13380-383.
- Cox PA, Richer R, Metcalf JS, Banack SA, Codd GA, Bradley WG. Cyanobacteria and BMAA exposure from desert dust: A possible link to sporadic ALS among Gulf War veterans. *Amyotroph Late Scler* 2009;10(Suppl. 2):109-17.
- Craighead D, Metcalf JS, Banack SA, Amgalan L, Reynolds HV, Batmunkh M. Presence of the neurotoxic amino acids beta-N-methylamino-L-alanine (BMAA) and 2,4-diamino-butyric acid (DAB) in shallow springs from the Gobi Desert. *Amyotroph Later Scler* 2009;10 (Suppl. S2):96-100.
- Dantas EW, Moura AN, Bittencourt-Oliveira MC. Cyanobacterial blooms in stratified and destratified eutrophic reservoirs in semi-arid region of Brazil. *An Acad Bras Cienc* 2011;83:1327-38.
- Dao TS, Ortiz-Rodriguez R, Do-Hong LC, Wiegand C. Non-microcystin and non-cylindrospermopsin producing cyanobacteria affect the biochemical responses and behavior of *Daphnia magna*. *Int Rev Hydrobiol* 2013;98(5):235-44.
- Dawson RM. The toxicology of microcystins. *Toxicon* 1998;36:953-62.
- De Figueired DR, Azeiteiro UM, Esteves SM, Goncalves FJM, Pereira MJ, Microcystin-producing blooms—a serious global public health issue. *Ecotox Environ Safe* 2004;59:151-63.
- Degerholm J, Gundersen KKM, Nilsson U, Ilag L. Strategy for quantifying trace levels of BMAA in cyanobacteria by LC/MS/MS. *Anal Bioanal Chem* 2013;405:1283-92.
- Dittmann E, Wiegand C. Cyanobacterial toxins—occurrence, biosynthesis and impact on human affairs. *Molecular nutrition & food research* 2006;50(1):7-17.

- Dixit RB, Suseela MR. Cyanobacteria: Potential candidates for drug discovery. *Antonie Leeuwenhoek* 2013;103:947-61.
- Dunlop RA, Cox PA, Banack SA, Rodgers KJ. The non-protein amino acid BMAA is misincorporated into human proteins in place of l-serine causing protein misfolding and aggregation. *PLoS One* 2013;8:e75376.
- El Ghazali I, Saqrane S, Carvalho AP, Ouahid Y, Del Campo FF, Vasconcelos V, *et al.* Effect of different microcystin profiles on toxin bioaccumulation in common carp (*Cyprinus carpio*) larvae via *Artemia nauplii* *Ecotoxicol Environ Saf* 2010;73:762-70.
- Elkobi-Peer S, Carmeli S. New prenylated aeruginosin, microphycin, anabaenopeptin and micropeptin analogues from a *Microcystis* bloom material collected in Kibbutz Kfar Blum, Israel. *Mar. Drugs* 2015;13:2347-75.
- Ernst B, Hoeger SJ, O'Brien E, Dietrich DR. Oral toxicity of the microcystin- containing cyanobacterium *Planktothrix rubescens* in European whitefish (*Coregonus lavaretus*). *Aquatic Toxicology* 2006; 79:31-40.
- Esterhuizen M, Downing TG. Beta-N-methylamino-L-alanine (BMAA) in novel South African cyanobacterial isolates. *Ecotoxicol Environ Saf* 2008;71:309-13.
- Faassen EJ, Gillissen F, Zweers HAJ, Lüring M. Determination of the neurotoxins BMAA (β -N-methylamino-L-alanine) and DAB (α -, γ -diaminobutyric acid) by LC-MSMS in Dutch urban waters with cyanobacterial blooms. *Amyotroph Later Scler* 2009;10:79-84.
- Faassen EJ. Presence of the neurotoxin BMAA in aquatic ecosystems: What do we really know? *Toxins* 2014;6:1109-38.
- Falconer I, Humpage A. Health risk assessment of cyanobacterial (Blue-green Algal) toxins in drinking water. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 2005;2(1):43-50.
- Falconer I. Is there a human health hazard from microcystins in the drinking water supply? *Acta Hydrochimica et Hydrobiologica* 2005;33(1):64-71.
- Falconer I, Bartram J, Chorus I, Duiper-Goodman T, Utkilen H, Burch M, Codd GA. Toxic cyanobacteria in water: a guide to public health significance, monitoring and management. In: Chorus I, Bartram J. *Toxic cyanobacteria in water: A guide to their public health consequences, monitoring and management*. Boca Raton, FL: CRC Press; 1999. p. 156-78.
- Falconer I, Humpage AR. Cyanobacterial (blue-green algal) toxins in water supplies: cylindrospermopsins. *Environ Toxicol* 2006;21:299-304.
- Falconer I, Smith JV, Jackson ARB. Oral toxicity of a bloom of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* administered to mice over periods of up to one year. *J Toxicol Environ Health* 1988;24(3):291-305.
- Fastner J, Erhard M, Döhren H. Determination of oligopeptide diversity within a natural population of *Microcystis* spp. (Cyanobacteria) by typing single colonies by matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry. *Appl Environ Microbiol* 2001;67:5069-76.
- Fastner J, Wirsing B, Wiedner C, Heinze R, Neumann U, Chorus I. Microcystins and hepatocyte toxicity. In: Chorus I (Ed.) *Cyanotoxins: occurrence, causes, consequences*. Berlin: Springer; 2001. p. 22-37.
- Fawell JK, Mitchell RE, Hill RE, Everett DJ. The toxicity of cyanobacterial toxins in the mouse: II anatoxin-a. *Human & experimental toxicology*. 1999;18(3):168-73.
- Ferranti P, Fabbrocino S, Cerulo MG, Bruno M, Serpe L, Gallo P. Characterisation of biotoxins produced by a cyanobacteria bloom in Lake Averno using two LC-MS based techniques. *Food Addit Contam* 2008;25:1530-37.
- Ferrão-Filho AS. Bioacumulação de cianotoxinas e seus efeitos em organismos aquáticos. *Oecol Bras* 2009;13:272-312.

- Field NC, Metcalf JS, Caller TA, Banack SA, Cox PA, Stommel EW. Linking beta-methylamino-L-alanine exposure to sporadic amyotrophic lateral sclerosis in Annapolis, MD. *Toxicon* 2013;70:179-83.
- Fischer WJ, Dietrich DR. Pathological and biochemical characterisation of microcystin-induced hepatopancreas and kidney damage in carp. *Toxicol Appl Pharmacol* 2000;164:73-81.
- Fischer WJ, Sltheimer S, Cattori V, Meier PJ, Dietrich DR, Hagenbuch B. Organic anion transporting polypeptides expressed in liver and brain mediate uptake of microcystin. *Toxicol Appl Pharmacol* 2005;203:257-63.
- Fisher WJ, Dietrich D. Pathological and Biochemical Characterization of MC-Induced Hepatopancreas and Kidney Damage in Carp (*Cyprinus carpio*). *Toxicol Appl Pharm* 2000;164(1):73-81.
- Flores C, Caixach J. An integrated strategy for rapid and accurate determination of free and cell-bound microcystins and related peptides in natural blooms by liquid chromatography electrospray high resolution mass spectrometry and matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight/time-of-flight mass spectrometry using both positive and negative ionization modes. *J Chromatogr A* 2015;1407:76-89.
- Flores NM, Miller TR, Stockwell JD. A Global Analysis of the relationship between concentrations of microcystins in water and fish. *Fron Mar Sci* 2018.
- Fonseca VB, Sopezki MS, Zanette J. Effect of a toxic *Microcystis aeruginosa* lysate on the mRNA expression of proto-oncogenes and tumor suppressor genes in zebrafish. *Ecotoxicol Environ Saf* 2018;161:729-34.
- Frosco SM, Humpage AR, Wickramasinghe W, Shaw G, Falconer I. Interaction of the cyanobacterial toxin cylindrospermopsin with the eukaryotic protein synthesis system. *Toxicon* 2008;51:191-8.
- Fujii K, Harada K.-I, Suzuki M, Kondo F, Ikai Y, Oka H, Carmichael WW, Sivonen K. Occurrence of novel cyclic peptides together with microcystins from toxic cyanobacteria, *Anabaena* species. In: Yasumoto T, Oshima Y, Fukuyo Y (Ed.) *Harmful and toxic algal bloom*. Paris: Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO; 1996. p. 559-62.
- Fujii K, Sivonen K, Nakano T, Harada K.-I. Structural elucidation of cyanobacterial peptides encoded by peptide synthetase gene in *Anabaena* species. *Tetrahedron* 2002;58:6863-71.
- Gademann K, Portmann C, Blom JF, Zeder M, Juttner F. Multiple toxin production in the cyanobacterium *Microcystis*: isolation of the toxic protease inhibitor cyanopeptolin 1020. *J Nat Prod* 2010; 73(5):980-84.
- Gademann K, Portmann C. Secondary metabolites from cyanobacteria: complex structures and powerful bioactivities. *Curr Org Chem* 2008;12(4):326-41.
- Gallon JR, Evans AM, Jones DA, Albertano P, Congestri R, Bergman B, Gundersen K, Orcutt KM. Maximum rates of N₂ fixation and primary production are out of phase in a developing cyanobacterial bloom in the Baltic Sea. *Limnol Oceanogr* 2002;47:1514-21.
- Gan F, Zhang S, Rockwell NC, Martin SS, Lagarias C, Bryant DA. Extensive remodeling of a cyanobacterial photosynthetic apparatus in far-red light. *Science* 2014;345:1312-17.
- Gkelis S, Harjunpää V, Lanaras T, Sivonen K. Diversity of hepatotoxic microcystins and bioactive anabaenopeptins in cyanobacterial blooms from Greek freshwaters. *Environ Toxicol* 2005;20:249-56.
- Gkelis S, Lanaras T, Sivonen K. The presence of microcystins and other cyanobacterial bioactive peptides in aquatic fauna collected from Greek freshwaters. *Aquat Toxicol* 2006;78:32-41.
- Gkelis S, Moustaka-Gouni M, Sivonen K, Lanaras T. First report of the cyanobacterium *Aphanizomenon ovalisporum* Forti in two Greek lakes and cyanotoxin occurrence. *J Plankton Res* 2005;27:1295-300.
- Gkelis S, Papadimitriou T, Zaoutsos N, Leonardos I. Anthropogenic and climate-induced change favors toxic cyanobacteria blooms: Evidence from monitoring a highly eutrophic, urban Mediterranean lake. *Harmful Algae* 2014;39:322-33.

- Gkelis S, Zaoutsos N. Cyanotoxin occurrence and potentially toxin producing cyanobacteria in freshwaters of Greece: A multi-disciplinary approach. *Toxicon* 2014;78:1-9.
- Gkelis S. *Characterisation of planktic cyanobacteria and their bioactive peptides*. [Ph.D. Thesis]. Thessaloniki, Greece: Aristotle University of Thessaloniki; 2006.
- Gorham T, Dowling Root E, Jia Y, Shum CK, Lee J. Relationship between cyanobacterial bloom impacted drinking water sources and hepatocellular carcinoma incidence rates. *Harmful Algae* 2020;95(101801): 1-7.
- Grabowska M, Kobos J, Torunska-Sitarz A, Mazur-Marzec H. Non-ribosomal peptides produced by *Planktothrix agardhii* from Siemianowka dam reservoir SDR (northeast Poland). *Arch Microbiol* 2014;196(10):697-707.
- Grach-Pogrebinsky O, Sedmak B, Carmeli S. Protease inhibitors from a Slovenian lake Bled toxic waterbloom of the cyanobacterium *Planktothrix rubescens*. *Tetrahedron* 2003;59:8329-36.
- Greer B, Meneely JP, Elliott CT. Uptake and accumulation of Microcystin-LR based on exposure through drinking water: An animal model assessing the human health risk. *Nature, Scientific Reports* 2018;8:4913.
- Griffiths DJ, Saker ML. The Palm Island mystery disease 20 years on: a review of research on the cyanotoxin cylindrospermopsin. *Environ Toxicol* 2003;18(2):78-93.
- Grosse Y, Baan R, Secretan B, Straif K, El Ghissassi F, Cogliano V. Carcinogenicity of nitrate, nitrite, and cyanobacterial peptide. *Toxins* 2006;7:628-29.
- Gugger M, Lenoir S, Berger C, Ledreux A, Druart JC, Humbert JF, Bernard C. First report in a river in France of the benthic cyanobacterium *Phormidium favosum* producing anatoxin-a associated with dog neurotoxicosis. *Toxicon* 2005;45(7):919-28.
- Haddad SP, Bobbitt JM, Taylor RB, Lovin LM, Conkle JL, Chambliss CK, Brooks BW. Determination of microcystins, nodularin, anatoxin-a, cylindrospermopsin, and saxitoxin in water and fish tissue using isotope dilution liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Journal of chromatography* 2019;A:1599:66.
- Hanessian S, Del Valle JR, Xue Y, Blomberg N. Total synthesis and structural confirmation of chlorodysinosin. *A J Am Chem Soc* 2006;128(32):10491-95.
- Harada KI, Ohtani I, Iwamoto K, Suzuki M, Watanabe MF, Watanabe M, Terao K. Isolation of cylindrospermopsin from a cyanobacterium *Umezakia natans* and its screening method. *Toxicon* 1994;32:73-84.
- Hauser-Davis RA, Lavradas RT, Lavandier RC, Rojas EGA, Guarino AW, Ziolli RL. Accumulation and toxic effects of microcystin in Tilapia (*Oreochromis niloticus*) from an eutrophic Brazilian lagoon. *Ecotoxicol Environ Saf* 2015;112:132-36.
- Hawkins PR, Chandrasena NR, Jones GJ, Humpage AR, Falconer IR. Isolation and toxicity of *Cylindrospermopsis raciborskii* from an ornamental lake. *Toxicon* 1997;35(3):341-6.
- Hawkins PR, Runnegar MTC, Jackson ARB, Falconer IR. Severe hepatotoxicity caused by the tropical cyanobacterium (blue-green alga) *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska) Seenaya and Subba Raju isolated from a domestic water supply reservoir. *Appl Environ Microbiol* 1985;50:1292-5.
- Heinze. Toxicity of the cyanobacterial toxin microcystin-LR to rats after 28 days intake with drinking water. *Environ Toxicol* 1999;14:17-60.
- Herbert RB, Holliman FG. Aeruginosin B. A naturally occurring phenazine-sulfonic acid. *Proc Chem Soc* 1964;19.
- Hulot FD, Carmignac D, Legendre S, Yepremian C, Bernard C. Effects of microcystin-producing and microcystin-free strains of *Planktothrix agardhii* on long-term population dynamics of *Daphnia magna*. *Annales De Limnologie- International Journal of Limnology* 2012;48(3):337-47.

- Humpage AR, Fontaine F, Froschio S, Burcham P, Falconer IR. Cylindrospermopsin genotoxicity and cytotoxicity: role of cytochrome P-450 and oxidative stress. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, 2005;68:739-53.
- Ibelings BW, Chorus AR. Accumulation of cyanobacterial toxins in freshwater “seafood” and its consequences for public health: A review. *Environ Pollut* 2007;150:177-92.
- Ishida K, Nakagawa H, Murakami M. Microcyclamide, a cytotoxic cyclic hexapeptide from the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. *J Nat Prod* 2000b;63(9):1315-17.
- Ito E, Takai A, Kondo F, Masui H, Imanishi S, Harada K. Comparison of protein phosphatase inhibitory activity and apparent toxicity of microcystins and related compound. *Toxicon* 2002;40:1017-25.
- Ito E, Kondo F, Harada K. Hepatic necrosis in aged mice by oral administration of microcystin-LR. *Toxicon* 1997a;35(2):231-9.
- Ito Y, Ishida K, Shin HJ, Murakami M. Oscillapeptins A to F, serine pro- tease inhibitors from the three strains of *Oscillatoria agardhii*. *Tetrahedron* 1999;55:6871-82.
- Ito Y, Suzuki S, Ishida K, Murakami M. Anabaenopeptins G and H, potent carboxypeptidase A inhibitors from the cyanobacterium *Oscillatoria agardhii* (NIES-595). *Bioor Med Chem Lett* 1999; 9:1243-46.
- Jewel MA, Affan MA, Khan S. Fish mortality due to cyanobacterial bloom in an aquaculture pond in Bangladesh. *Pakistan Journal of Biological Science* 2003;6:1046-50.
- Jiang L, Aigret B, Borggraeve W, Spacil Z, Ilag L. Selective LC-MS/MS method for the identification of BMAA from its isomers in biological samples. *Anal Bioana Chem* 2012 403:1719-30.
- Jiang L, Ilag LL. Detection of endogenous BMAA in dinoflagellate (*Heterocapsa triquetra*) hints at evolutionary conservation and environmental concern. *PubRaw Sci* 2014;1:1-8.
- Jiang LY, Eriksson J, Lage S, Jonasson S, Shams S, Mehine M, Ilag LL, Rasmussen U. Diatoms: A novel source for the neurotoxin BMAA in aquatic environments. *PLoS One* 2014;9:e84578.
- Jiao Y, Chen Q, Chen X, Wang X, Liao X, Jiang L, Wu J, Yang L. Occurrence and transfer of a cyanobacterial neurotoxin β -methylamino-L-alanine within the aquatic food webs of Gonghu Bay (Lake Taihu, China) to evaluate the potential human health risk. *Sci Total Environ* 2014;468-69, 457-63.
- Johnson HE, King SR, Banack SA, Webster C, Callanaupa WJ, Cox PA. Cyanobacteria (*Nostoc commune*) used as a dietary item in the Peruvian highlands produce the neurotoxic amino acid BMAA. *J Ethnopharmacol* 2008;118:159-65.
- Jonasson S, Eriksson J, Berntzon L, Spáčil Z, Ilag LL, Ronnevi LO, Rasmussen U, Bergman B. Transfer of a cyanobacterial neurotoxin within a temperate aquatic ecosystem suggests pathways for human exposure. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010;107:9252-57.
- Kagalou I, Papadimitriou T, Bacopoulos V, Leonardos I. Assessment of Microcystins in Lake Water and the Omnivorous Fish (*Carassius gibelio*, Bloch) in Lake Pamvotis (Greece) Containing Dense Cyanobacterial Bloom. *Environ Monit Assess* 2008;137:185-95.
- Karamyan VT, Speth RC. Animal models of BMAA neurotoxicity: A critical review. *Life Sci* 2008;82:233-46.
- Karjalainen M, Reinikainen M, Spoof L, Meriluoto JA, Sivonen K, Viitasalo M. Trophic transfer of cyanobacterial toxins from zooplankton to planktivores: consequences for pike larvae and mysid shrimps. *Environ Toxicol* 2005;20:354-62.
- Kehr JC, Picchi DG, Dittmann E. Natural product biosynthesis in cyanobacteria: A treasure trove of unique enzymes. *Beilstein J Org Chem* 2011;7:1622-35.
- Keil C, Forchert A, Fastner J, Szewzyk U, Rotard W, Chorus I, Kratke R. Toxicity and microcystin content of extracts from a *Planktothrix* bloom and two laboratory strains. *Water Res* 2002;36(8):2133-39.

- Kinnear SHW, Fabbro LD, Duivenvoorden LJ, Hibberd E. Multiple-organ toxicity resulting from cylindrospermopsin exposure in tadpoles of the cane toad (*Bufo marinus*). *Environ Toxicol* 2007;22:550-8.
- Kodani S, Suzuki S, Ishida K, Murakami M. Five new cyanobacterial peptides from water bloom materials of lake Teganuma (Japan). *FEMS Micro-biol. Lett* 1999;178(2):343-8.
- Kohler E, Grundler V, Haeussinger D, Kurmayer R, Gademann K, Pernthaler J, Blom JF. The toxicity and enzyme activity of a chlorine and sulfate containing aeruginosin isolated from a non-microcystin-producing *Plankto-thrix* strain. *Harmful Algae* 2014;39:154-60.
- Kondo F, Ikai Y, Oka H. Formation, characterization, and toxicity of the glutathione and cysteine conjugates of toxic heptapeptide microcystins. *Chemical Research in Toxicology* 1992;5(5)591-96.
- Kosol S, Schmidt J, Kurmayer R. Variation in peptide net production and growth among strains of the toxic cyanobacterium *Planktothrix* spp. *Eur J Phycol* 2009;44(1):49-62.
- Kotak BG, Zurawell RW, Prepas EE, Holmes FB. Microcystin-LR concentration in aquatic food web compartments from lakes of varying trophic status. *Can J Fish Aquat Sci* 1996;53:1974-85.
- Kruger T, Oelmüller R, Luckas B. The origin of β -N-methylamino-L-alanine (BMAA): Cycads and/or cyanobacteria? *J Endocytobiosis Cell Res* 2012;22:29-36.
- Kurmayer R, Schober E, Tonk L, Visser PM, Christiansen G. Spatial divergence in the proportions of genes encoding toxic peptide synthesis among populations of the cyanobacterium *Planktothrix* in European lakes. *FEMS Microbiol Lett* 2011;317:127-37.
- Lage S, Costa PR, Moita T, Eriksson J, Rasmussen U, Rydberg SJ. BMAA in shellfish from two Portuguese transitional water bodies suggests the marine dinoflagellate *Gymnodinium catenatum* as a potential BMAA source. *Aquat Toxicol* 2014;152:131-38.
- Lance E, Petit A, Sanchez W, Paty C, Gérard C, Bormans M. Evidence of trophic transfer of microcystins from the gastropod *Lymnaea stagnalis* to the fish *Gasterosteus aculeatus*. *Harmful Algae* 2014;31:9-17.
- Landsberg JH. Toxins and harmful mechanisms. The effect of harmful algal blooms on aquatic organisms. *Rev Fisheries Sci* 2002;10:191-93.
- Lawton LA, Edwards C. Conventional laboratory methods for cyanotoxins. In: Hudnell KH (Ed.). *Cyanobacterial harmful algal blooms: state of the science and research needs*. New York: Springer, 2008. p. 513-37. (Advances in Experimental Medicine and Biology 619).
- Le Manach S, Khenfch N, Huet H, Qiao Q, Duval C, Marie A, Bolbach G, Clodic G, Djediat C, Bernard C, Edery M, Marie B. Gender-specific toxicological effects of chronic exposure to pure microcystin-LR or complex microcystin aeruginosa extracts on adult medaka fish. *Environ Sci Technol* 2016;50(15):8324-34.
- Lee J, Lee S, Jiang X. Cyanobacterial toxins in freshwater and food: important sources of exposure to humans. *Annu. Rev Food Sci Technol* 2017;8:281-304.
- Lee M, Mc Geer PL. Weak BMAA toxicity compares with that of the dietary supplement beta-alanine. *Neurobiol. Aging* 2012;33:1440-47.
- Li AF, Tian ZJ, Li J, Yu RC, Banack SA, Wang ZY. Detection of the neurotoxin BMAA within cyanobacteria isolated from freshwater in China. *Toxicon* 2010;55:947-53.
- Li RH, Carmichael WW, Brittain S, Eaglesham GK, Sha, GR, Liu YD, Watanabe MM. First report of the cyanotoxin cylindrospermopsin and deoxy-cylindrospermopsin from *Raphidiopsis curvata* (Cyanobacteria). *J Phycol* 2001;37:1121-6.
- Li Z, Guo JS, Fang F, Chen J, Zhang C, Tian G. Seasonal variation of nitrogen in Xiaojiang backwater area, Three Gorges Reservoir. *Environ Sci* 2009 ;30:1588-94.

- Liang Y, Ouyang K, Chen XL, Su YQ, Yang JX. Life strategy and grazing intensity responses of *Brachionus calyciflorus* fed on different concentrations of microcystin-producing and microcystin-free *Microcystis aeruginosa*. *Sci Rep* 2017;7.
- Lifshits M, Carmeli S. Metabolites of microcystis aeruginosa bloom material from lake Kinneret, Israel. *J Nat Prod* 2012;75(2):209-19.
- Liu XQ, Rush T, Ciske J, Lobner D. Selective death of cholinergic neurons induced by beta-methylamino-L-alanine. *Neuroreport* 2010;21:55-8.
- Lobner D, Piana PMT, Salous AK, Peoples RW. Beta-N-methylamino-L-alanine enhances neurotoxicity through multiple mechanisms. *Neurobiol Dis* 2007;25:360-6.
- Lopes VR, Ramos V, Martins A, Sousa M, Welker M, Antunes A, Vasconcelos VM. Phylogenetic, chemical and morphological diversity of cyanobacteria from Portuguese temperate estuaries. *Mar. Environ Res* 2012;73:7-16.
- Luesch H, Yoshida WY, Richard E, Moore RE, Paul VJ, Corbett TH. Total structure determination of apratoxin A, a potent novel cytotoxin from the marine cyanobacterium *Lyngbya majuscula*. *J Am Chem Soc* 2001;123:5418-23.
- Lynch AJ, Cooke SJ, Deines AM, Bower SD, Bunnell DB, Cowx IG. The social, economic, and environmental importance of inland fish and fisheries. *Environ Rev* 2016;24:115-121.
- Magalhães VF, Soares R, Azevedo S. Microcystin contamination in fish from the Jacarepagua Lagoon (Rio de Janeiro, Brazil): ecological implication and human health risk. *Toxicon* 2001;39:1077-85.
- Magalhães VF, Marinho MM, Domingos P, Oliveira AC, Costa SM, Azevedo LO, Azevedo SM. Microcystins (cyanobacterial hepatotoxins) bioaccumulation in fish and crustaceans from Septiba Bay (Brasil, RJ). *Toxicon* 2003 42:289-295.
- Magalhaes VF, 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.
- Maire MA, Bazin E, Fessard V, Rast C, Humpage AR, Vasseur P. Morphological cell transformation of Syrian hamster embryo (SHE) cells by the cyanotoxin, cylindrospermopsin. *Toxicon* 2010;55:1317-22.
- Malbrouck C, Kestemont P. Effect of microcystins on fish. *Environmental Toxicology and Chemistry* 2006;25(1):72-86.
- Manti G, Mattei D, Messineo V, Melchiorre S, Bogianni S, Sechi N, Casiddu P, Lugliè A, Di Brizio M, Bruno M. First report of *Cylindrospermopsis raciborskii* in Italy. *Harmful Algae News* 2005;28:8-9.
- Martins J, Saker ML, Moreira C, Welker M, Fastner J, Vasconcelos VM. Peptide diversity in strains of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* isolated from Portuguese water supplies. *Appl Microbiol Biotechnol* 2009;82:951-61.
- Masseret E, Banack S, Boumédiène F, Abadie E, Briant L, Pernet F, Juntas-Morales R, Pageot N, Metcalf J, Cox P. The French Network on A.L.S.: Investigation, dietary BMAA exposure in an amyotrophic lateral sclerosis cluster from Southern France. *PLoS One* 2013;8:e83406.
- Merel S, Walker D, Chicana R, Snyder S, Baures E, Thomas O. State of knowledge and concerns on cyanobacterial blooms and cyanotoxins. *Environ Int* 2013;59:303-27.
- Messineo V, Melchiorre S, Di Corcia A, Gallo P, Bruno M. Seasonal succession of *Cylindrospermopsis raciborskii* and *Aphanizomenon ovalisporum* blooms with cylindrospermopsin occurrence in the volcanic lake Albano, Central Italy. *Environ Toxicol*; 2008.
- Metcalf JS, Banack SA, Lindsay J, Morrison LF, Cox PA, Codd GA. Co-occurrence of beta-N-methylamino-L-alanine, a neurotoxic amino acid with other cyanobacterial toxins in British waterbodies, 1990-2004. *Environ. Microbiol* 2008;10:702-8.

- Metcalf J, Barakate A, Codd GA. Inhibition of plant protein synthesis by the cyanobacterial hepatotoxin, cylindrospermopsin. *FEMS Microbiol Lett* 2004;235:125-9.
- Miller TR, Beversdorf LJ, Weirich CA, Bartlett SL. Cyanobacterial toxins of the Laurentian Great Lakes, their toxicological effects, and numerical limits in drinking water. *Mar Drugs* 2017;15:160.
- Mohamed ZA, Carmichael WW, Hussein AA. Estimation of microcystins in the freshwater fish *Oreochromis niloticus* in an Egyptian fish farm containing a *Microcystis* bloom. *Environmental Toxicology*,2003;18(2):137-41.
- Mondo K, Broc Glover W, Murch SJ, Liu G, Cai Y, Davis DA, Mash DC. Environmental neurotoxins beta-N-methylamino-L-alanine (BMAA) and mercury in shark cartilage dietary supplements. *Food Chem Toxicol* 2014;70:26-32.
- Mondo K, Hammerschlag N, Basile M, Pablo J, Banack SA, Mash DC. Cyanobacterial neurotoxin beta-N-methylamino-L-alanine (BMAA) in shark fins. *Mar Drugs* 2012;10:509-20.
- Morais J, Augusto M, Carvalho AP, Vale M, Vasconcelos VM. Cyanobacteria hepatotoxins, microcystins: bioavailability in contaminated mussels exposed to different environmental conditions. *European Food Research and Technology* 2008;227(3):949-52.
- Muller D, Krick A, Kehraus S, Mehner C, Hart M, Kupper FC, Saxena K, Prinz H, Schwalbe H, Janning P, Waldmann H, Konig GM. Brunsvi- camides A-C: sponge-related cyanobacterial peptides with *mycobacterium tuberculosis* protein tyrosine phosphatase inhibitory activity. *J Med Chem* 2006;49(16):4871-4878.
- Murakami M, Ishida K, Okino T, Okita Y, Matsuda H, Yamaguchi K. Aeruginosins 98-A and B, trypsin inhibitors from the blue-green alga *Microcystis aeruginosa* (NIES-98). *Tetrahedron Lett* 1995;36(16):2785-88.
- Murakami M, Suzuki S, Itou Y, Kodani S, Ishida K. New anabaenopeptins, potent carboxypeptidase-A inhibitors from the cyanobacterium *Aphanizomenon flos-aquae*. *J Nat Prod* 2000;63(9):1280-82.
- Murch SJ, Cox PA, Banack SA. A mechanism for slow release of biomagnified cyanobacterial neurotoxins and neurodegenerative disease in Guam. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101:12228-31.
- Murch SJ, Cox PA, Banack SA, Steele JC, Sacks OW. Occurrence of β -methylamino-L-alanine (BMAA) in ALS/PDC patients from Guam. *Acta Neurol Scand* 2004;110:267-69.
- Namikoshi M, Rinehart KL. Bioactive compounds produced by cyanobacteria. *J Ind Microbiol. Biotechnol* 1996;17(5/6):373-84.
- Nchabeleng T, Cheng P, Oberholster P, Botha AM, Smit W, LuusPowell W. Microcystin-LR equivalent concentrations in fish tissue during a postbloom *Microcystis* exposure in Loskop Dam, South Africa. *Afr J Aquat Sci* 2014;39:459-66.
- Neilan BA, Pearson LA, Muenchhoff J, Moffitt MC, Dittmann E. Environmental conditions that influence toxin biosynthesis in cyanobacteria. *Environ Microbiol* 2013;15(5):1239-53.
- Nishiwaki-Matushima R; Nishiwaki S, Ohta T, Yosozawa S, Suganuma M, Harada K, Watanabe MF, Fujiki H. Structure-function relationships of microcystins, liver-tumor promoters, in interaction with protein phosphatase. *Jpn J Cancer Res* 1991;82:993-96.
- Nishiwaki-Matushima R, Ohta T, Nishiwaki S, Suganuma M, Yosozawa S, Kohyama K, Ishikaawa T, Carmichael WW, Fujiki H. Liver tumor promotion by the cyanobacterial cyclic peptide toxin microcystins-LR. *J Cancer Res Clin* 1992;118:420-24.
- Nishizawa T, Ueda A, Asayama M, Fujii K, Harada K-I, Ochi K. Polyketide synthase gene coupled to the peptide synthetase module involved in the biosynthesis of the cyclic heptapeptide microcystin. *J Biochem* 2000;127:779-789.
- Norris RL, Eaglesham GK, Pierens G, Shaw GR, Smith MJ, Chishwell RH, Seawright AA, Moore MR, Deoxycylindrospermopsin, an analogue of *Cylindrospermopsis raciborskii*. *Environ Toxicol* 1999;14:163-6.

- Northcott ME, Beveridge MCM, Ross LG. A laboratory investigation on the filtration and ingestion rates of the tilapia *Oreochromis niloticus*, feeding on two species of blue-green algae. *Environ Biol of Fishes* 1991;31:75-85.
- Oberholster PJ, Botha AM, Cloete TE. An overview of toxic freshwater cyanobacteria in South Africa with special reference to risk, impact and detection by molecular marker tools. *Biokemistri* 2005;17(2):57-71.
- Okino T, Matsuda H, Murakami M, Yamaguchi K. Microginin, an angiotensin-converting enzyme inhibitor from the blue-green alga *Microcystis aeruginosa*. *Tetrahedron Lett* 1993;34(3):501-4.
- Osswald J, Azevedo J, Vasconcelos V, Guilhermino L. Experimental determination of the bioconcentration factors for anatoxin-a in juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Proceedings of the International Academy of Ecology and Environmental Sciences* 2011;1(2):77.
- Osswald J, Rellán S, Carvalho AP, Gago A, Vasconcelos V. Acute effects of an anatoxin-a producing cyanobacterium on juvenile fish—*Cyprinus carpio*. *Toxicon* 2007b;49(5):693-8.
- Osswald J, Rellán S, Gago A, Vasconcelos V. Toxicology and detection methods of the alkaloid neurotoxin produced by cyanobacteria, anatoxin-a. *Environment international* 2007a;33(8):1070-89.
- Osswald J, Rellán S, Gago A, Vasconcelos V. Uptake and depuration of anatoxin-a by the mussel *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck, 1819) under laboratory conditions. *Chemosphere* 2008;72(9):1235-41.
- Ottand JL, Carmichael WW. LC/ESI/MS method development for the analysis of hepatotoxic cyclic peptide microcystins in animal tissues. *Toxicon* 2006;47(7):734-41.
- Ottaviani M, Bonadonna L. *Metodi analitici per le acque destinate al consumo umano. Volume 2. Parte 2. Metodi microbiologici*. Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2000. (Rapporti ISTISAN 00/14 Pt. 2).
- Otten TG, Paerl HW. Health effects of toxic cyanobacteria in U.S. drinking and recreational waters: our current understanding and proposed direction. *Curr Environ Health Rep* 2015;2:75-84.
- Otten TG, Paerl HW, Dreher TW, Kimmerer WJ, Parker AE. The molecular ecology of *Microcystis* sp. blooms in the san Francisco estuary. *Environ Microbiol* 2017;19(9):3619-637.
- Pablo J, Banack SA, Cox PA, Johnson TE, Papapetropoulos S, Bradley WG, Buck A, Mash DC. Cyanobacterial neurotoxin BMAA in ALS and Alzheimer's disease. *Acta Neurol Scand* 2009;120:216-25.
- Paerl HW, Huisman J. Climate change: A catalyst for global expansion of harmful cyanobacterial blooms. *Environ Microbiol Rep* 2009;1:27-37.
- Paerl HW, Huismann J. Blooms like it hot. *Science* 2008;320:57-58.
- Papadimitriou T, Kagalou I, Bacopoulos V, Leonardos I. Accumulation of microcystins in water and fish tissues: an estimation of risks associated with microcystins in most of the Greek lakes. *Environ. Toxicol.* 2009;25(4):418-27.
- Paul VJ. Global warming and cyanobacterial harmful algal blooms. In: Hudnell HK (Ed.). *Cyanobacterial Harmful Algal Blooms: State of the Science and Research Needs*. New York, NY: Springer; 2008. p. 239-57.
- Peng L, Liu Y, Chen W, Liu L, Kent M, Song L. Health risks associated with consumption of microcystin contaminated fish and shellfish in three Chinese lakes: significance for freshwater aquacultures. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 2010;73(7):1804-11.
- Pernet F, Malet N, Pastoureaud A, Vaquer A, Quéré C, Dubroca L. Marine diatoms sustain growth of bivalves in a Mediterranean lagoon. *J Sea Res* 2012;68:20-32.
- Pichardo S, Cameán AM, Jos A. *In vitro* toxicological assessment of cylindrospermopsin: a review. *Toxins* 2017;9:402.

- 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. *Aust NZJ Public Health* 1997;21(6):562-6.
- Portmann C, Blom JF, Gademann K, Juttner F. Aerucyclamides A and B: isolation and synthesis of toxic ribosomal heterocyclic peptides from the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* PCC 7806. *J Nat Prod* 2008a;71(7):1193-6.
- Portmann C, Blom JF, Kaiser M, Brun R, Juttner F, Gademann K. Isolation of aerucyclamides C and D and structure revision of microcyclamide 7806A: heterocyclic ribosomal peptides from *Microcystis aeruginosa* PCC 7806 and their antiparasite evaluation. *J Nat Prod* 2008b;71(11):1891-6.
- Poste AE, Hecky RE, Guildford SJ. Evaluating microcystins exposure risk through fish consumptions. *Environ Sci Technol* 2011;45(13): 5806-11.
- Preußel K, Stuken A, Wiedner C, Chorus I, Fastner J. First report on cylindrospermopsin producing *Aphanizomenon flos-aquae* (Cyanobacteria) isolated from two German lakes. *Toxicon* 2006;47:156-62.
- Puschner B, Pratt C, Tor ER. Treatment and diagnosis of a dog with fulminant neurological deterioration due to anatoxin-a intoxication. *Journal of veterinary emergency and critical care* 2010;20(5):518-22.
- Quiblier C, Wood SA, Echenique-Subiabre I, Heath M, Villeneuve A, Humbert JF. A review of current knowledge on toxic benthic freshwater cyanobacteria-ecology, toxin production and risk management. *Water Research* 2013;47(15):5464-79.
- Rantala A, Fewer DP, Hisbergues M, Rouhiainen L, Vaitomaa J, Borner T, Sivonen K. Phylogenetic evidence for the early evolution of microcystin synthesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101(2):568-73.
- Rao SD, Banack SA, Cox PA, Weiss JH. BMAA selectively injures motor neurons via AMPA/kainate receptor activation. *Exp Neurol* 2006;201:244-52.
- Raveh A, Carmeli S. Two novel biological active modified peptides from the cyanobacterium *Microcystis* sp. *Phytochem Lett* 2009;2(1):10-14.
- Rellán S, Osswald J, Vasconcelos V, Gago-Martinez A. Analysis of anatoxin-a in biological samples using liquid chromatography with fluorescence detection after solid phase extraction and solid phase microextraction. *Journal of Chromatography* 2007;1156(1-2):134-40.
- Repka S, Koivula M, Harjunpää V, Rouhiainen L, Sivonen K. Effects of phosphate and light on growth of and bioactive peptide production by the cyanobacterium *Anabaena* strain 90 and its anabaenopeptilide mutant. *Appl Environ Microbiol* 2004;70:4551-560.
- Reshef V, Carmeli S. Protease inhibitors from a water bloom of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. *Tetrahedron* 2001;57(14):2885-94.
- Rodger HD, Turnbull T, Edwards C, Codd GA. Cyanobacterial (Bluegreen algal) bloom associated pathology in Brown Trout (*Salmo trutta* L.) in Loch Leven, Scotland. *J Fish Dis* 1994;17:177-181.
- Rohrlack T, Dittmann E, Henning M, Borner T, Kohl JG. Role of micro-cystins in poisoning and food ingestion inhibition of *Daphnia galeata* caused by the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. *Appl. Environ Microbiol* 1999;65(2):737-39.
- Rosen J, Hellenas KE. Determination of the neurotoxin BMAA (beta-N-methylamino-L-alanine) in cycad seed and cyanobacteria by LC-MS/MS (liquid chromatography tandem mass spectrometry). *Analyst* 2008;133:1785-89.
- Rouhiainen L, Vakkilainen T, Siemer BL, Buikema W, Haselkorn R, Sivonen K. Genes coding for hepatotoxic heptapeptides (microcystins) in the cyanobacterium *Anabaena* strain 90. *Appl Environ Microbiol* 2004;70(2):686e692.
- Rücker J, Stuken A, Nixdorf B, Fastner J, Chorus I, Wiedener C. Concentrations of particulate and dissolved cylindrospermopsin in 21 *Aphanizomenon*-dominated temperate lakes. *Toxicon* 2007;50:800-9.

- Rush T, Liu X, Lobner D. Synergistic toxicity of the environmental neurotoxins methylmercury and beta-N-methylamino-L-alanine. *Neuroreport* 2012;23:216-19.
- Saker ML, Fastner J, Dittmann E, Christiansen G, Vasconcelos VM. Variation between strains of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* isolated from a Portuguese river. *J Appl Microbiol* 2005;99:749-57.
- Saker M, Eaglesham GK. The accumulation of cylindrospermopsin from the cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* in tissues of the Redclaw crayfish *Cherax quadricarinatus*. *Toxicon* 1999;37:1065-77.
- Saker M, Metcalf JS, Codd GA, Vasconcelos VM. Accumulation and depuration of the cyanobacterial toxin cylindrospermopsin in the freshwater mussel *Anodonta cygnea*. *Toxicon* 2003;43:185-94.
- Sano T, Kaya K. Oscillamide-Y, a chymotrypsin inhibitor from toxic *Oscillatoria agardhii*. *Tetrahedron* 1995;36(33):5933-36.
- Schembri M, Neila BA, Saint CP. Identification of genes implicated in toxin production in the cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii*. *Environ Toxicol* 2001;16:413-21.
- Schreuder H, Liesum A, Lonze P, Stump H, Hoffmann H, Schiell M, Kurz M, Toti L, Bauer A, Kallus C, Klemke-Jahn C, Czech J, Kramer D, Enke H, Niedermeyer THJ, Morrison V, Kumar V, Bronstrup M, Isolation, Co-crystallization and structure-based characterization of anabaenopeptins as highly potent inhibitors of activated thrombin activatable fibrinolysis inhibitor (TAFIa). *Sci Rep* 2016;6.
- Scott L, Downing L, Simoné Downing T. Potential for dietary exposure to β -N-methylamino-L-alanine and microcystin from a freshwater system. *Toxicon* 2018;150:261-266.
- Seawright AA, Nolan CC, Shaw GR. The oral toxicity for mice of the tropical cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska). *Environ Toxicol* 1999;14:135-42.
- Sedmak B, Elersek T, Grach-Pogrebinsky O, Carmeli S, Sever N, Lah TT. Ecotoxicologically relevant cyclic peptides from cyanobacterial bloom (*Planktothrix rubescens*) a threat to human and environmental health. *Radiol Oncol* 2008;42 (2):102-13.
- Seifert M, Mc Gregor G, Eaglesham G, Wickramasinge W, Shaw G. First evidence for the production of cylindrospermopsin and deoxy-cylindrospermopsin by the freshwater benthic cyanobacterium, *Lyngbya wollei* (Farlow ex Gomont) Speziale and Dyck. *Harmful Algae* 2007;6:73-80.
- Sieroslawska A, Rymuszka A, Velisek J, Pawlik-Skowronska B, Svobodova Z, Skowronski T. Effects of microcystin-containing cyanobacterial extract on hematological and biochemical parameters of common carp (*Cyprinus carpio L.*). *Fish Physiol Biochem* 2012;38:1159-67.
- Sivonen K, Jones G. Cyanobacterial toxins. In: Chorus I, Bartram J (Ed.). *Toxic cyanobacteria in water*. 1^o ed. London: E. & FN. Spon; 1999. p. 41-110.
- Sivonen K, Börner T. Bioactive compounds produced by cyanobacteria. In: Herrero A, Flores E, (Eds.). *The cyanobacteria: molecular biology, genomics and evolution*. Norfolk, U.K: Caister Academic Press; 2008;159-97.
- Sivonen K. Effects of light, temperature, nitrate, orthophosphate and bacteria on growth and hepatotoxin production by *Oscillatoria agardhii* strains. *Appl Environ Microbiol* 1990;5:2658-66.
- Smith JL, Haney JF. Foodweb transfer, accumulation, and depuration of microcystins, a cyanobacterial toxin, in pumpkinseed sunfish (*Lepomis gibbosus*). *Toxicon* 2006;48:580-9.
- Smith JL, Schulz KL, Zimba PV, Boyer GL. Possible mechanism for the foodweb transfer of covalently bound microcystins. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2010;73(5):757-61.
- Smith JL, Haney JF. Foodweb transfer, accumulation and depuration of microcystins, a cyanobacterial toxin in pump-kinseed sunfish (*Lepomis gibbosus*). *Toxicon* 2006;48:580-589.

- Smutna M, Babica P, Jarque S, Hilscherova K, Marsalek B, Haeba M, Blaha L. Acute, chronic and reproductive toxicity of complex cyanobacterial blooms in *Daphnia magna* and the role of microcystins. *Toxicon* 2014;79:11-8.
- Soares RM, Magalhães VF, Azevedo SMFO. Accumulation and depuration of microcystins (cyanobacteria hepatotoxins) in *Tilapia rendalli* (Cichlidae) under laboratory conditions. *Aquat Toxicol*. 2004;70:1-10.
- Soares RM, Yuan M, Servaites JC, Delgado A, Magalhães VF, Hilborn ED, Carmichael WW, Azevedo SMFO. Sub-lethal exposure from microcystins to renal insufficiency patients in Rio de Janeiro-Brazil. *Environ Toxicol* 2006;2:95-103.
- Soares RM. Toxicologia de cianotoxinas: Microcistinas as estrelas do tema. *Oecol. Bras.* 2009;13:259-71.
- Spáčil Z, Erkişon J, Jonasson S, Rasmussen U, Ilag LL, Bergman B. Analytical protocol for identification of BMAA and DAB in biological samples. *Analyst* 2010;135:127-32.
- Spoof L, Berg KA, Rapala J, Lahti K, Lepistö L, Metcalf JS, Codd GA, Meriluoto J. First observation of cylindrospermopsin in *Anabaena lapponica* isolated from the boreal environment (Finland). *Environ Toxicol* 2006;21:552-60.
- Stevens DK, Krieger RI. Stability studies on the cyanobacterial nicotinic alkaloid saxitoxin-A. *Toxicon* 1991;29(2):167-79.
- Stewart I, Seawright AA, Shaw GR. Cyanobacterial poisoning in livestock, wild mammals and birds—an overview. *Cyanobacterial harmful algal blooms: state of the science and research needs*. New York: Springer; 2008. p. 613-37.
- Steyn DG. Poisoning of animals and human beings by algae. *S Afr J Sci* 1945;41:243-44.
- Swain SS, Paidesetty SK, Padhy RN. Antibacterial, antifungal and anti- mycobacterial compounds from cyanobacteria. *Biomed Pharmacother* 2017;90:760-76.
- Teixeira MG, Costa MC, de Carvalho VL, Pereira MDS, Hage E. Gastroenteritis epidemic in the area of the Itaparica dam, Bahia, Brazil. *Bulletin of the Pan American Health Organization* 1993;27(3):244-53.
- Tencalla F, Dietrich DR. Biochemical characterisation of microcystin toxicity in trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Toxicon* 1997;35:583-95.
- Tencalla FG, Dietrich DR, Schlatter C. Toxicity of *Microcystin aeruginosa* peptide toxin to yearling rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquat Toxicol* 1994;30:215-24.
- Tencalla F, Dietrich DR. Biochemical characterisation of microcystin toxicity in trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Toxicon* 1997;35:583-95.
- Tillett D, Dittmann E, Erhard M, Von Döhren H, Börner T, Neilan B. Structural organization of microcystin biosynthesis in *Microcystis aeruginosa* PCC7806: an integrated peptide-polyketide synthetase system. *Chem Biol* 2000;7:753-64.
- Tonk L, Welker M, Huisman J, Visser PM. Production of cyanopeptolins, anabaenopeptins, and microcystins by the harmful cyanobacteria *Anabaena* 90 and *Microcystis* PCC 7806. *Harmful Algae* 2009;8:219-24.
- Toranzo AE, Nieto F, Barja JL. Mortality associated with a cyanobacterial bloom in farmed rainbow trout in Galicia (Northwestern Spain), *Bull Eur Assoc Fish Pathol* 1990;10:106-7.
- Triantis TM, Kaloudis T, Hiskia A. Determination of Anatoxin-a in filtered and drinking water by LC-MS/MS. *Handbook of Cyanobacterial Monitoring and Cyanotoxin Analysis* 2016;408-12.
- Turner PC, Gammie AJ, Hollinrake K, Codd GA. Pneumonia associated with cyanobacteria. *BMJ* 1990;300:1440.
- Ullman TA, Itzkowitz SH. Intestinal inflammation and cancer. *Gastroenterology* 2011;140:1807-16.
- Urrutia-Cordero P, Agha R, Cirésa S, Lezcanao MÁ, Sánchez-Contrerasa M, Waara KO, Utkilen H, Quesada A. Effects of harmful cyanobacteria on the freshwater pathogenic free-living amoeba *Acanthamoeba castellanii*. *Aquat Toxicol* 2013;130-1.

- USEPA (United States Environmental Protection Agency). *Drinking Water Health Advisory: pesticides*. Boca Raton, FL: CRC Press; 1989.
- USEPA. A review of the reference dose and reference concentration processes. Risk Assessment Forum. Washington, DC: United States Environmental Protection Agency; 2002 (EPA/630/P-02/0002F).
- USEPA. *Guidelines for Carcinogen Risk Assessment*. Risk Assessment Forum. Washington, DC: United States Environmental Protection Agency; 2005. (EPA/630/P-03/001B).
- USEPA. (United States Environmental Protection Agency). *Toxicological Reviews of Cyanobacterial Toxins: Microcystins LR, RR, YR and LA*. Cincinnati, OH: National Center for Environmental Assessment Office of Research and Development; 2006.
- USEPA. *National Lakes Assessment: A Collaborative Survey of the Nation's Lakes*. Washington, DC: United States Environmental Protection Agency; 2009. EPA 841-R-09-001.
- USEPA. *Exposure Factors Handbook 2011 Edition (Final)*. Washington, DC: United States Environmental Protection Agency; 2011. (EPA/600/R-09/052F).
- USEPA. *Benchmark dose technical guidance document [external review draft]*. Washington, DC: United States Environmental Protection Agency; 2012. (EPA/630/R-00/001).
- USEPA Office of Water (4304T). Drinking Water Health Advisory for the Cyanobacterial Microcystin Toxins. Health and Ecological Criteria Division. Washington, DC: United States Environmental Protection Agency; 2015.
- Van Wagoner RM, Drummond AK, Wright JLC. Biogenetic diversity of cyanobacterial metabolites. *Adv Appl Microbiol* 2007;61-61:89-217.
- Vasas G, Gaspar A, Suranyi G, Batta G, Gyemant G, M-Hamvas M, MathÉ C, Grigorszky I, Molnar E, Borbely G. Capillary Electrophoretic Assay and purification of Cylindrospermopsin, a cyanobacterial toxin from *Aphanizomenon ovalisporum*, by plant test (Blue-Green Sinapis Test). *Analytical Biochemistry* 2002;302:95-103.
- Vega A, Bell EA. α -Amino- β -methylaminopropionic acid, a new amino acid from seeds of *Cycas circinalis*. *Phytochemistry* 1967;6:759-62.
- Verspagen JMH, Van de Waal DB, Finke JF. Rising CO₂ levels will intensify phytoplankton blooms in eutrophic and hypertrophic lake. *PLoS ONE* 2014;9:e104325.
- Von Elert E, Oberer L, Merkel P, Huhn T, Blom JF. Cyanopeptolin 954, a chlorine-containing chymotrypsin inhibitor of *Microcystis aeruginosa* NIVA cya 43. *J Nat Prod*.2005;68(9):1324-27.
- Walther T, Renner S, Waldmann H, Arndt HD. Synthesis and structure- activity correlation of a brunsvicamide-inspired cyclopeptide collection. *Chembiochem* 2009;4;10(7):1153-62.
- Welker M, Brunke M, Preussel K, Lippert I, von Döhren H. Diversity and distribution of *Microcystis* (Cyanobacteria) oligopeptide chemotypes from natural communities studied by single-colony mass spectrometry. *Microbiology* 2004;150:1785-96.
- Welker M, von Döhren H. Cyanobacterial peptides nature's own combinatorial biosynthesis. *FEMS Microbiol Rev* 2006;30:530-63.
- WHO. *Guidelines for drinking-water quality. Addendum to Volume 2: Health criteria and other supporting information*. 2. Geneva: World Health Organization;1998.
- Williams DE, Craig M, Dawe SC, Kent ML, Holmes FB, Andersen RJ. Evidence for a covalent bound form of microcystin-LR in salmon liver and dungeness crab larval. *Chem Res Toxicol* 1997;10(4):460-3.
- Wilson AE, Gossiaux DC, Höök TO, Berry JP, Landrum PF, Dyble J. Evaluation of the human health threat associated with the hepatotoxin microcystin in the muscle and liver tissues of yellow perch (*Perca flavescens*). *Can J. Fish Aquat Sci* 2008;65:1487-97.
- Wonnacott S, Gallagher T. The chemistry and pharmacology of anatoxin-a and related homotropanes with respect to nicotinic acetylcholine receptors. *Marine Drugs* 2006;4(3):228-54.

- Wood R. Acute animal and human poisonings from cyanotoxin exposure a review of the literature. *Environ Int* 2016;91:276-82.
- Wood SA, Briggs LR, Sprosen J, Ruck JG, Wear RG, Holland PT, Bloxham M. Changes in concentration of microcystins in Rainbow trout, freshwater mussels, and cyanobacteria in Lakes Rotoiti and Rotoehu. *Environmental toxicology* 2006;21:205-22.
- Wood SA, Heath MW, Holland PT, Munday R, McGregor GB, Ryan KG. Identification of a benthic microcystin-producing filamentous cyanobacterium (*Oscillatoriales*) associated with a dog poisoning in New Zealand. *Toxicon*. 2010;55: 897-903.
- Wood SA, Selwood AI, Rueckert A, Holland PT, Milne JR, Smith KF, Cary CS. First report of homoanatoxin-a and associated dog neurotoxicosis in New Zealand. *Toxicon* 2007;50(2):292-301.
- Xiao CC, Chen MJ, Mei FB, Fang X, Huang TR, Li JL, Deng W, Li Y-D. 2018. Influencing factors and health risk assessment of microcystins in the Yongjiang river (China) by Monte Carlo simulation. *PeerJ* 2018;16:6:e5955.
- Xie L, Xie P, Guo L, Li L, Miyabara Y, Park HD. Organ distribution and bioaccumulation of microcystins in freshwater fish at different trophic levels from the eutrophic lake Chaohu, China. *Environ Toxicol* 2005;20:293-300.
- Yea SS, Yang YI, Jang WH, Paik KH. Microcystin-induced proinflammatory cytokines expression and cell death in human hepatocytes. *Hepatology* 2001;34(4, Pt. 2):516A.
- Zegura B, Sedmak B, Filipič M. Microcystin-LR induces oxidative DNA damage in human hepatoma cell line HepG2. *Toxicon*.2003;41(1):41-8.
- Zhang DW, Deng X, Xie P, Chen J, Guo L. Risk assessment of microcystins in silvercarp (*Hypophthalmichthys molitrix*) from eight eutrophic lakes in China. *Food Chem* 2013a;140:17-21.
- Zhang DW, Xie P, Liu YQ, Qiu T. Transfer, distribution and bioaccumulation of microcystins in the aquatic food web in Lake Taihu, China, with potential risks to human health. *Sci Total Environ* 2009;407:2191-9.
- Zhang X, Xie P, Wang W, Li D, Shi Z. Plasma biochemical responses of the omnivorous crucian carp (*Carassius auratus*) to crude cyanobacterial extracts. *Fish Physiol Biochem* 2008;34:323-9.
- Zimba PV, Camus A, Allen EH, Burkholder JM. Co-occurrence of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, mortalities and microcystin toxin in a southeastern USA shrimp facility. *Aquaculture* 2006;261:1048-55.
- Zimba PV, Khoo L, Gaunt PS, Bittain S, Carmichael WW. Confirmation of Catfish, *Ictalurus punctatus* (Rafinesque) mortality from *Microcystis* toxins. *J Fish Dis* 2001;24:41-47.

*Serie Rapporti ISTISAN
numero di dicembre 2020, 1° Suppl.*

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

Roma, dicembre 2020