



RAPPORTI ISTISAN 21|21

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

Contaminazione da cianotossine nei vegetali eduli: rischi sanitari, metodi di rilevazione, depurazione

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



AMBIENTE
E SALUTE

ISTITUTO SUPERIORE DI SANITÀ

**Contaminazione da cianotossine
nei vegetali eduli: rischi sanitari,
metodi di rilevazione, depurazione**

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

*(a) Servizio Grandi Strumentazioni e Core Facilities, Istituto Superiore di Sanità, Roma
(b) Struttura Semplice Micotossine e Tecniche Immunoenzimatiche, Istituto Sperimentale
Zooprofilattico della Puglia e della Basilicata, Foggia*

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

**Rapporti ISTISAN
21/21**

Istituto Superiore di Sanità

Contaminazione da cianotossine nei vegetali eduli: rischi sanitari, metodi di rilevazione, depurazione.

Milena Bruno, Rita De Pace, Valentina Messineo

2021, 45 p. Rapporti ISTISAN 21/21

Il bioaccumulo di cianotossine nei vegetali assume una particolare importanza al giorno d'oggi, vista la grande enfasi che viene data al consumo di verdure all'interno della dieta giornaliera: un'alimentazione a base vegetale è generalmente considerata più sana, foriera di benefici sia per la salute umana sia per il pianeta in quanto a minore impatto ambientale. La qualità e l'eventuale contaminazione di questi prodotti dell'agricoltura rappresentano quindi un aspetto cruciale visto che solo in Italia si contano un po' meno di 5 milioni tra vegetariani e vegani. In questo contesto vengono esaminate le attuali evidenze scientifiche a livello internazionale e nazionale relative alla contaminazione di prodotti vegetali tramite irrigazione con acqua contaminata da cianotossine, e i metodi di rilevazione e depurazione.

Parole chiave: Cianotossine; Vegetali; Irrigazione; Bioaccumulo; Cianobatteri; Contaminazione; Limiti di consumo

Istituto Superiore di Sanità

Cyanotoxin contamination in edible vegetables: health risk, detection methods, depuration.

Milena Bruno, Rita De Pace, Valentina Messineo

2021, 45 p. Rapporti ISTISAN 21/21 (in Italian)

The bioaccumulation of cyanotoxins in plants takes on particular importance nowadays, given the great emphasis that is given to the consumption of vegetables in the daily diet: a vegetable-based diet is generally considered healthier, carrier benefits both for human health and for the planet in terms of lower environmental impact. The quality and possible contamination of these agricultural products are therefore a crucial aspect as in Italy alone there are a little less than 5 million vegetarians and vegans. In this context, the current scientific evidence at international and national level relating to the contamination of plant products by irrigation with water contaminated by cyanotoxins, and the methods of detection and purification are examined.

Key words: Cyanotoxins; Vegetables; Bioaccumulation; Consumption limits

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, De Pace R, Messineo V. *Contaminazione da cianotossine nei vegetali eduli: rischi sanitari, metodi di rilevazione, depurazione*. Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2021. (Rapporti ISTISAN 21/21).

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

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

Direttore responsabile della serie: *Paola De Castro*

Redazione: *Sandra Salinetti*

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



INDICE

Introduzione	1
Microcistine	4
Microcistina-LR.....	6
Microcistina-RR	10
Cilindrospermopsina	12
BMAA (β-N-metilammino-L-alanina)	15
Rischi da cianotossine per la salute umana	17
Sinergia tra tossine diverse e tra dosi subcroniche di microcistine.....	17
Rischio da accumulo.....	20
Metanalisi e valutazione del rischio.....	25
Contaminazione vegetale in Italia: il caso del lago di Occhito	27
Metodi per estrarre ed analizzare cianotossine dai vegetali	29
Estrazione	29
Primo metodo.....	29
Secondo metodo.....	29
ELISA per microcistine	29
ELISA per BMAA	30
ELISA per cilindrospermopsina	30
ELISA per anatoxina-a	31
Analisi strumentali.....	31
Microcistine	31
Cilindrospermopsina	31
BMAA e anatoxina-a	32
Esperimenti di depurazione	34
Conclusioni	36
Bibliografia	37

INTRODUZIONE

Il bioaccumulo di cianotossine nei vegetali assume una particolare importanza al giorno d'oggi, vista la grande enfasi che viene data al consumo di verdure all'interno della dieta giornaliera: un'alimentazione a base vegetale è generalmente considerata più sana, foriera di benefici sia per la salute umana sia per il pianeta in quanto a minore impatto ambientale.

La qualità e l'eventuale contaminazione di questi prodotti dell'agricoltura rappresenta quindi un aspetto cruciale visto che solo in Italia si contano un po' meno di 5 milioni tra vegetariani e vegani (rispettivamente 6,7% e 2,2% della popolazione secondo dati Eurispes di inizio 2020).

Ma le persone che negli ultimi anni hanno aumentato il consumo di verdure sono oltre 22 milioni. Alla base della scelta c'è soprattutto la salute e il benessere (23,2%) e il rispetto nei confronti del mondo animale (22,2%). Non manca chi ritiene così di mangiare meno e meglio (il 19,2%) Per il 17,2% dei vegetariani/vegani questo stile alimentare è parte integrante di una più ampia filosofia di vita in cui dieta e rispetto per l'ambiente vanno di pari passo.

Negli ultimi 50 anni le colture sono state coinvolte in un numero sempre crescente di malattie di origine alimentare: tra gli anni 1970 e 1990 negli USA la percentuale di focolai che coinvolgono prodotti freschi è aumentata dallo 0,7% al 6% (Sivapalasingam *et al.*, 2004), sempre negli USA tra il 1998 e il 2008 i prodotti freschi sono stati responsabili del 46% delle malattie di origine alimentare (Painter *et al.*, 2013).

Esiste chiaramente un aumento del rischio di malattie di origine alimentare attraverso le colture alimentari: sebbene questo rischio sia storicamente dovuto al ruolo svolto dai prodotti freschi nella trasmissione di patogeni enterici, c'è un numero crescente di prove che mostrano per le colture alimentari la potenzialità di bioaccumulare cianotossine con conseguente esposizione del consumatore (Codd *et al.*, 1999; McElhiney *et al.*, 2001; Chen *et al.*, 2004; Järvenpää *et al.*, 2007; Crush *et al.*, 2008; Mohamed and Al Shehri, 2009; Hereman and Bittencourt-Oliveira, 2012; Gutierrez-Praena *et al.*, 2014; Freitas *et al.*, 2015; Liang and Wang, 2015; Bittencourt-Oliveira *et al.*, 2016; Cordeiro-Araújo *et al.*, 2016; Machado *et al.*, 2017a); va quindi prestata la dovuta attenzione alle acque utilizzate per irrigare le colture.

In Italia la maggior percentuale di utilizzo idrico (più del 50% del volume complessivamente utilizzato) è a carico del settore agricolo. Nell'annata agraria 2015-2016 la superficie irrigabile (superficie attrezzata per l'irrigazione), distribuita su circa 572 mila aziende agricole italiane, è stata pari a 4.123 migliaia di ettari: rispetto al 1982 l'area irrigabile è cresciuta di circa il 4,2% (nel 2016 il dato include anche l'irrigazione di soccorso, precedentemente escluso) (ISTAT, 2019). Nell'annata agraria in questione l'irrigazione è stata effettuata dal 42,9% delle aziende agricole; in particolare da circa 491 mila aziende che irrigano una superficie di 2.553.000 di ettari. Rispetto al 1982, la superficie irrigata ha fatto registrare un sia pur lieve aumento (1,7%), ma il numero di aziende che hanno praticato irrigazione si è ridotto del 20,9%: la probabile causa indicata dall'ISTAT (Istituto Nazionale di Statistica) è l'aumento della dimensione media aziendale.

La propensione all'irrigazione, valutata rapportando la superficie irrigata al totale della Superficie Agricola Utilizzabile (SAU), è pari al 20,3% nel 2016, percentuale che pone l'Italia al quarto posto tra i Paesi mediterranei dell'Unione Europea (UE) dopo Malta (31,4%), Grecia (23,6%) e Cipro (21,0%).

Nella propensione regionale all'irrigazione ancora una volta è la Lombardia in testa alla graduatoria, dove il 53,3% della SAU è irrigato; seguono Veneto (42,2%) e Piemonte (37,2%). Nelle Marche, di contro, si registra il valore più basso (3,4%). Rispetto alle colture, nel 2016 il

18,6% della superficie irrigata era coltivato a mais da granella; seguivano erbai e altre foraggere avvicendate (17,3%), l'insieme di fruttiferi e agrumi (12,0%) e le colture ortive a piena aria (9,6%).

La pratica agricola comune coinvolge l'uso dell'acqua proveniente da riserve di approvvigionamento pubblico, fiumi e stagni per irrigare aziende agricole e colture. In caso di eutrofizzazione, queste fonti d'acqua di superficie possono essere contaminate da cianobatteri e relative cianotossine, in grado di bioaccumularsi nei tessuti vegetali (Codd *et al.*, 1999; Crush *et al.*, 2008; Mohamed & AlShehri, 2009). Questo rende il consumo di colture e verdure irrigate con acque di superficie contaminate potenzialmente pericoloso per l'esposizione a diverse cianotossine, comprese le microcistine (MC) (Crush *et al.*, 2008; Hereman & Bittencourt-Oliveira, 2012).

A seconda della composizione delle fioriture, la produzione di sostanze bioattive come MC, cilindrospermopsine, anatosine e altre tossine cianobatteriche influisce negativamente sulla vita animale e delle piante degli ecosistemi acquatici (Kozdęba *et al.*, 2014). In quest'ultimo caso oltre a causare stress ossidativo nelle piante (Cordeiro-Araújo *et al.*, 2015; Pflugmacher *et al.*, 2007; Saqrane *et al.*, 2007), a seconda delle biotossine attive si producono effetti di influenza sulla fisiologia dei vegetali: ad esempio le MC inducono cambiamenti nello sviluppo (Máthé *et al.*, 2007; Pflugmacher *et al.*, 2007), nel tasso fotosintetico (Abe *et al.*, 1996; Weiss *et al.*, 2000) e nella permeabilità della membrana plasmatica (Cordeiro-Araújo *et al.*, 2015).

L'esposizione degli esseri umani alle cianotossine avviene attraverso l'acqua potabile contaminata, l'inalazione di vapore e goccioline aerosolizzate di acqua contaminata ad esempio durante la doccia, il contatto con la pelle durante il nuoto o la doccia, il consumo di pesci o molluschi coltivati in corpi idrici contaminati o il consumo di colture alimentari irrigate con acqua contaminata (Svircev *et al.*, 2017).

In condizioni naturali, l'acqua utilizzata per l'irrigazione può contenere diversi congeneri di MC, oltre ad altre cianotossine (Corbel *et al.*, 2014; El Khalloufi *et al.*, 2012; Pflugmacher *et al.*, 2007). Inoltre, i risultati di laboratorio suggeriscono che i ceppi/specie di cianobatteri possono produrre più di un congenere di MC (Bittencourt-Oliveira, 2003; Puddick *et al.*, 2014). Ciò implica che le colture irrigate con acqua contaminata da cianobatteri e cianotossine possano essere esposte a più di un congenere di MC alla volta.

Tuttavia, l'assorbimento simultaneo e il bioaccumulo di questi congeneri nelle verdure e in altre piante da coltivazione devono ancora essere ampiamente studiati. Ciò limita la nostra comprensione delle possibili interazioni antagonistiche, sinergiche e/o additive che possono verificarsi tra le tossine cianobatteriche e i loro congeneri nelle piante superiori.

Le cianotossine possono bioaccumularsi in varie colture alimentari irrigate con acqua contaminata da cianobatteri (Tabella 1).

Sono molte le variabili che possono determinare a quale concentrazione le cianotossine si bioaccumulino, come ad esempio la fase della pianta al momento dell'esposizione (germinazione, crescita, fruttificazione della pianta adulta), la composizione dei batteri del suolo, la concentrazione di cianotossine nell'acqua, la quantità di acqua utilizzata per l'irrigazione, la durata dell'esposizione all'irrigazione, ecc.

Tuttavia, il fatto che possa verificarsi un bioaccumulo ha sollevato la questione se esista un rischio di salute pubblica per le persone che consumano colture alimentari coltivate in queste condizioni.

Questo rapporto fa il punto sullo stato dell'arte delle indagini scientifiche relative al bioaccumulo di cianotossine nei vegetali terrestri soggetti al consumo umano, e presenta i risultati dello studio compiuto in Italia sulle coltivazioni della Capitanata irrigate con l'acqua del lago Occhito, noto per ospitare fioriture tossiche.

Tabella 1. Accumulo di MC in diversi tipi di ortaggi tramite irrigazione con acqua contaminata da cianobatteri (modificata da: Miller& Russel, 2017)

Pianta (specie)	Dose di irrigazione	Risultato	Autore
Lattuga (<i>Lactuca sativa</i>)	MC-LR 0,5; 2; 5; 10 µg/L MC-RR 0,15; 0,5; 3 µg/L Piante di 30 gg irrigate con 100 mL di acqua per 15 gg. Analizzati i tessuti delle foglie	No bioaccumulo alle dosi più basse MC-LR: 32-143 µg/kg MC-RR: 6-15 µg/kg MC totali: 39-158 µg/kg	Bittencourt-Oliveira <i>et al.</i> , 2016
Lattuga (<i>Lactuca sativa</i>)	Dosi specifiche sconosciute. MC-LR (fioritura e scum):3,23+0,11 µg/mg. Analizzati i tessuti delle foglie	MC-LR: 94-2487 µg/kg peso secco. Cellule cianobatteriche non rimosse dalle foglie dopo lavaggio. Ortaggi ritirati dal commercio	Codd <i>et al.</i> , 1999
Lattuga (<i>Lactuca sativa</i>) Rucola (<i>Eruca sativa</i>)	MC-LR 5,10 µg/L Rucola: (piante di 30 gg) e Lattuga (piante di 40 gg) irrigate giornalmente con 100 mL di acqua per 7 gg, seguiti da 7 gg di depurazione Analizzati i tessuti delle foglie	MC-LR: 50-100 µg/kg Dopo depurazione MC-LR: diminuisce a 30 µg/kg. MC-LR non rilevata nella Rucola	Codeiro-Araujo <i>et al.</i> , 2016
Lattuga (<i>Lactuca sativa</i>)	MC totali 2100 µg/L (da acqua contaminata di lago). Irrigazione ogni 2 o 3 gg per 12 gg con 100 mL di acqua. Analizzate foglie e radici	MC-LR: 300-870 µg/kg peso secco (radici) 740-840 µg/kg peso secco (germogli)	Crush <i>et al.</i> , 2008
Lattuga (<i>Lactuca sativa</i>)	MC totali 0,62; 2,5; 6,23; 12,0 µg/L. Piante adulte irrigate giornalmente con spray con 100 mL di acqua per 15 gg. Analizzati i tessuti delle foglie	MC-LR: 8,31-177,8 µg/kg Maggiore accumulo a dosi più alte.	Hereman & Bittencourt-Oliveira, 2012
Lattuga (<i>Lactuca sativa</i>) Rucola (<i>Eruca sativa</i>) Cavolo (<i>Brassica sp.</i>) Ravanello (<i>Raphanus sp.</i>) Aneto (<i>Anethum graveolens</i>) Prezzemolo (<i>Petroselinum crispum</i>)	L'acqua di falda contaminata proveniente da pozzi utilizzati (probabilmente MC-YR) variava tra 0,3 e 1,8 µg/L Analizzate foglie e radici di tutte le piante	Lattuga: <100-400 µg/kg Rucola: <100-400 µg/kg Cavolo: <100-800 µg/kg Ravanello: <300-1200 µg/kg Aneto: 150-800 µg/kg Prezzemolo: 300-800 µg/kg Accumulo nelle radici maggiore che nelle foglie, tranne per l'aneto	Mohamed & Al Sheri, 2009
Broccoli (<i>Brassica oleracea</i>) Senape (<i>Sinapis alba</i>)	MC totali (LR e RR) 1,10 µg/L Senape esposta per 19 gg Broccoli esposti per 20 gg	Rilevata solo MC-LR nelle radici. Broccoli: 0,9-2,4 µg/kg Senape: 2,5-2,6 µg/kg	Jarvenpaa <i>et al.</i> , 2007
Riso (<i>Oryza sativa</i>)	MC-LR 24,120,600,3000 µg/L Test di germinazione: semi di riso imbevuti per 24 h poi posti in scatole rivestite con carta saturata con 10 mL di ogni dose. Aggiunti 4 mL di ogni dose a intervalli di 3 gg. Analizzate le piantine	MC-LR (dose minore) non rivelata (dose maggiore) 29,4-54 µg/kg	Chen <i>et al.</i> , 2004
Pomodoro (<i>Lycopersicon esculentum</i>)	MC-LR 100 µg/L Piante irrigate ogni 3 gg per 2 settimane con 500 mL di acqua. Foglie, frutti (verdi e maturi) radici, analizzati dopo 2 settimane	MC-LR (dopo 1 settimana) trovata solo nei pomodori verdi e in quelli maturi: 5,4 e 10,8 µg/kg. MC-LR sotto i limiti di rilevazione dopo 2 settimane di irrigazione nelle altre parti delle piante	Gutierrez-Praena <i>et al.</i> , 2014
Carote (<i>Daucus carota</i>)	MC-LR 10, 50 µg/kg. Carote cresciute per un mese e poi irrigate per 32 gg	MC-LR: 5 µg/kg	Machado <i>et al.</i> , 2017a

MICROCISTINE

Le MC sono diventate più diffuse negli ecosistemi di acqua dolce in tutto il mondo a causa di un aumento delle fioriture di cianobatteri tossici. Mentre il consumo di acqua e pesce è un percorso di esposizione per l'uomo alle MC ben documentato, meno si sa sul potenziale trasferimento all'uomo attraverso il consumo di verdure che sono state irrigate con acqua contaminata da MC. Allo stesso modo, l'impatto delle MC sulle prestazioni delle colture alimentari è poco studiato.

La Figura 1 riporta lo scheletro base della molecola delle MC.

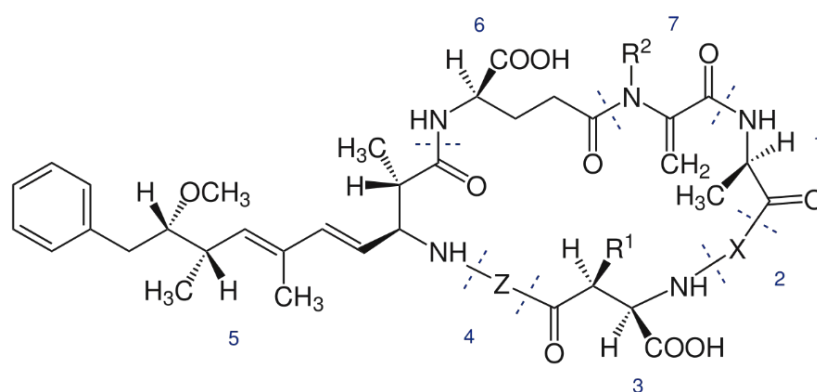


Figura 1. Scheletro base della molecola delle microcistine (MC): 1) D-alanina; 2) aminoacido L-variabile; 3) Acido D-Metil Aspartico; 4) aminoacido L-variabile; 5) AddA (Acido 3-ammino- 9-metossi-2,6,8-trimetil-10- fenildeca-4,6-dienoico); 6) acido D-glutammico; 7) N-metildeidroalanina

L'allelopatia è qualsiasi effetto diretto o indiretto, benefico o dannoso, prodotto da piante e microrganismi su un'altra pianta dopo il rilascio di sostanze chimiche nell'ambiente (Rice, 1984). In generale, ci sono vari effetti causati dalle MC sulle piante.

Secondo Babica *et al.* (2006), bisogna considerare che gli effetti osservati nella maggior parte degli studi vengono raggiunti a concentrazioni molto più elevate rispetto a quelli che si trovano comunemente in natura (<10 µg/L). Questo potrebbe indicare che l'azione delle MC come composti allelopatici su organismi concorrenti fotoautotrofi è scarsamente probabile.

Tuttavia, secondo lo studio di Leflaive e Ten-Hage (2007), basato su aspetti evolutivi, ecologici e fisiologici, almeno alcune tossine, tra cui le MC, dimostrano caratteristiche allelopatiche sui competitori fotoautotrofi.

Occorrono ancora molti più studi per concludere se le cianotossine causino funzioni allelopatiche, la stessa produzione di cianotossine è stata indicata come necessaria per la parte funzionale del metabolismo dei cianobatteri.

Gli effetti nocivi delle MC sulle piante acquatiche sono stati studiati a causa della possibilità che questi organismi vengano esposti alle cianotossine presenti nell'acqua circostante. In studi che riportavano effetti tossici nella macrofita *Phragmites australis* (Cav.) Trin. ex Steudel, era stata osservata una riduzione della lunghezza delle radici, della massa secca e dell'assorbimento di ossigeno e sostanze nutritive, con effetti allelopatici prodotti da una fioritura cianobatterica dove predominavano i cianobatteri *Microcystis* spp. (Yamasaki, 1993). L'irrigazione di diverse

piante coltivate, comprese le verdure, può portare a livelli di produzione inferiori oltre che alla contaminazione umana attraverso il consumo (Chen *et al.*, 2004).

Molti studi riportano gli effetti di varie concentrazioni di MC sia sullo sviluppo di alcune piante che sull'accumulo nel tessuto fogliare (Codd *et al.*, 1999; Crush *et al.*, 2008).

L'acquisizione di queste informazioni è stata possibile perché un importante percorso di contaminazione, altrimenti trascurato, è stato preso in considerazione dai ricercatori, cioè l'irrigazione delle piante con acqua contaminata: sebbene il contatto naturale diretto delle MC con le piante del terreno sia raro, l'irrigazione con acqua contaminata aumenta la possibilità di questa evenienza.

Dopo esposizione le piante producono quantità maggiori di specie ossigeno-reattive (ROS) rispetto a condizioni di crescita normale, che possono determinare danni ossidativi alle loro cellule (Peuthert *et al.*, 2007; Pflugmacher *et al.*, 2007).

Esse sono però equipaggiate evolutivamente con efficienti sistemi di difesa antiossidante comprendenti gli enzimi glutatione S-transferasi (GST), superossidismutasi (SOD), perossidasi (POD) e catalasi (CAT), che combattono e prevengono gli effetti dannosi associati alla produzione di ROS (Babica *et al.*, 2006; Cordeiro-Araújo *et al.*, 2015; Romero-Oliva *et al.*, 2015). Codd *et al.* (1999) hanno verificato la presenza di MC e singole cellule e colonie di *M. aeruginosa* nelle foglie di *Lactuca sativa* (lattuga) dieci giorni dopo l'ultima irrigazione con acqua contenente i cianobatteri produttori di tossine. Successivamente, Crush *et al.* (2008) hanno osservato la contaminazione da *L. sativa* se irrigata con acqua contenente MC a concentrazione di 7 µg/L per dieci giorni, con rischio di ingestione di 3,3 µg per un consumo di 40 g di insalata.

In un lavoro del 2016 (Bittencourt-Oliveira *et al.*, 2016) è stato evidenziato come l'esposizione a MC abbia alterato la fisiologia della lattuga aumentando l'attività di importanti enzimi antiossidanti e il tasso fotosintetico delle piante. I cambiamenti fisiologici osservati nella lattuga erano significativamente correlati con l'esposizione a concentrazioni variate di MC (da 0,65 a 13 µg/L) e alla quantità di tossine accumulate nelle piante.

Hereman e Bittencourt-Oliveira (2012) hanno osservato la contaminazione di *L. sativa* irrigata ad una concentrazione inferiore, simile a concentrazioni naturali comprese tra 0,62 e 12,5 µg/L, con un rischio di ingestione da 0,33 a 7,11 µg, che potrebbe superare il valore tollerabile giornaliero di 0,04 µg/kg di massa corporea/giorno consigliata dall'Organizzazione Mondiale della Sanità (*World Health Organization*, WHO) (WHO, 1998). Pereira *et al.* (2009) hanno valutato effetti degli estratti dei ceppi di *Microcystis aeruginosa* (produttore e non produttore MC) durante germinazione e crescita delle radici delle erbe (*Festuca rubra L.* e *Lolium perenne L.*) e lattuga (*L. sativa*).

È stata osservata una chiara inibizione della crescita della radice in *L. sativa* esposta a ceppi contenenti MC (da 5,9 a 56,4 µg/L); tuttavia, il ceppo che ha prodotto gli effetti più pronunciati conteneva la più bassa concentrazione di MC, suggerendo che anche altri composti possono influenzare la crescita cellulare. La germinazione del seme non è stata influenzata in nessuna delle piante studiate.

Esistono chiare differenze nelle condizioni di studio, che possono spiegare alcuni dei risultati osservati. Ad esempio, uno studio è stato svolto in condizioni naturali (Codd *et al.*, 1999), alcuni studi erano condotti in condizioni idroponiche (Gutierrez-Praena *et al.*, 2014), mentre altri hanno utilizzato terra in vaso o sabbia (Järvenpää *et al.*, 2007; Crush *et al.*, 2008; Hereman e Bittencourt-Oliveira, 2012; Bittencourt-Oliveira *et al.*, 2016; Cordeiro-Araújo *et al.*, 2016; Machado *et al.*, 2017a). Il suolo può trattenere fino al 57% della tossina biodisponibile per la pianta (Machado *et al.*, 2017b); tuttavia, sono pochi gli studi controllati condotti in condizioni di campo utilizzando concentrazioni ecologicamente rilevanti.

Microcistina-LR

Una diminuzione della produzione di ossigeno fotosintetico e contenuto di clorofille *a* e *b*, nonché l'inibizione della crescita in *Ceratophyllum demersum* L. e *Myriophyllum spicatum* L. esposti a concentrazioni da 0,1 a 5 µg/L di MC-LR, hanno dimostrato che questa tossina può avere una possibile azione allelopatica (Pflugmacher, 2002). Questi rilevamenti sono stati confermati in studi successivi sulla riduzione di biomassa nelle piante acquatiche osservata solitamente dopo l'assorbimento di cianotossine, che possono bioaccumularsi nei tessuti (Mitrovic *et al.*, 2005; Saqrane *et al.*, 2007; Yin *et al.*, 2005a).

In *Lemna minor* L. e *Wolffia arrhiza* (L.) Horkel. ex Wimm, oltre a una diminuzione della crescita, è stato osservato un aumento dell'attività dell'enzima perossidasi dopo esposizione, per cinque giorni, a concentrazioni da 10.000 a 20.000 µg/L MC-LR (Mitrovic *et al.*, 2005). In questo caso è stata riscontrata una correlazione positiva tra la concentrazione di MC applicata e quella riscontrata nei tessuti di *L. minor*.

Lo stress ossidativo durante la biotrasformazione di MC-LR tramite il coniugato di glutazione può essere causato da un aumento dell'attività degli enzimi antiossidanti e del contenuto di glutazione (GSH) in *C. demersum* quando esposto a 5 µg/L di MC-LR (Pflugmacher, 2004). Dopo aver valutato l'attività dell'enzima glutazione S-transferasi (GST), è stata verificata infatti una possibile disintossicazione metabolica, simile a quella che si verifica nelle sostanze tossiche (xenobiotici) (Pflugmacher *et al.*, 1998).

Uno studio istologico sulla coltura tissutale di *Phragmites australis* esposta a concentrazioni di MC-LR comprese tra 2.500 e 40.000 µg/L ha mostrato un maggior danno alle radici dovuto all'obliterazione dell'aerenchima da parte del materiale del callo (Máthé *et al.*, 2007).

Le cianotossine, in particolare la MC-LR, possono bioaccumularsi in varie colture alimentari irrigate con acqua contaminata da cianobatteri. Le concentrazioni rilevate nelle piante dipendono da quelle raggiunte nell'acqua utilizzata per l'irrigazione (Hereman & Bittencourt-Oliveira, 2012). Ad esempio, la MC-LR si è accumulata nella foglia di lattuga coltivata in vaso in condizioni di laboratorio a concentrazioni fino a 143 µg/kg dopo irrigazione per 15 giorni con 100 mL di acqua contenente 10 µg/L di MC-LR. Tuttavia, dosi molto basse, cioè 0,5 e 0,65 µg/L, non hanno mostrato bioaccumulo di MC-LR nel tessuto della foglia di lattuga (Bittencourt-Oliveira *et al.*, 2016), ma dopo solo 7 giorni di irrigazione con 100 mL di acqua contenente 10 µg/L di MC-LR in ambiente di laboratorio, sono state osservate concentrazioni nel tessuto fogliare fino a 100 µg/kg di peso fresco (Cordeiro-Araújo *et al.*, 2016).

In una situazione in cui in una azienda agricola i raccolti venivano innaffiati tramite irrigazione a spruzzo con acqua contaminata, ma le concentrazioni effettive nell'acqua di irrigazione non erano state segnalate, la concentrazione di MC-LR nel tessuto delle foglie di lattuga si attestava tra i 94 ed i 2.487 µg/kg di peso secco (1 g di peso secco è equivalente a 10 g di peso fresco) e non si riusciva a lavare via le cellule dei cianobatteri dalle foglie di lattuga. Successivamente, questo lotto di prodotti non fu venduto (Codd, 1999). Studi su broccoli e senape (*Sinapis alba*) hanno mostrato che la MC-LR è stata rilevata solo nelle radici delle piante a basse concentrazioni, tra 2,4 e 2,6 µg/g di peso fresco, rispettivamente (Järvenpää *et al.*, 2007).

Considerando la parte della pianta che è consumabile, queste concentrazioni non rappresenterebbero un rischio per la salute. Al contrario, Machado *et al.* (2017a) hanno rilevato MC-LR nelle carote fino a 5 µg/kg di peso fresco, dove la radice è la parte commestibile. Mohamed e Al Shehri (2009) hanno rilevato MC totali sia nelle foglie che nelle radici delle piante che hanno esaminato. Nel complesso, le radici accumulano concentrazioni molto più elevate di MC rispetto alle foglie; tuttavia, per alcune piante, ad esempio ravanello, carota, patate dolci, barbabietole, è la radice che viene consumata, presentando così un rischio maggiore.

Presso l'Università dell'Ohio (Lee *et al.*, 2017) è stato condotto un esperimento di laboratorio controllato in cui lattuga, carote e fagiolini sono stati esposti a concentrazioni ambientali rilevanti di MC-LR (0, 1, 5 e 10 µg/L) tramite due metodi di irrigazione (gocciolamento e spruzzo). ELISA (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*) e LC-MS/MS (*Liquid Chromatography-tandem Mass Spectrometry*) sono stati usati per quantificare le concentrazioni di MC-LR in diverse parti della pianta (frazioni commestibili e non commestibili), le prestazioni delle piante misurate (p. es. dimensioni, massa, foglie commestibili, colore) e il rischio di esposizione umana basato su modelli di accumulo.

L'accumulo di MC-LR era positivamente dose-dipendente, essendo maggiore nelle piante (2,2-209,2 µg/kg) che nel suolo (0-19,4 µg/kg). L'accumulo di MC-LR variava tra i tipi di piante, tra le parti della pianta e tra i metodi di irrigazione. L'accumulo di MC-LR ha portato a una riduzione della crescita e della qualità del raccolto, con MC-LR che persisteva nel terreno dopo il raccolto. I modelli di accumulo di tossine osservati nelle frazioni di piante non commestibili hanno portato anche a stime dell'assunzione giornaliera di MC-LR che superavano sia la dose cronica di riferimento (0,003 µg/kg di peso corporeo) che le linee guida sull'assunzione giornaliera totale (0,04 µg/kg di peso corporeo).

Poiché l'uso di acqua contaminata da MC è comune in molte parti del mondo, le scoperte collettive hanno evidenziato la necessità di linee guida riguardanti l'uso di acqua contaminata da MC nell'irrigazione, nonché il consumo delle colture derivate. Gli effetti delle MC sulle piante terrestri sono stati anche collegati alle attività enzimatiche di queste piante.

Un esempio di questo effetto è la diminuzione delle attività delle proteinfosfatasi 1 (PP1) e 2A (PP2A) in *Brassica napus* L. quando esposta a MC-LR (Mackintosh *et al.*, 1990), e la riduzione dell'attività dell'enzima saccarosio-fosfato sintasi risultante dalla inibizione di PP1 e PP2A da parte di acido ocaidaico e MC-LR nelle foglie di *Spinacia oleracea* L., sia *in vitro* che *in vivo*, con conseguente diminuzione della biosintesi del saccarosio e della fissazione dell'anidride carbonica (Siegl *et al.*, 1990).

Studi sugli effetti della MC-LR nell'organizzazione di microtubuli e cromatina delle cellule radicali di *P. australis* hanno dimostrato che l'induzione di anomalie nelle cellule mitotiche coincidevano con concentrazioni in cui l'inibizione delle proteinfosfatasi era maggiore del 50% (> 500 µg/L) (Máthé *et al.*, 2009).

Sono state osservate risposte a stress ossidativo quando si aumenta l'attività antiossidante enzimi anche nelle piantine di *Lepidium sativum* L. esposto a MC-LR commerciale e ad un estratto di *M. aeruginosa* con 0,5 µg/L di MC totale, contenente MC-LR e MC-RR (Stüven & Pflugmacher, 2007). Piante di *Brassica chinensis* L. e *B. napus* coltivate sotto varie concentrazioni di MC (equivalenti a 0,008-4 mg/L MC-LR) per sette giorni, hanno mostrato inibizione della crescita e dello sviluppo. In questo studio, le attività delle superossidodismutasi (SOD), perossidasi (POD) e catalasi (CAT) hanno dimostrato che l'esposizione a MC si è manifestata in forma di stress ossidativo (Xue *et al.*, 2010).

El Khalloufi *et al.* (2011) hanno valutato gli effetti di diverse concentrazioni di MC sullo sviluppo di simbiosi tra *Medicago sativa* L. e ceppi di rizobi e osservato una riduzione della crescita sia della pianta che dei noduli batterici. È stato inoltre riscontrato che l'esposizione di semi e piantine di erba medica a concentrazioni di 0, 2,22, 11,12 o 22,24 µg/L MC influenzano tutte le fasi dello sviluppo della pianta e portano a una ridotta lunghezza delle radici.

Gli effetti delle MC sulle protein fosfatasi erano stati trovati in *Medicago sativa* L. L'esposizione di piante coltivate in terreno di giardino e trattate con 4 mL a giorni alterni per una settimana ad una concentrazione di 5 µg/L MC-LR, ha portato ad una riduzione dell'attività di PP1 e PP2A (Peuthert *et al.*, 2008). Una inibizione leggermente minore è stata ottenuta con un'estratto di cellule di *M. aeruginosa* contenente 5 µg/L di MC-LR, mentre nessuna inibizione è stata ottenuta con estratto cellulare di *Synechocystis* spp. (non produttore MC).

Altri effetti delle MC sulle piante terrestri sono stati valutati anche per la fotosintesi. Questi effetti hanno dimostrato, ad esempio, una riduzione del tasso netto della fotosintesi nelle foglie di *Phaseolus vulgaris* L. esposte a 10.000 e 100.000 µg/L.

È stato osservato, in questo stesso studio, un maggiore effetto inibitorio a seguito di applicazione topica di una soluzione acquosa contenente MC-LR e applicazioni multiple a concentrazioni inferiori (Abe *et al.*, 1996).

L'osservazione di molteplici effetti delle MC – come riduzione della crescita, della produttività, dell'attività del fotosistema II e aumento dell'accumulo di sostanze nutritive nelle radici delle piante *P. sativum* L., *Lens esculenta* Moench, *Zea mays* L. e *Triticum durum* L. – è stata sempre più frequente.

Saqrane *et al.* (2009) hanno osservato che le piante, irrigate ogni terzo giorno per trenta giorni con l'estratto grezzo della fioritura di cellule contenenti sei varianti di MC a concentrazioni di 500, 1.050 e 4.200 µg/L, accumulano in modo diverso quantità di tossina nei loro organi.

In sei varietà di *Spinacia oleracea* L. coltivate in terreno di giardino per sei settimane, irrigato due volte a settimana con 50 mL di estratto acquoso privo di cellule contenente 0,5 µg/L di MC-LR, è stata osservata una riduzione nella crescita, nella produzione di ossigeno fotosintetico, clorosi e stress ossidativo (Pflugmacher *et al.*, 2007).

Semi, piantine e giovani piante si mostrano sensibilità sostanziale alle MC. La crescita delle piantine di *Synapis alba* L. è risultata inibita se esposte per otto giorni a concentrazioni comprese tra 100 e 100.000 µg/L di MC con un valore LD₅₀ (*Lethal Dose* 50%) di 3.000 µg/L, rivelandole quindi indicate per i saggi biologici (Kós *et al.*, 1995). Allo stesso modo, la coltivazione di semi di *S. alba* per sette giorni in mezzo nutritivo solidificato contenente concentrazioni di MC purificate tra 500 e 40.000 µg/L, ha dimostrato effetti inibitori sullo sviluppo delle piantine. I semi di *L. sativum* sembrano essere più sensibili alle basse concentrazioni di tossina, dopo esposizione per sei giorni a 10 µg/L di MC-LR o ad un estratto senza cellule contenente 1 o 10 µg/L MC-LR (Gehring *et al.*, 2003).

Il contenuto di antocianine e l'attività dell'enzima DNasi a filamento singolo (sDNAsi) in semi di *S. alba*, germinati su carta da filtro imbibita con concentrazioni di MC-LR comprese tra 3.500 e 30.000 µg/L, ha mostrato valori indicativi di cambiamenti fisiologici.

Una riduzione della lunghezza e del peso secco delle piantine è stata osservata, con un valore di LD₅₀ di 19.900 µg/L per quelle germinate in fotoperiodo e valore LD₅₀ di 14.700 µg/L per quelle germinate nell'oscurità (M-Hamvas *et al.*, 2003).

L'esposizione di semi di *O. sativa* e *B. napus* a diverse concentrazioni di un estratto senza cellule, contenente tre varianti di MC (MC-LR, MC-RR e MC-YR) per dieci giorni a concentrazioni comprese tra 24 e 3000 µg/L, ha causato effetti fitotossici principalmente su *B. napus*, che aveva la percentuale più bassa di germinazione e peso secco (Chen *et al.*, 2004). L'accumulo di tossina nei tessuti vegetali era dose-dipendente, con un massimo di 0,651 mg/g di peso fresco. Piantine di *Brassica oleracea* var. *italica* Plenck e *S. alba* sono state coltivate in terreno di vermiculite (60:40, v/v) e irrigate con acqua contenente concentrazioni di MC di 1 e 10 µg/L: una leggera inibizione della crescita (10%) è stata osservata per *Brassica oleracea* var. *italica*; attraverso spettrometria di massa è stata rilevata solo MC-LR nelle radici delle piante a concentrazioni comprese tra 0,9 a 2,6 ng/g di peso fresco (Järvenpää *et al.*, 2007).

Attraverso la germinazione dei semi di *Pisum sativum* L., *Lactuca esculenta*, *Zea mays* e *Triticum durum* in carta da filtro imbevuta con estratto senza cellule contenente MC-LR a concentrazioni tra 1.600-11.600 µg/L, è stata osservata una relazione dose-dipendente sia nell'inibizione della germinazione che nella diminuzione della lunghezza dell'epicotile e della radice primaria nonché nel numero di radici laterali dovute ad anomalie causate dal periciclo. Inoltre, il danno era irreversibile nella specie più sensibile (*P. sativum*) e reversibile in quella meno sensibile (*L. esculenta*) (Saqrane *et al.*, 2008).

Sono state valutate anche altre specie di rilevante importanza economica e dietetica. In piantine di undici specie (*Glycine max* (L.) Merril, *P. vulgaris*, *Z. mays*, tra gli altri) cresciute su terreno solidificato esposto a MC-LR e -LF ed estratto senza cellule contenente MC-LR, per 24 ore a concentrazione di 5 µg/L, si è verificato bioaccumulo nelle radici (da 12 a 127 µg/kg massa fresca) in misura maggiore che nei loro steli (da 1,0 a 64 µg/kg massa fresca) (Peuthert *et al.*, 2007); inoltre è stata riscontrata correlazione tra bioaccumulo e danno cellulare misurato dovuto alla perossidazione lipidica.

Il metodo di applicazione della tossina interferisce con il suo assorbimento. Quando 100 mL di estratto grezzo da fioriture contenente 1,7 µg/L di dieci varianti di MC (principalmente MC-RR e MC-LR) sono stati applicati direttamente alla radice o alla parte aerea di *L. sativa*, *B. napus*, *Lolium perenne* L. e *Trifolium repens* L. coltivate in sabbia, per tre o sei giorni, Crush *et al.* (2008) sono state riscontrate differenze nel bioaccumulo (valori compresi tra 550 e 3.330 µg/kg peso secco). La tossina non è stata trovata nelle foglie quando applicata direttamente nella radice, indicando un'assenza di traslocazione della molecola.

Anche l'uso di acque sotterranee può portare a contaminazioni. Nelle piante di orticoltura, come ravanella (*Raphanus sativum* L.), lattuga (*L. sativa*), rucola (*Eruca sativa* L.), cavolo (*Brassica oleracea* L.) e prezzemolo (*Petroselinum crispum* (Mill.) Nym.) irrigati con acque sotterranee contaminate con MC-YR (Mohamed & Al-Shehri, 2009), sono state rilevate concentrazioni comprese tra 0,07 e 1,2 µg/g di peso fresco accumulate nelle radici e nelle foglie. Le piante non hanno mostrato eventuali cambiamenti morfologici e fisiologici o inibizione della crescita. Secondo gli autori di questo studio, le concentrazioni di MC trovate nelle acque sotterranee non erano abbastanza alte da provocare effetti sulle piante; tuttavia, questi valori non dovrebbero essere scartati quando si considera il consumo umano.

In uno studio del 2012 Chen *et al.* hanno valutato l'accumulo di MC a basse concentrazioni (da 10 a 200 µg/L) in chicchi di *O. sativa* in ambiente naturale con irrigazione di acqua dal lago Taihu, Cina. Ventuno campioni su 44 studiati hanno mostrato bioaccumulo di MC-LR.

In uno studio del 2004 di Chen *et al.* per determinare gli effetti delle MC sulla colza (*Brassica napus* L.) e sul riso (*Oryza sativa* L.) è stato utilizzato un estratto grezzo di fioriture cianobatteriche tossiche dal lago Dianchi nella Cina sudoccidentale. Sono stati condotti esperimenti su una gamma di dosi dell'estratto (equivalenti a 0, 0,024, 0,12, 0,6 e 3 µg MC-LR/mL). Le indagini hanno mostrato che l'esposizione alle MC aveva inibito la crescita e lo sviluppo sia del riso che delle piantine di colza, tuttavia, le MC avevano avuto un effetto inibitore più potente sulla colza rispetto al riso nella percentuale di germinazione dei semi e nell'altezza della piantina. Le MC avevano inibito significativamente l'allungamento delle radici primarie delle piantine di colza e riso.

La determinazione delle attività della perossidasi e della SOD ha dimostrato che lo stress da MC si manifestava come stress ossidativo. Utilizzando l'ELISA, le MC sono state misurate negli estratti di colza e piantine di riso esposte, indicando che il consumo di piante commestibili esposte alle MC a causa dell'irrigazione può avere rischi per la salute. Chen *et al.* (2010) hanno rilevato che negli alberi da frutto come il melo (*Malus pumila* Mill.), bioaccumulo di MC nei tessuti ed effetti nocivi vengono causati *in vitro* dall'esposizione a estratti di *M. aeruginosa* produttrice di MC-LR.

Dopo l'esposizione a MC (oltre 0,3 µg/mL) crescita e proliferazione dei germogli di *M. pumila* diminuiscono drammaticamente. Inoltre, dopo 14 giorni di esposizione a 3 mg/mL di MC, le piante ne hanno bioaccumulato una quantità equivalente a 36,45 ng/g/giorno. L'attuale legislazione dei vari Paesi di solito considera le raccomandazioni fornite dalla WHO su rischi di contaminazione e limiti di concentrazioni accettabili di cianotossine, sia nell'acqua potabile che nell'assunzione quotidiana per qualsiasi altra via. Il consumo da parte dell'uomo di cibo

contaminato da cianotossine può essere una via di esposizione a cui non è stata prestata sufficiente attenzione.

In un recentissimo studio pubblicato nel gennaio 2021, Nery *et al.* hanno valutato gli effetti di due cianotossine (MC-LR e saxitossina) sulla germinazione, crescita e formazione di micronuclei in lattuga (*Lactuca sativa*) e coriandolo (*Coriandrum sativum*). I semi di lattuga e coriandolo erano esposti per 7-9 giorni a concentrazioni rilevanti per l'ambiente di MC-LR (MC-LR1= 0,4 µg/L; MC-LR2= 1,0 µg/L; MC-LR3= 5,0 µg/L) e saxitossina (SX1= 0,02 µg/L; SX2= 0,1 µg/L; SX3= 0,4 µg/L).

Nel test di germinazione sono state osservate risposte differenti: la MC-LR non interferiva nella germinazione della lattuga, mentre la saxitossina la inibiva fino al 70%. Sebbene non fossero riscontrati effetti della MC-LR sulla germinazione, è stata riscontrata una maggiore incidenza di piantine con necrosi, due volte maggiore rispetto a quelle trattate con saxitossina. L'esposizione dei semi di coriandolo ha portato ad una inibizione della germinazione, specialmente in seguito a trattamento con MC-LR, ma non ha portato a necrosi delle radici. Le cianotossine inibiscono lo sviluppo delle piantine in entrambe le specie vegetali e promuovono la formazione di micronuclei nelle cellule radicali. Lo studio ha evidenziato che le cianotossine inibiscono la germinazione dei semi, la crescita e causano danni al DNA, ma l'intensità dipende sia dalla natura della tossina sia dalle specie vegetali.

Microcistina-RR

Una diminuzione della crescita di *Vallisneria natans* (Lour.) Hara è stata osservata dopo l'assorbimento di MC-RR da parte di semi e piantine esposti a una concentrazione di 10-10.000 µg/L per trenta giorni, con accumulo differenziale e una relazione dose-dipendente tra le radici (da 0,6 a 14.800 µg/kg di peso fresco) e le foglie (da 0,3 a 300 µg/kg di peso fresco) (Yin *et al.*, 2005a).

Uno studio su campo di tre varianti comuni di MC (MC-LR, MC-RR e MC-YR) in campioni di ortaggi (n = 161), suolo (n = 161) e acqua di irrigazione (n = 23) raccolti dalle regioni della Cina meridionale colpite da fioriture di cianobatteri, ha mostrato la loro prevalenza con concentrazioni totali fino a 514 µg/L di acqua, 187 µg/kg di terreno (peso secco) e 382 µg/kg di verdura (peso fresco). La MC-RR è stata la variante primaria rinvenuta in tutti i tipi di campioni, rappresentando dal 51,3 al 100% delle concentrazioni totali di MC.

Significative correlazioni concentrazione-dipendenti ($p < 0,05$) hanno dimostrato che l'irrigazione con acque contenenti MC era la principale fonte di accumulo sia negli ortaggi che nel suolo.

In *Lemna gibba* L. coltivata per dodici giorni in terreno di coltura contenente MC-RR e MC-WR a concentrazioni comprese tra 75 e 300 µg/L è stata evidenziata una riduzione della crescita, del contenuto in clorofille a e b e stress ossidativo, oltre a bioaccumulo di tossine nei tessuti vegetali. MC-RR e un'altra variante sconosciuta sono state rilevate nella massa fresca, indicando un possibile catabolismo della tossina vegetale (Saqrane *et al.*, 2007). La coltivazione di cellule di *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh, esposte all'attività enzimatica antiossidante a 10, 100, 1.000 e 5.000 µg/L di MC-RR per 24 h e 48 h, ha mostrato stress ossidativo nelle due concentrazioni più alte per l'esposizione più lunga (Yin *et al.*, 2005b).

Con la MC-RR si osservava una riduzione dose-dipendente della lunghezza e dell'attività delle piantine e dell'attività di PP1 e PP2A, con valore LD₅₀ di 800 µg/L. Inoltre, l'assorbimento di MC-RR era anche dose-dipendente ed è stata riscontrata una concentrazione di 5,3 µg/kg di massa fresca in piantine dall'aspetto sano (Kurki-Helasma & Meriluoto, 1998).

Sono state osservate differenze significative negli effetti fitotossici sulle piante di *Solanum tuberosum* L., *S. alba* e *Phaseolus vulgaris* quando esposte a varianti di MC (MC-RR, MC-LR e MC-LF), essendo la MC-RR la più letale (McElhiney *et al.*, 2001). È stato osservato un aumento della velocità di germinazione di *B. napus* e nei semi di *Brassica chinensis* L. dopo l'esposizione a basse concentrazioni di estratto senza cellule da fioriture contenenti MC-RR (1 e 10 µg/L). In questo stesso materiale, una riduzione è stata osservata a concentrazioni più elevate (100 e 1.000 µg/L), con il grado di inibizione che variava a seconda dello stadio della vita vegetale (maggiore danno negli individui più giovani ed in quelli con un tempo di esposizione più lungo) (Bibo *et al.*, 2008).

CILINDROSPERMOPSINA

La CYN è un alcaloide triciclico ($C_{15}H_{21}N_5O_7S$) associato a tossicità renale e insufficienza epatica. Per CYN è anche stata evidenziata attività genotossica (Zegura *et al.*, 2011; Straser *et al.*, 2011; Puerto *et al.*, 2018; Pichardo *et al.*, 2017) Inoltre a livello internazionale la tossina è stata riconosciuta come una minaccia a causa della natura invasiva del suo principale produttore, *Cylindrospermopsis raciborskii* (Svircev *et al.*, 2019) A livello molecolare la CYN può interagire con i ribosomi che inibiscono la sintesi delle proteine nelle cellule (Froscio *et al.*, 2003). CYN è stata segnalata in acque superficiali a concentrazioni fino a 173 $\mu\text{g/L}$ (Buratti *et al.*, 2017) e anche in contemporanea con le MC (Diez-Quijada *et al.*, 2018).

La Figura 2 riporta la struttura della CYN.

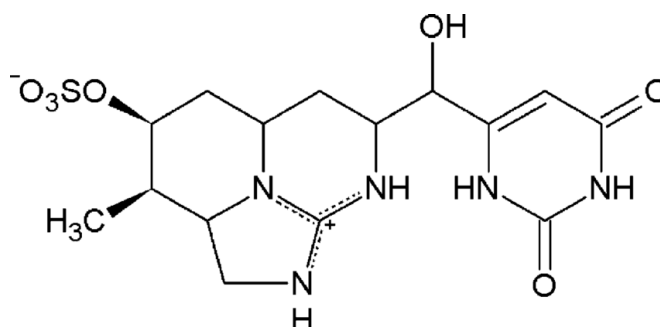


Figura 2. Struttura della cilindrospermopsina

La principale via di esposizione umana di queste cianotossine è il consumo di acqua o pesce contaminati. Tuttavia, il consumo di verdure e integratori alimentari contaminati può costituire una fonte importante di esposizione umana (Cordeiro Araujo *et al.*, 2017). In effetti, come visto prima, le verdure sono potenziali depositi di cianotossine se irrigate con acqua dolce contaminata (Bihn *et al.*, 2013). Questa pratica agricola è potenzialmente dannosa per lo sviluppo, per la resa e la qualità delle piante. È stato dimostrato che le MC influenzano le radici e lo sviluppo dei germogli, inibiscono la germinazione dei semi e influenzano il metabolismo delle piante (Chen *et al.*, 2004; Pereira *et al.*, 2009; Gehringer *et al.*, 2003; El Khalloufi *et al.*, 2012).

La CYN ha anche dimostrato di essere avversa alle piante, specialmente ad alte concentrazioni nell'acqua (sopra 100 $\mu\text{g/L}$) (Mathè *et al.*, 2013; Freitas *et al.*, 2015). La CYN può causare stress ossidativo (Prieto *et al.*, 2011); inibire la germinazione (Metcalf *et al.*, 2004) e la crescita (Vasas *et al.*, 2002; Beyer *et al.*, 2009) e innescare una serie di effetti biochimici (Mathè *et al.*, 2017). Recentemente, i sintomi della morte cellulare programmata sono stati segnalati in due modelli di piante vascolari dopo l'esposizione a CYN 100 $\mu\text{g/L}$ (M-Hamvas *et al.*, 2017). Al contrario, l'esposizione a basse concentrazioni di CYN (inferiori a 100 $\mu\text{g/L}$) potrebbe non essere dannosa per le piante. Ad esempio, assenza di effetti, o addirittura stimolazione della crescita, sono stati riportati da Freitas *et al.* (2015) in colture idroponiche di lattuga esposte 1 o 10 $\mu\text{g/L}$ MC, CYN o MC + CYN. Inoltre, Guzman-Guillén *et al.* (2017) hanno riferito un aumentato tasso crescita di carote esposte a 50 $\mu\text{g/L}$ di CYN, e alcune piante aromatiche come il prezzemolo (*Petroselinum crispum* L.) e anche il coriandolo (*Coriandrum sativum* L.) hanno mostrato tolleranza a MC e CYN (Pereira *et al.*, 2017).

Freitas *et al.* (2015) hanno dimostrato che le cianotossine come MC e CYN interferiscono con l'accumulo di minerali nella lattuga. Inoltre i cambiamenti nel metabolismo delle piante esposte alle cianotossine potrebbero portare all'accumulo di proteine potenzialmente allergeniche.

In un lavoro del 2019 di Llana-Ruiz-Cabello *et al.* è stata valutata la suscettibilità di due verdure verdi, spinaci e lattuga, alle cianotossine, MC e CYN, singolarmente e in miscela. Lo studio consisteva nel far crescere entrambi gli ortaggi in coltura idroponica, in condizioni controllate, per 21 giorni in mezzo nutritivo addizionato con MC o CYN a 10 µg/L e 50 µg/L, o miscela CYN / MC a 5 + 5 µg/L e 25 + 25 µg/L. Sono stati utilizzati estratti di *M. aeruginosa* e *A. ovalisporum* come fonti di tossine. Lo studio ha rivelato una inibizione nella crescita della parte aerea (foglie) in entrambe le specie se trattate con 50 µg/L di MC, CYN e con la miscela CYN/MC.

La MC ha dimostrato di essere più dannosa per la crescita delle piante rispetto alla CYN. Inoltre negli spinaci la crescita delle foglie è stata inibita sia da miscele 5 + 5 che da 25 + 25 µg/L CYN/MC, mentre nella lattuga l'inibizione si è manifestata solo da 25 + 25 µg/L di miscela CYN/MC.

Nel complesso, l'evidenza dei dati sulla crescita ha sottolineato una maggiore sensibilità degli spinaci alle cianotossine rispetto alla lattuga. D'altra parte, le piante esposte alla miscela CYN/MC hanno mostrato un diverso accumulo di CYN e MC. Inoltre, CYN, ma non MC, è stata trasferita dalle radici alle foglie. CYN e MC hanno influenzato i livelli dei minerali in particolare nelle radici delle piante. Gli elementi più interessati erano Ca, K e Mg. Tuttavia nelle foglie, K era il minerale che è stato maggiormente influenzato dall'esposizione alle cianotossine.

In un lavoro del 2012, Kittler *et al.* hanno studiato specie di *Brassica* importanti per l'orticoltura e altamente consumate per determinare il livello di CYN nelle foglie dopo l'esposizione delle radici alla tossina. Il trattamento di *Brassica oleracea* var. *sabellica*, *Brassica juncea*, e *Sinapis alba* in condizioni sperimentali variabili ha mostrato un significativo assorbimento di CYN, con livelli di CYN compresi tra il 10% e il 21% nelle foglie rispetto alla concentrazione di CYN applicata alle radici (18-35 µg/L). Nelle piantine sono state osservate concentrazioni di CYN fino a 49 µg/g di peso fresco. Quindi le piante coltivate irrigate con acqua contenente CYN possono rappresentare una fonte significativa di questa tossina all'interno della catena alimentare.

Per valutare il rischio dell'esposizione umana alla CYN, Cordeiro-Araujo *et al.*, in un lavoro del 2017, hanno studiato il bioaccumulo e la depurazione della tossina in lattuga (*Lactuca sativa* L.) e rucola (*Eruca sativa* Mill.), dopo irrigazione con acqua contaminata. Le verdure sono state irrigate per 7 giorni con acqua contaminata CYN (3, 5 e 10 µg/L) (fase di bioaccumulo) e successivamente irrigate per 7 giorni con acqua distillata non contaminata (fase di depurazione). In generale, il bioaccumulo di CYN in entrambe le verdure è diminuito con l'aumentare della concentrazione di esposizione. Il fattore di bioconcentrazione (BCF = CYN tot nei vegetali/ CYN nell'acqua) di CYN è aumentato con la progressione dell'esperimento a 3,0 µg/L di CYN, mentre il contrario si è verificato a 5 e 10 µg/L di CYN. Nella rucola, il BCF è aumentato per tutte le concentrazioni di esposizione alla CYN durante lo studio. Ciò implica che il bioaccumulo di CYN nella lattuga e nella rucola dipende sia dalla concentrazione di esposizione che dalla specie.

La depurazione della CYN è diminuita con l'aumento della concentrazione di esposizione ma era più alta nelle piante di entrambe le specie con il più alto bioaccumulo di CYN. In particolare, nelle piante precedentemente irrigate con acqua contaminata con 3, 5 e 10 µg/L CYN, la depurazione dalla tossina era rispettivamente 60,68%, 27,67% e 18,52% per la lattuga e 47%, 46,21% e 27,67% per la rucola.

La TDI di CYN per 10 o 40 g di lattuga e rucola consumata da un bambino di 25 kg o da un adulto di peso 60 kg, rispettivamente è stata calcolata in base alla quantità di tossina

bioaccumulata nelle verdure durante le fasi sperimentali di bioaccumulo e di depurazione utilizzando l'equazione seguente:

$$\text{TDI tot. lattuga o rucola} = \frac{\text{CYN}_{40\text{g}}^{-1} \text{ oppure } 10\text{g}^{-1}}{\text{BM}_{\text{adulto o bambino}}}$$

dove $\text{CYN}_{40\text{g}}^{-1}$ oppure 10g^{-1} è la quantità di CYN accumulata in 40 g oppure 10 g di lattuga e rucola e BM adulto o bambino è la massa corporea di un adulto (60 kg) o un bambino (25 kg).

La valutazione dei rischi per la salute umana ha rivelato che il consumo di circa 10-40 g di verdure per pasto espone bambini e adulti a 1,00-6,00 ng CYN/kg di massa corporea per lattuga e 2,22-7,70 ng CYN/kg di massa corporea per la rucola. L'irrigazione di lattuga e rucola con acqua contaminata contenente basse concentrazioni di CYN costituisce quindi una potenziale via di esposizione umana.

I risultati del bioaccumulo ottenuti in questo studio hanno dimostrato che l'irrigazione di lattuga e rucola con l'acqua contaminata da CYN rappresenta un'importante via di esposizione umana alla tossina.

La percentuale di depurazione aumenta con l'aumentare della quantità di CYN bioaccumulato in lattuga e rucola. Comunque la depurazione della CYN è stata generalmente lenta in entrambe le verdure (dati ottenuti con LC/MS-MS). Sebbene i valori di CYN trovati nel presente studio fossero inferiori alla dose giornaliera raccomandata per l'uomo ($<0,03 \mu\text{g} / \text{kg}$ al giorno), i risultati dimostrano che esiste il rischio di ingerire la tossina in verdure contaminate. Considerando che le concentrazioni di CYN utilizzate nello studio sono rilevanti a livello ambientale, è importante indagare su più specie vegetali per accertare l'entità del rischio associato al bioaccumulo di CYN.

BMAA (β -N-METILAMMINO-L-ALANINA)

La BMAA è un aminoacido non proteico (Figura 3) che è stato scoperto nel 1967 dai semi di *Cycas micronesica* sull'isola di Guam (Vega *et al.*, 1967).

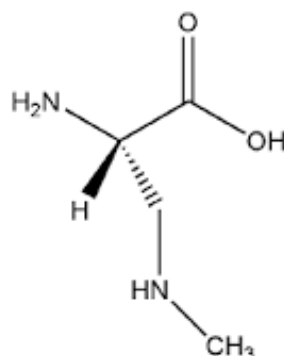


Figura 3. Struttura della BMAA

Questo composto neurotossico (Chiu *et al.*, 2011) è stato correlato all'alta incidenza di Sclerosi Laterale Amiotrofica/Complesso Parkinsonismo-demenza (SLA/PDC) osservata tra la popolazione indigena Chamorro. Questa ipotesi è stata prima 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* sp.) (Cox, *et al.* 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).

Il bioaccumulo e la biomagnificazione della BMAA, una potente neurotossina, sono stati dimostrati in varie reti trofiche. L'acquisizione è allarmante poiché questa intensificazione della BMAA ha come conseguenza l'esposizione a concentrazioni più elevate rispetto ad una fonte diretta di cianobatteri. Poiché più prodotti alimentari vengono identificati come fonte di BMAA e con grandi variazioni di contenuto tossico, lo scopo di uno studio del 2019 di Esterhuizen-Londt *et al.* è stato di valutare l'assorbimento e l'accumulo di BMAA da parte di due verdure comunemente consumate, *Lactuca sativa* e *Allium fistulosum*. Durante la crescita e la maturazione sono state valutate sia piante esposte a BMAA pura in esperimenti di laboratorio controllati, sia verdure irrigate naturalmente con acqua contenente BMAA prodotta da una fioritura di cianobatteri. In particolare l'acqua contenente BMAA proveniva dal lago Chao nella provincia di Anhui della Repubblica Popolare Cinese, durante una forte fioritura di *Microcystis aeruginosa* (Peuthert *et al.*, 2015). Il materiale del bloom è stato raccolto e filtrato attraverso filtri di cellulosa ed essiccato a 70°C per 12 h. Contemporaneamente sono stati campionati *C. pepo* (zucchina), *A. fistulosum* (cipollotto) e *B. rapa chinensis* (Pak choi), coltivati su campi microagricoli sulla riva del lago Chao e irrigati con acqua contenente la fioritura algale. Per ogni specie di pianta sono stati prelevati cinque diversi campioni da tre campi agricoli.

Dopo 60 giorni di esposizione alla BMAA, le cultivar sono state esaminate e tutte le piante sono apparse sane senza segni di necrosi o avvizzimento rispetto ai controlli non esposti. Inoltre,

non sono state osservate differenze visibili per quanto riguarda la morfologia delle radici dopo la rimozione e la pulizia delle piante. Pertanto, da un punto di vista morfologico, l'esposizione a BMAA non ha influenzato la crescita delle piante durante il periodo di esposizione. Non c'erano differenze significative tra i pesi delle radici e dei germogli esposti e i loro corrispondenti controlli dei cipollotti o dei campioni di lattuga. Nelle esposizioni di laboratorio tuttavia, BMAA libera è stata rilevata in entrambe le parti mature commestibili di *L. sativa* e *A. fistulosum* dopo 60 giorni di esposizione per un totale di 4,5 µg di BMAA.

Quantità maggiori di BMAA libera sono state trovate nei cipollotti rispetto alla lattuga, anche se sono stati esposti alla stessa quantità di BMAA. Nei germogli, la BMAA libera è stata rilevata solo in *A. fistulosum*, con valori circa 6,6 volte inferiori alla BMAA libera rilevata nelle radici dei cipollotti. Tuttavia, BMAA associata alle proteine non è stata rilevata in nessuno dei campioni dopo l'esposizione a lungo termine di 60 giorni.

Nei campioni esposti alla fioritura naturale non è stato possibile rilevare BMAA negli ortaggi maturi di *A. fistulosum*, *Cucurbita pepo* o *Brassica rapa chinensis*.

Niyonzima (2010) è stato in grado di rilevare sia la BMAA libera che legata in *D. carota* e *N. officinale* dopo 5 e 7 giorni di esposizione idroponica a 100 e 500 µg/L di BMAA. Per entrambe le verdure, Niyonzima (2010) ha scoperto che la frazione di BMAA associata alle proteine era maggiore di quella libera. Esponendo *T. aestivum* a BMAA per 4 giorni, Contardo-Jara *et al.* (2014) è stato in grado di rilevare solo la BMAA associata alle proteine con esposizione a 100 µg/L di BMAA, tuttavia, sia la BMAA libera che quella legata potrebbero essere rilevate con l'esposizione a 1000 µg/L, nel qual caso la BMAA libera era 2,88 volte superiore al valore associato alle proteine. Nello studio di Esterhuizen-Londt *et al.*, sono state rilevate concentrazioni totali di BMAA inferiori rispetto a quelle riportate da Niyonzima (2010) anche se il periodo di esposizione è stato molto più lungo, ovvero 60 giorni. Tuttavia, contrariamente a questo studio, l'esposizione di Niyonzima era di natura idroponica, escludendo la possibilità di legame al suolo che avrebbe potuto verificarsi nello studio di Esterhuizen-Londt e dovrebbe essere studiata in futuro. Inoltre, nel caso della ricerca di Niyonzima, BMAA non è stata quantificata nelle colture mature, ma nelle piantine in crescita attiva, che si presume assorbano e assimilino gli aminoacidi più attivamente a causa dei requisiti per la crescita.

Contardo-Jara *et al.* (2018) hanno condotto uno studio sull'esposizione a BMAA a lungo termine di *Triticum aestivum*. Il frumento tenero (*T. aestivum* L.) è la coltura dominante nei Paesi temperati. I cereali, costituiti dal 60–70% di amido e dall'8–15% di proteine (glutine), le fibre alimentari e l'acqua sono utilizzate per l'alimentazione umana e come mangime per il bestiame: ricoprono quindi un ruolo importante nell'alimentazione.

Dopo 205 giorni, ovvero con l'esposizione alla BMAA dalla germinazione dei semi alla produzione dei semi, è stato possibile rilevare solo la BMAA associata alle proteine nelle radici, nei germogli e nei grani di *T. aestivum*. La concentrazione di BMAA associata alle proteine era dieci volte superiore nelle bacche di grano rispetto alle radici e ai germogli. Il gruppo ha discusso che ciò poteva essere dovuto al fatto che gli aminoacidi sono immagazzinati transitoriamente nei semi, che vengono poi resi disponibili durante la germinazione. Poiché i risultati di Contardo-Jara *et al.*, (2014), Contardo-Jara *et al.*, (2018) sono stati riportati in funzione del peso fresco, è difficile confrontare le quantità totali assorbite in *T. aestivum* con quelle rilevate nello studio di Esterhuizen-Londt *et al.*, in *A. fistulosum* e *L. sativa*. Tuttavia, è chiaro che la distribuzione della BMAA libera rispetto a quella associata alle proteine è diversa non solo da specie a specie, ma anche durante le diverse fasi di crescita.

Lo studio sottolinea la necessità di esaminare ulteriormente gli elementi relativi alla BMAA per comprendere il rischio di esposizione umana e la differenza tra i modelli di assorbimento della tossina a partire dalla BMAA libera o da quella contenuta nelle cellule cianobatteriche.

RISCHI DA CIANOTOSSINE PER LA SALUTE UMANA

Sinergia tra tossine diverse e tra dosi subcroniche di microcistine

In un lavoro di Freitas del 2015 un approccio basato sulla proteomica si è dimostrato lo strumento adatto per il rilevamento e l'identificazione delle risposte primarie di organismi esposti a cianotossine. Lo scopo di questo studio era confrontare i profili del proteoma fogliare delle piante di lattuga esposte a concentrazioni rilevanti di CYN (cilindrospermopsina) e di una miscela MC-LR/CYN. Le piante di lattuga sono state esposte a 1, 10 e 100 µg/L di CYN ed una ad una miscela MC-LR/CYN per cinque giorni. Le proteine delle foglie di lattuga sono state separate con elettroforesi a due dimensioni (2-DE), e quelle che erano differenzialmente abbondanti sono state quindi identificate con MALDI-TOF/TOF MS.

Le funzioni biologiche delle proteine più rappresentate in entrambi gli esperimenti sovrintendevano a fotosintesi e metabolismo del carbonio e alla risposta/difesa da stress. Anche le proteine coinvolte nella sintesi proteica e nel segnale della trasduzione sono state osservate nell'esperimento MC-LR/CYN: gli effetti sono apparsi dipendenti dalla concentrazione, e gli effetti della miscela sono risultati chiaramente più forti di quelli della sola CYN. I risultati ottenuti evidenziano la presunta tolleranza della lattuga alla CYN a concentrazioni fino a 100 µg/L. Inoltre, la combinazione di CYN con MC-LR a basse concentrazioni (1 µg/L) ha stimolato un significativo aumento del peso fresco di foglie di lattuga, e a livello proteomico ha determinato l'aumento in abbondanza di un elevato numero di proteine.

Al contrario, molte proteine hanno mostrato una diminuzione in abbondanza o erano assenti nei gel della simultanea esposizione a 10 e 100 µg/L MC-LR/CYN. In quest'ultimo caso si è evidenziata anche una significativa diminuzione del peso fresco delle foglie di lattuga. Questi risultati forniscono importanti evidenze sul meccanismo molecolare della risposta della lattuga alla CYN e alla miscela MC-LR/CYN, e possono contribuire all'identificazione delle proteine che possono conferire tolleranza alla CYN ed alla miscela CYN/MC-LR.

La castagna d'acqua (*Trapa natans*) è una delle verdure più popolari nei Paesi asiatici, e cresce in acque poco profonde. Nell'ottobre 2007 sei campioni sono stati acquistati nei mercati di Wuxi, in Cina, e nel 2009 diciotto campioni di castagna d'acqua sono stati raccolti dal lago Tai.

La soluzione di estrazione della castagna d'acqua è stata purificata con una colonna di estrazione in fase solida e cartucce per cromatografia di immunoaffinità, quindi il livello delle MC è stato rilevato mediante saggio ELISA e cromatografia liquida-spettrometria di massa (LC-MS). I risultati dell'ELISA hanno mostrato che sei campioni raccolti dal Lago Tai contenevano MC; il livello più alto di MC totali riscontrato è stato di 7,02 ng/g. I risultati di LC-MS hanno confermato che MC-LR e MC-RR erano presenti in cinque campioni.

Il livello più alto di MC-LR era di 1,02 ng/g e quello di MC-RR era di 4,44 ng/g. Si erano verificate forti fioriture di cianobatteri e MC erano state rilevate nell'acqua nei punti del lago Tai dove si sono riscontrate MC nelle castagne d'acqua raccolte nel 2007.

MC non sono state rilevate nei sei campioni acquistati nei mercati di Wuxi. I risultati hanno suggerito che più MC possono accumularsi nelle castagne d'acqua, il che rappresenta un potenziale pericolo per la salute umana (Xiao *et al.*, 2009).

L'alchilbenzensolfonato (LAS), un tensioattivo anionico ampiamente utilizzato per applicazioni industriali e domestiche, e la MC-LR sono ampiamente distribuiti in ecosistemi di ambienti terrestri e acquatici, ma i loro effetti ecotossicologici combinati erano sconosciuti (Wang

et al., 2011). Dopo le indagini sugli effetti tossici di MC-LR, LAS e della loro miscela in *L. sativa*, e dopo aver valutato il grado di accumulo di MC-LR nella lattuga con o senza LAS, Wang *et al.* (2011) hanno osservato cambiamenti nella germinazione dei semi e nella crescita delle radici, dove la crescita delle piantine era più sensibile che nella germinazione all'esposizione tossica. Questi risultati hanno suggerito l'esistenza di un'interazione sinergica tra MC-LR e LAS.

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

In uno studio del 2018 di Jia *et al.*, sono state sistematicamente studiate le fitotossicità combinate di tre tipi di inquinanti associati ai cianobatteri: MC-LR (MC-LR), cadmio (Cd), 2, 4, 4'-triclorobifenile (PCB-28). Dopo 7 giorni di esposizione, sono stati rilevati forti effetti sinergici nel caso in cui semi e piantine di *Arabidopsis thaliana* fossero esposti a miscele binarie di MC-LR + PCB-28 e PCB-28 + Cd.

L'inibizione più forte si è verificata nel caso in cui *A. thaliana* era stata esposta alla loro miscela ternaria sia in condizioni di serra che di semi-campo. Inoltre, il bioaccumulo di MC-LR, Cd e PCB-28 risultava aumentato quando le piantine erano esposte alle miscele binarie/ternarie, specialmente quando le piantine erano state trattate con concentrazioni più elevate di sostanze tossiche (MC-LR 1 mg/L; Cd 10 mg/L; PCB-28 1 µg/L). Inoltre, gli effetti tossici pronunciati sono stati determinati entro 7 giorni dall'irrigazione delle piantine con acqua grezza contenente una fioritura di cianobatteri (raccolta dal lago Taihu in Cina) e le sue diluizioni.

La produzione di semi risultava diminuita significativamente dopo l'irrigazione continua con acqua contenente fioriture di cianobatteri.

I contaminanti tossici provenienti dall'acqua eutrofica potrebbero essere trasferiti e accumulati nei tessuti vegetali tramite irrigazione o altre vie di esposizione. Codd *et al.* (1999) hanno riferito che le piante coltivate potrebbero accumulare alte concentrazioni di tossine dopo l'irrigazione a spruzzo con acqua eutrofizzata. Chen *et al.* (2004) hanno anche suggerito che le MC potrebbero accumularsi nelle piantine di riso dopo esposizioni a 3 µg di MC-LR equivalenti/mL per 10 giorni. Risultati simili sono stati riportati da Pflugmacher *et al.* (2007) in altre piante coltivate.

Tuttavia, le indagini riguardanti l'accumulo di multi-contaminanti nelle piante coltivate, soprattutto dopo la fertilizzazione o l'irrigazione con acqua eutrofizzata contenente fioriture di cianobatteri, sia in condizioni di laboratorio che in campo, sono tutt'altro che documentate.

I risultati dello studio di Jia *et al.* indicano che la co-esposizione di piantine di *A. thaliana* a sostanze tossiche derivate da fioriture cianobatteriche ha portato a un bioaccumulo molto più elevato di diverse sostanze tossiche, che è simile ai risultati degli studi sull'irrigazione delle piantine di lattuga con un tensioattivo anionico (LAS) e MC-LR (Wang *et al.*, 2011).

Il possibile meccanismo può essere spiegato in questo modo: un agente può influenzare la solubilità e il bioassorbimento di altri. Un fenomeno simile è stato riportato anche in studi precedenti associati al bioaccumulo di ioni metallici e MC nelle cellule algali (Saito *et al.*, 2008). Secondo le spiegazioni di cui sopra, l'aumento del bioaccumulo di Cd può essere causato dall'effetto contrastato tra Cd e MC, che riducono significativamente la disponibilità di Cd nei tessuti vegetali. D'altra parte, i PCB e gli inquinanti organici tossici possono anche interagire tra loro e influenzare ulteriormente l'essudazione della pianta e la successiva complessazione e assorbimento del Cd. Alkio *et al.* (2005) hanno suggerito che gli IPA penetrerebbero passivamente nelle membrane delle cellule radicali senza alcun vettore, il che potrebbe facilitare la penetrazione di metalli (o complessi metallici) nelle cellule.

Poiché l'irrigazione anche con acqua eutrofica contenente MC a bassa concentrazione potrebbe rappresentare un potenziale rischio per le piante coltivate, la fertilizzazione e/o

l'irrigazione con concime di fioriture cianobatteriche raccolto meccanicamente dai laghi eutrofizzati in Cina porterà inevitabilmente a danni per le piante coltivate.

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

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

Per le MC, la WHO raccomanda un limite di dose giornaliera tollerabile (*Tolerable Daily Intake*, TDI) umana di 0,04 µg kg/1 mese/1 peso corporeo (WHO, 2011). Per i rischi per la salute dei PCB, il Comitato congiunto di esperti FAO/WHO sugli additivi alimentari e sui contaminanti (*Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives*, JECFA) ha suggerito un'assunzione mensile massima tollerabile provvisoria di 70 pg TEQ (equivalente tossico/kg (peso corporeo/mese (JECFA, 2002).

Per ragioni pratiche, le assunzioni massime possono essere gestite come se si trattasse di TDI di 2 pg TEQ kg/ giorno/ peso corporeo (Baars *et al.*, 2004). Le linee guida provvisorie sull'assunzione giornaliera umana di Cd (cibo) sono fornite da US EPA e WHO in modo comparabile rispettivamente con valori di 10⁻³ mg/kg/giorno e 25 µg/kg (peso corporeo)/mese (JEFCA, 2010).

I risultati hanno indicato che il consumo di ortaggi e altre piante coltivate che sono state irrorate o irrigate con le fioriture algali raccolte meccanicamente non era sicuro poiché la maggior parte delle piante coltivate esaminate accumulava elevate concentrazioni di MC, PCB diossina-simili e Cd, che erano ben oltre i valori di sicurezza.

In uno studio su campo del 2019 di Xiang *et al.* su tre varianti comuni di MC (MC-LR, MC-RR e MC-YR) in campioni di ortaggi (n=161), suolo (n=161) e acqua di irrigazione (n=23) raccolti dalle regioni della Cina meridionale colpite da fioriture di cianobatteri, specie di *Microcystis* (con densità cellulare fino a 56,43×10⁷ cell/L e proporzione del 99% all'interno del fitoplancton), hanno mostrato prevalentemente la loro presenza con concentrazioni totali fino a 514 µg/L in acqua, 187 µg/kg in terreno (peso secco) e 382 µg/kg nella verdura (peso fresco). MC-RR si è rivelata la variante primaria in tutti i tipi di campioni, rappresentando il 51,3% delle concentrazioni totali di MC.

Significative correlazioni concentrazione-dipendenti (p<0,05) hanno dimostrato che acque di irrigazione contenenti MC erano la principale fonte di accumulo sia nei vegetali che nel suolo. Nel frattempo è stato scoperto per la prima volta che le MC intracellulari nell'acqua di irrigazione svolgono un ruolo importante nel bioaccumulo nelle verdure.

Tra le specie vegetali, le verdure a foglia hanno mostrato di accumulare concentrazioni più elevate di MC (media 9,2-117,6 µg/kg, peso fresco), seguite da ortaggi a frutta (media 1,4-47,2 µg/kg) e ortaggi a radice (media 4,9-17,5 µg/kg, peso fresco).

Queste variazioni sono state attribuite a molti fattori come l'assorbimento guidato dalla traspirazione e il processo di traslocazione (Lee *et al.*, 2017; Corbel *et al.*, 2014), e diversi volumi di irrigazione delle acque e misure di irrigazione (Xiang *et al.*, 2019). È degno di nota che il sedano aveva le più alte concentrazioni di MC in tutti i siti di campionamento, dimostrando la tendenza ad accumularle. Quanto alle singole MC, MC-RR era una variante primaria in tutte le verdure (tasso di rilevamento, 90,9-100%; concentrazione media, 28,8-44,6 µg/kg, peso fresco, uguale a quello delle acque e dei suoli irrigui), seguito dagli ortaggi a frutta (media 1,4-47,2 µg/kg, peso fresco) e dagli ortaggi a radice (media 4,9-17,5 µg/kg, peso fresco).

La maggior parte dei campioni di verdure ($\geq 60\%$), in particolare il sedano, rappresentava un fattore di moderato o alto rischio per la salute umana attraverso la dieta, in base agli equivalenti di tossicità delle MC e alla dose di riferimento per MC-LR ($0,04 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{giorno}$), rivelando rischi insospettiti per la sicurezza alimentare.

Le MC nel suolo, in particolare la MC-RR, potrebbero comportare rischi ecologici elevati nel 46,4-88,3% dei suoli. Questo studio mette in evidenza i potenziali elevati rischi ecologici e per la salute umana a causa delle MC nei veri e propri sistemi suolo-vegetativi di aree interessate da fioriture di cianobatteri, implicando la necessità di una profonda indagine sulle MC negli ecosistemi terrestri.

Rischio da accumulo

Viene ritenuto che il contatto naturale tra piante terrestri e MC avvenga raramente. Tuttavia ci sono molti studi che riportano gli effetti di varie concentrazioni di MC, sia sullo sviluppo di alcune piante che sull'accumulo nel tessuto fogliare (es. Codd *et al.*, 1999; Crush *et al.*, 2008). La diffusione di queste informazioni è stata possibile perché i ricercatori hanno preso in considerazione un'importante via di contaminazione, altrimenti trascurata, ovvero l'irrigazione delle piante con acqua contaminata.

L'irrigazione di diverse piante coltivate, comprese le verdure, può portare a livelli di produzione inferiori, nonché alla contaminazione umana attraverso il consumo (Chen *et al.*, 2004). Codd *et al.* (1999) hanno verificato la presenza di MC e singole cellule e colonie di *M. aeruginosa* nelle foglie di *L. sativa* dieci giorni dopo l'ultima irrigazione con acqua contenente i cianobatteri produttori di tossine.

Successivamente, Crush *et al.* (2008) hanno osservato la contaminazione di *L. sativa* quando veniva irrigata con acqua contenente MC ad una concentrazione di $1.700 \mu\text{g}/\text{L}$ per dieci giorni, con un rischio di ingestione di $3,3 \mu\text{g}$ quando si consumano 40 g di insalata.

Hereman e Bittencourt-Oliveira (2012) hanno osservato la contaminazione di *L. sativa* irrigata ad una concentrazione inferiore, simile alle concentrazioni naturali comprese tra $0,62$ e $12,5 \mu\text{g}/\text{L}$, con un rischio di ingestione da $0,33$ a $7,11 \mu\text{g}$, che potrebbe superare la dose giornaliera tollerabile di $0,04 \mu\text{g}/\text{kg}$ di massa corporea/giorno raccomandato dalla WHO (WHO, 1998).

Tuttavia, evidenze di studio hanno dimostrato che valori superiori a quello consigliato sono presenti in colture esposte a MC a differenti concentrazioni rilevanti per l'ambiente (Hereman & Bittencourt-Oliveira, 2012; Mohamed & Al Shehri, 2009).

Inoltre, risultati hanno mostrato che l'irrigazione della lattuga con acqua contaminata da MC costituisce un pericoloso rischio per la salute pubblica a causa della quantità di tossine accumulate nella verdura e dell'azione sinergica delle stesse, che renderebbe concreta la possibilità del superamento del limite raccomandato dalla WHO.

Il fattore di bioaccumulazione delle MC totali nella lattuga è risultato variare secondo la concentrazione di esposizione, mentre la somma delle tossine accumulate nella lattuga era dipendente da concentrazione, tempo di esposizione e tossicità (Bittencourt-Oliveira *et al.*, 2016).

Pochissimi studi hanno esaminato l'impatto delle MC sulle colture usando acqua naturalmente contaminata, cioè da laghi, bacini agricoli o acque sotterranee e non MC-LR pura o estratti cianobatterici. In uno studio del 2017 è stato esaminato l'effetto dell'acqua di irrigazione ricca di MC sempre sulla lattuga in diverse fasi di sviluppo, cioè durante un periodo di due mesi, che copre l'intero periodo dalla germinazione del seme alla raccolta della pianta di dimensione commerciabile (Levizou *et al.*, 2017). Sono stati seguiti quattro gruppi di piante di lattuga che avevano ricevuto acqua ricca di MC ($1,81 \mu\text{g}/\text{L}$ di MC disciolte), provenienti dal bacino di Karla (38 km^2 in Tessaglia, Grecia centrale), un vaso artificiale costruito per finalità agricole e

caratterizzato da imponenti fioriture di cianobatteri e da un persistente ed alto contenuto di MC (da 1,5 µg/mL a 33 µg/mL) (Papadimitriou *et al.*, 2013). I gruppi sono stati seguiti negli stadi di sviluppo in sequenza: 1. stadio di semi; 2. stadio di cotiledone; 3. stadio di due foglie sviluppate; 4. stadio di quattro foglie sviluppate. Tutti gli stadi sono stati paragonati a piante di controllo che ricevevano acqua di rubinetto.

Sono state misurate la crescita della lattuga, le prestazioni fotosintetiche, le caratteristiche biochimiche e minerali, nonché l'accumulo di MC nelle foglie, nelle radici e nel suolo. Le prestazioni complessive della lattuga a vari stadi di sviluppo indicavano una maggiore tolleranza, dato che la crescita mostrava alterazioni minori e gli antiossidanti non enzimatici rimanevano inalterati. Le piante che avevano ricevuto acqua ricca di MC dalla fase di semina hanno mostrato maggiori capacità fotosintetica, quantità di clorofille e contenuto di azoto fogliare. Tuttavia si è verificato un considerevole accumulo di MC in vari tessuti vegetali.

Quanto più precocemente nel loro sviluppo le piante di lattuga iniziavano a ricevere acqua ricca di MC, tanto più ne accumulavano: radici e foglie di piante esposte all'acqua ricca di MC fin dallo stadio di seme e cotiledoni mostravano concentrazioni di MC raddoppiate rispetto ai rispettivi tessuti del gruppo delle 4 foglie. Inoltre, le radici erano in grado di accumulare quantità di MC significativamente più elevate rispetto alle foglie dello stesso gruppo di piante.

Riguardo al rischio per la salute umana, i valori stimati di assunzione giornaliera (*Estimated Daily Intake*, EDI) delle foglie dei gruppi che avevano ricevuto acqua contaminata fin dallo stadio di semi e cotiledoni superavano la TDI di un fattore 6, mentre i gruppi a 2 foglie e a 4 foglie superavano la TDI di un fattore 4,4 e 2,4 rispettivamente.

Questi risultati indicano che l'irrigazione della lattuga con acqua ricca di MC può rappresentare un serio rischio per la salute pubblica, soprattutto quando l'acqua contaminata viene ricevuta sin dalle primissime fasi di sviluppo (seme e cotiledone). Infine, i risultati di tolleranza ottenuti per la lattuga hanno mostrato che il bioaccumulo di MC nei tessuti commestibili non è necessariamente associato ad effetti fitotossici.

I risultati hanno dimostrato che quanto prima una pianta nel suo ciclo di vita affronta l'esposizione, tanto maggiore è il contenuto di MC nei suoi tessuti, in particolare nelle parti commestibili, ponendo un rischio notevolmente elevato per la salute dell'uomo al momento del consumo. L'assunzione giornaliera di tossine stimata dopo aver consumato fittoni trattati, ha superato la soglia di sicurezza della WHO di 4 e 5 volte rispettivamente per adulti e bambini (Tabella 2). L'EDI è stato calcolato come segue:

$$\text{EDI} = \text{concentrazione di MC nelle radici } (\mu\text{g/g}) \\ \times \text{quantità media giornaliera di tessuto consumato (g)} \times \text{peso del consumatore (kg)}$$

considerando un adulto di taglia media (60 kg) e un bambino (25 kg) che consumano 15 g e 7,5 g rispettivamente di ortaggi a radice contaminati da MC su base giornaliera. Le porzioni sono state selezionate come indicative di un tipico pasto secondo Lee *et al.* (2017). L'EDI è stato confrontato con il livello TDI impostato su 0,04 microgrammi per chilogrammo di peso corporeo (µg/kg bw/giorno), secondo la valutazione della WHO (WHO, 1998).

In un successivo e contemporaneo studio, sempre in Grecia (Levizou *et al.*, 2020), è stato condotto un esperimento ecologicamente rilevante in termini di dose di tossina, tempo di coltivazione e uso del suolo agricolo e dell'acqua di irrigazione naturalmente contaminata. È stata studiata la risposta di crescita, il potenziale di protezione, il profilo di bioaccumulo e il relativo rischio per la salute di due ortaggi a radice ampiamente consumati, ravanella e carota, quando irrigati con acqua ricca di MC a diversi stadi di sviluppo, dal seme allo stadio di 4 foglie vere (Tabella 3). L'acqua utilizzata per l'irrigazione proveniva dal lago Karla.

Tabella 2. Assunzione giornaliera stimata (EDI) di MC in radici di ravanello e carota a seconda dei diversi stadi di trattamenti e fattore di aumento rispetto al valore TDI (0,04 µg/ kg al giorno). Vengono presentati i dati per adulti e bambini, supponendo che un adulto di 60 kg consumi 15 g di ortaggi a radice al giorno e a un bambino di 25 kg che ne consuma 7,5 g al giorno

Stadio di trattamento	Adulti		Bambini	
	EDI (µg/kg al giorno)	Fattore che eccede la TDI	EDI (µg/kg al giorno)	Fattore che eccede la TDI
Ravanello				
seme	0,170	4,24	0,204	5,09
cotiledone	0,127	3,18	0,152	3,81
2 foglie	0,072	1,80	0,086	2,16
4 foglie	0,052	1,29	0,062	1,55
Carota				
seme	0,159	3,97	0,190	4,76
4 foglie	0,044	1,09	0,052	1,31
R*	0,065	1,61	0,077	1,94

R*= Recupero: piante che hanno ricevuto acqua contaminata per la prima metà del ciclo vitale (dallo stadio di seme allo stadio di pianta di 2 mesi e mezzo) e poi acqua pura per l'altra metà del loro ciclo vitale, fino al raccolto (mod. da Levizou et al., 2020)

Tabella 3. Concentrazione di microcistine (espressa come equivalenti di MC-LR per g peso fresco) in foglie, fittoni e terreno per i gruppi di piante di ravanello e carota trattati con l'acqua di Karla in vari stadi di sviluppo. Gli impianti di controllo non lo sono presentati in quanto mostravano costantemente valori nulli. I valori sono espressi come media±deviazione standard per n=5

Stadio di trattamento	Foglie	Fittone	Suolo
Ravanello			
Seme	342,2±45,1	678,8±33,4	42,3±7,4
Cotiledone	315,7±38,9	508,0±16,8	67,5±7,8
2 foglie	226,3±43,6	287,7±40,2	31,6±3,7
4 foglie	136,5±26,4	206,2±7,8	25,8±5,6
Carota			
seme	2848,9±635,7	634,6±54,9	93,9±12,9
4 foglie	1091,9±89,8	174,7±20,6	30,9±10,8
R*	1457,9±143,3	258,3±67,9	43,2±12,5

R*= Recupero: piante che hanno ricevuto acqua contaminata per la prima metà del ciclo vitale (dallo stadio di seme allo stadio di pianta di 2 mesi e mezzo) e poi acqua pura per l'altra metà del loro ciclo vitale, fino al raccolto (modificata da Levizou et al., 2020)

Inoltre, le carote sono state sottoposte ad una prolungata fase di depurazione per valutarne il potenziale di recupero. I risultati hanno indicato un profilo sviluppo-dipendente dallo stadio di tutti i parametri misurati. Una grave riduzione della crescita che ha raggiunto rispettivamente il 50% e il 70% per il ravanello e la carota, è stata evidenziata per le piante che ricevevano acqua degradata fin dallo stadio di seme. L'impatto si è rivelato meno pronunciato quando l'acqua degradata veniva ricevuta per la prima volta nelle successive fasi di sviluppo.

Il test ELISA ha rilevato MC in entrambe le verdure a radici testate. I modelli generali di questo bioaccumulo comprendevano collettivamente:

- 1) la dipendenza dallo stadio di sviluppo;
- 2) l'efficienza marginale della fase di depurazione;
- 3) l'allocazione specie-specifica della tossina tra le parti delle piante sopra e sotto terra;
- 4) un carico di tossine minimo del suolo.

Più in dettaglio, il profilo di bioaccumulo del ravanello ha mostrato una chiara dipendenza dallo stadio di sviluppo soprattutto nel fittone commestibile, poiché la concentrazione di MC era la più alta nel trattamento delle sementi seguito in ordine decrescente da trattamenti di cotiledone, 2 foglie e 4 foglie (Tabella 3). La stessa tendenza era evidente nelle foglie di ravanello, anche se la differenza tra semi e foglie di cotiledoni non era statisticamente significativa. Nel caso delle carote, il seme e le piante a 4 foglie hanno mostrato differenze quantitative simili al ravanello in entrambe le parti, aerea e a fittone.

Sorprendentemente, nel trattamento del seme è stata rilevata una concentrazione tripla di MC rispetto al trattamento su 4 foglie in entrambe le misurazioni (specie vegetali e parti di piante). I risultati sopra descritti confermano pienamente i due studi precedenti condotti con l'applicazione di MC-LR nelle diverse fasi di sviluppo della pianta. Infatti, sia la lattuga (Levizou *et al.*, 2017) che il cetriolo (Zhu *et al.*, 2018) hanno mostrato lo stesso profilo di ravanello e carota, ovvero quanto prima una pianta è esposta a MC, nel suo ciclo di vita, tanto maggiore è il bioaccumulo di tossine. Questo spiega la ben documentata maggiore vulnerabilità delle piantine a cianotossine che sono state costantemente riportate in studi pertinenti (Azevedo *et al.*, 2014; Peuthert e Pflugmacher, 2010; Saqrane *et al.*, 2008).

La depurazione sperimentale nella carota (R) ha alleviato solo in parte il problema del bioaccumulo e del deterioramento della crescita, indicando così pericoli irreversibili. Questi risultati hanno evidenziato l'importanza di monitorare il contenuto di cianotossine nell'acqua di irrigazione ed hanno sottolineato la necessità di rivisitare i regolamenti e le linee guida riguardanti l'origine e la qualità dell'acqua di irrigazione nel quadro di un'efficace gestione delle acque agricole.

Alcuni degli studi citati (Mohamed & Al Shehri, 2009; Hereman & Bittencourt-Oliveira, 2012; Machado *et al.*, 2017a) hanno rilevato concentrazioni di MC-LR nelle colture alimentari a livelli sufficientemente alti da superare la TDI della WHO, sollevando preoccupazioni per la salute pubblica a causa dei rischi derivanti dal consumo di colture alimentari irrigate con acqua contaminata.

Le linee guida della FDA statunitense sull'acqua utilizzata per l'agricoltura e per l'irrigazione fanno riferimento solo ad *E. coli* e qualità microbica, non all'acqua contaminata da cianobatteri (US FDA, 2017). Tuttavia, domande frequenti sui cianobatteri pubblicate dall'Oregon Public Health Authority (<https://www.oregon.gov/oha/Pages/index.aspx>) hanno sottolineato che se una qualsiasi delle quattro principali cianotossine monitorate (anatosina-a, CYN, MC o saxitossine) fosse al di sopra delle linee guida per l'acqua potabile, l'acqua non dovrebbe essere utilizzata per lavare, preparare o cuocere il cibo, né dovrebbe essere usata per irrigare le colture alimentari. Ma se al di sotto delle linee guida (1,6 µg/L di MC per persone di età superiore a 6 anni), l'acqua può essere utilizzata per irrigare le colture alimentari purché sia lasciata asciugare completamente alla luce del sole su qualsiasi coltura prima di consumare i vegetali, e vengano prese misure per garantire che nessun bambino o animale beva l'acqua.

In un recente studio di Xiang *et al.* (2020), sono stati eseguiti esperimenti in vaso per confrontare il bioaccumulo, la tossicità e il rischio per la salute della MC-LR così come la sua degradazione nel suolo dopo vari trattamenti con l'aggiunta di una stessa quantità di MC-LR (150 µg/kg). I trattamenti comprendevano l'irrigazione con acqua inquinata (*Irrigation with Polluted Water*, IPW), la coltivazione in un suolo inquinato (*Cultivation with Polluted Soil*, CPS) e l'applicazione di concime cianobatterico (*Application of Cyanobacterial Manure*, ACM). Tre comuni ortaggi a foglia della Cina meridionale sono stati utilizzati negli esperimenti in vaso:

Ipomoea batata L., *Brassica juncea* L. e *Brassica alboglabra* L. Tutti gli ortaggi a foglia hanno mostrato bioaccumulo di MC-LR a seguito dei tre trattamenti, con un bioaccumulo molto più elevato, in particolare nelle radici, a seguito del trattamento ACM rispetto ai trattamenti IPW e CPS. Una tendenza opposta nella degradazione di MC-LR nei suoli dopo questi trattamenti ha indicato che l'ACM potrebbe limitare la degradazione di MC-LR nel suolo e quindi favorire il suo bioaccumulo negli ortaggi. Il bioaccumulo di MC-LR potrebbe causare tossicità per i vegetali, con i più alti effetti tossici osservati nel trattamento con ACM. Allo stesso modo, il bioaccumulo di MC-LR nelle parti commestibili delle verdure a foglia rappresentava un rischio per la salute umana da 1,1 a circa 4,8 volte maggiore nel caso del trattamento ACM rispetto ai trattamenti IPW e CPS. I risultati di questo studio hanno evidenziato un grande preoccupazione per l'utilizzo di letame cianobatterico nelle coltivazioni.

Anche altri metaboliti bioattivi possono essere presenti nell'acqua naturalmente contaminata (v. paragrafo precedente), e potrebbero interferire con le cianotossine e/o con i risultati osservati. In questa cornice, sebbene la risposta di crescita e protezione di ravanella e carota non possa essere esclusivamente attribuita in un rapporto di causa-effetto alla presenza di MC nell'acqua di irrigazione, il considerevole bioaccumulo di MC è evidente e pone gravi minacce per la salute umana. Il rischio per la salute è alto e potrebbe essere solo parzialmente ridotto dalla successiva irrigazione con acqua priva di MC.

Nelle aree colpite dalle fioriture dei cianobatteri, i processi di trattamento dell'acqua potabile sono ottimizzati per garantire l'assenza di cianotossine nell'acqua finita. Tuttavia è emersa in Cina una preoccupazione per i fanghi generati dal trattamento delle acque perché le cianotossine e i cianobatteri rimossi possono essere concentrati nei residui del trattamento delle acque (*Water Treatment Residuals*, WTR), e questi WTR sono spesso applicati sul terreno per scopi benefici. Tuttavia, l'impatto del WTR delle aree colpite dalla fioritura sull'applicazione agricola e sulla salute pubblica è difficilmente riportato.

L'obiettivo dello studio del 2020 di Ai *et al.* era di caratterizzare il WTR affetto da fioritura concentrandosi su cianotossine e cianobatteri produttori di tossine, microbiomi e profili di resistoma. Inoltre, è stato esaminato il destino delle MC derivanti da WTR nelle colture e nel suolo. I campioni WTR sono stati ottenuti da un'area interessata dalla fioritura in Ohio, negli Stati Uniti, nel novembre 2017.

Le cianotossine e i cianobatteri produttori di tossine sono stati quantificati rispettivamente con il test di immunoassorbimento enzimatico e la PCR digitale con goccioline. Microbioma e resistoma sono stati determinati con il sequenziamento Nanopore (Yuehan *et al.*, 2020) Sono state misurate le concentrazioni delle cianotossine: MC (259 µg/kg), saxitossina (0,16 µg/kg), anatoxina-a (non rilevata) e β-metilammino-L-alanina (BMAA) (575 µg/kg). Sono state determinate le concentrazioni di cianobatteri produttori di MC: *Planktothrix* ($5,3 \times 10^7$ copie del gene/g) e *Microcystis* ($3,3 \times 10^3$ copie del gene/g). I proteobatteri erano i più predominanti e *Planktothrix* era notevolmente dominante nel microbioma WTR.

La resistenza agli aminoglicosidi era la evidenza più abbondante e la resistenza agli antibiotici è stata riscontrata in più agenti patogeni (es. *Mycobacterium*). L'applicazione del terreno WTR è stata simulata coltivando carote con una miscela di WTR e terreno in una serra. Alla raccolta, circa l'80% delle MC originate da WTR è stato trovato nel terreno (83-96 µg/kg) e il 5% accumulato nelle carote (19-28 µg/kg). Questo studio ha fornito le prime informazioni sul profilo di cianotossine, microbioma e resistoma del WTR affetto da fioritura e suggerisce che è necessaria un'attenta gestione del WTR per proteggere gli ambienti agricoli, in particolare il suolo e le acque sotterranee, e la sicurezza alimentare.

Metanalisi e valutazione del rischio

Uno studio del 2021 di Zhang *et al.* ha utilizzato una formale meta-analisi per stimare i tassi di fitotossicità e bioconcentrazione delle piante agricole esposte a MC, ed il rischio per la salute umana derivante dal consumo di piante contaminate da MC. Tra le 35 piante agricole studiate, le MC erano più fitotossiche per grano duro, mais, o senape bianca e crescione. Verdure a foglia come aneto, prezzemolo e cavolo potrebbero bioconcentrare circa 3 volte più MC nelle loro parti commestibili rispetto ad altre piante agricole. Sebbene per la salute umana il rischio derivante dall'ingestione di MC potrebbe essere maggiore per le verdure a foglia rispetto ad altre piante agricole, sono necessari ulteriori lavori per confermare la bioconcentrazione delle MC in ambienti realistici acqua-suolo-pianta.

Tuttavia, bisognerebbe evitare di coltivare ortaggi a foglia, grano duro e mais sui terreni agricoli che vengono irrigati con acqua contaminata da MC, e prestare attenzione al rischio di contaminazione da MC nell'approvvigionamento alimentare agricolo.

Lo studio ha rilevato inoltre che le famiglie di piante differiscono nella loro sensibilità alle MC

Le piante della famiglia delle Brassicaceae sono le più sensibili alle MC, in base alla stimolazione dell'attività enzimatica antiossidante: Brassicaceae (147%) > Poaceae (132%) > Leguminose (129%) > Amaranthaceae (81%) > Cucurbitaceae (79%) > Asteraceae (71%) > Apiaceae (2%).

Le famiglie di piante Asteraceae e Apiaceae sono le più resistenti alle MC. La loro elevata resistenza si basa anche sul fatto che la le proprietà morfologiche sono nell'ordine meno influenzate per le Apiaceae (5%) rispetto ad Asteraceae (18%), Poaceae (49%), Brassicaceae, (58%) =Solanaceae (58%), Leguminose (62%), Cucurbitaceae (69%), e c'è minore inibizione dell'efficienza fotosintetica per le Apiaceae (2%) rispetto ad Asteraceae (22%), Brassicaceae (34%), Solanaceae (40%), Poaceae (44%) e Leguminose (62%).

Quando sono state considerate le singole specie vegetali, il grano duro si è rivelato il più sensibile alle MC, in base al fatto che le MC hanno ridotto le sue proprietà morfologiche del 69%, inibito la sua efficienza fotosintetica del 58% e ha simulato il suo sistema antiossidante del 257%.

Le piante agricole differiscono nella loro capacità di bioconcentrare MC. Dal punto di vista della salute umana, la quantità di MC che si bioconcentrano nella parte commestibile della pianta è la parte più critica. Le MC si bioconcentrano preferenzialmente nella pianta intera > fusto > radice =foglia > grano > piantina. La maggiore bioconcentrazione di MC si è verificata in riso, aneto, rucola, cavolo, piante di prezzemolo e ravanello. Una bioconcentrazione moderata di MC è stata osservata in mais, fagioli, grano duro, lattuga e piante di carota. La più bassa bioconcentrazione di MC si rileva in colza, *Arabidopsis thaliana* e cetriolo, suggerendo che queste piante possono bioconcentrare meno MC.

Nello studio è stato calcolato il valore di assunzione giornaliera stimato (EDI, µg/kg/giorno) di MC per adulti e bambini a base di MC-LR equivalenza. I valori EDI medi risultano maggiori per prezzemolo (0,9) rispetto a cavolo (0,6), aneto = rucola (0,5), lattuga (0,2), fagiolino (0,03), cetriolo (0,02), chicco di riso (0,01), carota (0,006). Si prevede una maggiore assunzione di MC quando adulti e bambini mangiano verdure a foglia come prezzemolo, aneto, rucola e cavolo cappuccio, sulla base di valori EDI che superano le linee guida della WHO, rispetto a quando consumano radice, frutta e grano.

I valori EDI per lattuga, cetriolo, fagiolino, chicco di riso e carota risultano sopra la linea guida RfD (*Chronic Reference Dose*, dose massima ammissibile come riferimento cronico), suggerendo che esiste un rischio cronico di esposizione a MC quando queste piante agricole vengono consumate.

L'estratto di fioritura naturale è derivato da cianobatteri raccolti sul campo ed in genere ricavato per sonicazione delle cellule dei cianobatteri in acqua o per estrazione con solvente o

soluzione acida diluita (es. metanolo/acqua(v/v) di 70% e 100% o 5% di acido acetico/acqua (v/v). L'estratto da fioritura naturale potrebbe contenere più congeneri di MC, così come altre cianotossine concomitanti come anatoxina-a, saxitossine, CYN e BMAA e altri metaboliti secondari prodotti nella fioritura dei cianobatteri (Ferranti *et al.*, 2011, Freitas *et al.*, 2014; Machado *et al.*, 2017; Roy-Lachapelle *et al.*, 2019; Sabart *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2020).

Questo insieme di metaboliti secondari può potenziare sinergicamente la tossicità dell'estratto da fioritura naturale, rispetto alle MC purificate (Sadler & von Elert, 2014). Inoltre, metalli in tracce come ferro e zinco, che chelano le MC o altre cianotossine, potrebbero aumentare la tossicità dell'estratto da fioritura naturale (Chin-Chan *et al.*, 2015; Facey *et al.*, 2019; Cao *et al.*, 2020). Alcuni organismi, ad esempio batteri, spore e zooplancton, attaccati sulla parete cellulare dei cianobatteri potrebbero aumentare la tossicità dell'acqua con fioritura naturale (Guo *et al.*, 2018; Kim *et al.*, 2020). Pertanto, l'estratto da fioritura naturale potrebbe essere più tossico delle altre fonti di MC.

In condizioni di campo realistiche, la concentrazione di MC in acqua di irrigazione variava in questi studi da un minimo di 1 mg di MC/L, che promuoveva la crescita delle piante a causa di ormesi e altri effetti stimolatori, fino a un massimo di 29.000 µg di MC/L, che era fitotossico (Machado *et al.*, 2017).

Di conseguenza, agricoltori e consulenti agricoli dovrebbero essere attenti al fatto che l'acqua di irrigazione da approvvigionamento idrico interessato dai cianobatteri potrebbe essere fitotossica durante tutta la stagione della fioritura, in particolare a fine estate ed autunno (Al-Sammak *et al.*, 2014; Cerasino & Salmaso, 2020; Christophoridis *et al.*, 2018; Zhang *et al.*, 2020).

Questa meta-analisi ha confermato che la fitotossicità delle MC influenza la morfologia, l'efficienza fotosintetica e del sistema antiossidante di piante agricole. La maggior parte delle piante può tollerare le concentrazioni inferiori ad 1 µg di MC/L, ma si dovrebbe evitare di coltivare le piante commestibili a foglia, patata, grano duro e mais su terreni agricoli che vengano irrigati con acqua contaminata da cianotossine. La possibilità di questa contaminazione è aumentata a causa del verificarsi sempre più frequente di fioriture di cianobatteri tossici a causa del riscaldamento globale e alla continua eutrofizzazione dei corpi idrici.

Quindi c'è un rischio crescente che le piante agricole entrino in contatto con acqua contaminata da MC, in particolare in Paesi in via di sviluppo dove le acque superficiali sono una fonte economica di acqua di irrigazione. Esperimenti su campo sul destino e il trasferimento delle MC nei campi agricoli potrebbero fornire informazioni per evitare che le MC entrino nell'approvvigionamento alimentare agricolo. I consulenti agricoli potrebbero utilizzare queste informazioni per educare gli agricoltori sui rischi associati all'irrigazione delle colture con acqua contaminata da MC.

CONTAMINAZIONE VEGETALE IN ITALIA: IL CASO DEL LAGO DI OCCHITO

Per indagare in Italia la presenza di cianotossine in vegetali commerciali coltivati con acque provenienti da bacini a rischio, sono state studiate produzioni orticole della Capitanata irrigate con acque del vicino lago di Occhito. Il lago di Occhito, creato per scopi potabili, è il più grande bacino artificiale presente in Italia ottenuto sbarrando il fiume Fortore; la sua profondità media è di 90 m, la superficie è di 13 km² e l'asse più lungo è di 12 km. Il lago è periodicamente affetto da forti fioriture di *Planktothrix rubescens*, cianobatterio produttore di MC (De Pace *et al.*, 2014).

Dal 2015 al 2016 un totale di 184 campioni è stato raccolto per lo studio. Successivamente sono stati prelevati mensilmente 111 campioni di acqua da 3 stazioni del lago e da 3 vasche di raccolta e distribuzione (Tavoliere, Finocchito e Vasca D), utilizzando una bottiglia Ruttner da 2,5 L. Inoltre da giugno 2015 a maggio 2016 sono stati raccolti 73 campioni di vegetali orticoli dalle campagne tra San Severo, Lesina e Lucera, dove le colture agricole vengono irrigate con l'acqua proveniente dalle tre cisterne sopra menzionate. Sia l'acqua che i campioni sono stati conservati in frigorifero e in assenza di luce per prevenire la degradazione delle MC (Harada *et al.*, 1996; Tsuji *et al.*, 1995). I risultati dello screening ELISA dei campioni di colture hanno mostrato valori di concentrazione di MC superiori al limite di rilevabilità in 31 campioni, con intervalli di concentrazione tra 0,2 e 1,5 ng/mL. La Figura 4 mostra i risultati delle concentrazioni di MC esperite mediante metodi ELISA nei campioni raccolti riportando solo le concentrazioni oltre il limite di rilevamento ELISA (0,1 ng/mL).

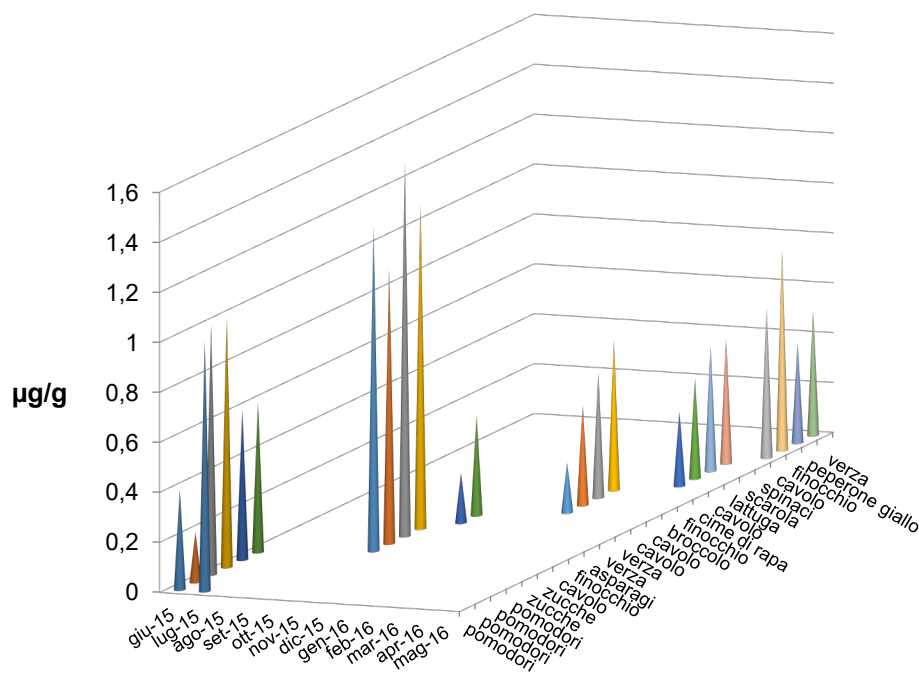


Figura 4. Microcistine totali rilevate in colture ortofrutticole della Capitanata irrigate con acque del Lago Occhito (2015-2016)

In verdure di uso quotidiano come i pomodori, è stato rilevato un valore minimo di 0,2 ng/mL e un valore massimo di 1 ng/mL nel periodo estivo (giugno 2015). Il valore più alto è stato rilevato negli asparagi ad ottobre 2015 (1,5 ng/mL), mese in cui anche molte altre verdure hanno mostrato il loro massimo valore di concentrazione di MC, misurato tramite test ELISA: cavolo 1,3 ng/mL, finocchio 1,1 ng/mL, verza 1,3 ng/mL. Nel cavolo è stata rilevata una concentrazione minima di 0,2 ng/mL e massima di 1,0 ng/mL, nel finocchio una concentrazione minima di 0,5 e massima di 0,8 ng/mL a maggio 2016, periodo in cui negli spinaci son stati rilevati 0,6 ng/mL.

Nel 2015, a seguito di un esperimento di laboratorio dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale di Foggia, utilizzando acqua di rubinetto ed acqua di irrigazione impiegata nelle colture contaminate da MC è emerso che le colture di pomodoro hanno rivelato capacità di bioaccumulo maggiore rispetto alle piante di basilico. Queste hanno mostrato presenza di contaminazione solo quando irrigate con acqua pura addizionata di almeno 2 ng/L di standard di MC-LR (Tabella 4).

Tabella 4. Esperimento sulla capacità di bioaccumulo in due specie coltivate in laboratorio; settembre 2015

Campione	Tipo di irrigazione	Concentrazione MC ($\mu\text{g/L}$)
Basilico	acqua rubinetto	NR
Basilico	acqua consorzio Capitanata	NR
Pomodoro	acqua rubinetto	0,32
Pomodoro	acqua consorzio Capitanata	0,56
Basilico	acqua con standard MC-LR (2 ng/L)	0,14

Nel 2010 sono stati effettuati test sulla possibile contaminazione da MC nei riguardi delle nocciole coltivate nei pressi del lago di Vico, un corpo d'acqua eutrofizzato che ospita da tempo periodiche fioriture tossiche di *Planktothrix rubescens* rilascianti MC nel lago e nella sua falda. La produzione di nocciole è la principale attività agricola del viterbese e del Complesso del Cimino. Le nocciole non vengono solo esportate, ma utilizzate anche per produrre gelati, torte, biscotti e creme di cioccolato, e sono largamente consumate dalle popolazioni locali. Il campione di nocciole analizzato con il metodo ELISA per contaminazione da MC ha dato un valore di 1,62 ng/g, mentre il campione prelevato a 20 km dal lago è risultato negativo. Queste due analisi sono state ripetute utilizzando un kit ELISA di diversa sensibilità (il kit anti-ADDA della ditta Abraxis, che rileva tutti gli analoghi di MC contenenti l'epitopo residuo ADDA) durante altri studi sperimentali. Questo test ha mostrato un valore di 2,3 ng/g per il campione proveniente dalla riva del lago, e un risultato negativo per l'altro campione.

METODI PER ESTRARRE ED ANALIZZARE CIANOTOSSINE DAI VEGETALI

Estrazione

L'estrazione necessaria per analizzare i vegetali tramite immunosaggio ELISA è piuttosto semplice, e può essere effettuata con rapidità. Il tipo di estrazione di seguito illustrato è rapido ed utilizzabile solo per il test ELISA, è stato utilizzato per la frutta secca, ma arrivando direttamente al passaggio dell'omogeneizzatore può essere utilizzato con successo anche per i tessuti umidi. Il seguente è idoneo anche per una contemporanea analisi con metodi strumentali, ed è utile per estrarre eventuali presenze di saxitossine.

Primo metodo

I frutti vengono privati del guscio, pesati (peso medio 2 g), macinati fino ad essere ridotti in polvere prima con mortaio e pestello poi in un omogeneizzatore elettrico per 10 min, e infine sonicati in acqua distillata per 5 min a 30-40°C e la procedura viene ripetuta due volte. Dopo le due sonicazioni e centrifugazioni, i surnatanti vengono riuniti ed analizzati in triplicato con il kit ELISA.

Secondo metodo

Un'aliquota di campione vegetale (5 g di peso umido) viene omogeneizzata ed estratta con 10 mL di MeOH utilizzando un sistema Vortex per 10 min. Il campione viene centrifugato per 5 min a 4000 rpm e il surnatante è fatto decantare e filtrato su un filtro di carta.

L'estrazione viene ripetuta sul residuo, il campione viene centrifugato e il surnatante filtrato sullo stesso filtro precedentemente utilizzato. Il filtro viene lavato tre volte con 5 mL di MeOH; la soluzione ottenuta viene raccolta, quindi ridotta a un piccolo volume (1-2 mL) mediante evaporatore rotante (Büchi, Svizzera) a 35°C e diluita a 5 mL con MeOH. Inoltre, 1 mL dell'estratto (corrispondente a 1 g) viene poi addizionato ad 1 mL di acqua distillata e caricato su una cartuccia HLB SPE Waters OASIS, preconditionata con 1 mL di MeOH seguito da 1 mL di acqua distillata. La colonna viene lavata con 1 mL di MeOH al 5% in acqua distillata. Le MC vengono eluite con 1 mL di MeOH. L'eluato MeOH diluito in 1 mL di acqua distillata viene conservato a -20°C fino all'analisi mediante test ELISA.

ELISA per microcistine

Le analisi ELISA vengono eseguite sempre in duplicato. Il test ELISA competitivo può essere diretto (es. EnviroGardKit per il rilevamento quantitativo di tre MC principali e della nodularina, range lineare 0,1, 0,2, 0,4, 0,56, 0,8, 1,6 ng/mL) o indiretto (es. anti-ADDA ABRAXIS). Quest'ultimo si basa sul riconoscimento di MC, nodularine e loro congeneri per specifici anticorpi.

La tossina, se presente in un campione, e un analogo del peptide MC immobilizzato sulla piastra, competono per i siti di legame degli anticorpi anti-MC/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 MC 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 MC-LR e tutte le altre varianti di MC, ma rileva la loro presenza globale.

Nel saggio ELISA EnviroGard le concentrazioni al 50% di inibizione (50% Bo) per i composti sono MC-LR 0,31 ppb, MC-RR 0,32 ppb e MC-YR 0,38 ppb.

Nel saggio ELISA anti-ADDA ABRAXIS il limite di rivelazione (*Limit of Detection*, LOD) per il test indiretto, 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%. Anche quest'ultimo test non distingue qualitativamente tra tutte le varianti di MC, ma rileva la loro presenza globale.

Gli anticorpi ELISA sono utilizzati con successo per rilevare MC in matrici organiche. Possono venire eseguiti test di convalida al fine di prevenire risultati falsi positivi / negativi, con campioni vegetali non contaminati addizionati con standard MC-LR a 4,8 e 16 ng/g per valutare la specificità e la precisione come descritto nella normativa 2002/657 / CEE.

ELISA per BMAA

Il test ELISA per BMAA è un test competitivo diretto basato sul riconoscimento di BMAA da parte di anticorpi specifici. Se presente in un campione, la BMAA ed un analogo BMAA-HRP (*Horseradish Peroxidase*, enzima perossidasi di rafano) competono per i siti di legame degli anticorpi di coniglio anti-BMAA in soluzione. Gli anticorpi vengono quindi legati da un secondo anticorpo immobilizzato sui pozzetti della piastra. Dopo una fase di lavaggio e l'aggiunta della soluzione di substrato, viene generato un colore di segnalazione blu. L'intensità del colore è inversamente proporzionale alla concentrazione di BMAA presente nel campione. La reazione cromatica viene interrotta dopo un tempo specifico e il colore viene valutato utilizzando un lettore ELISA; Le concentrazioni dei campioni sono determinate per interpolazione utilizzando la curva standard costruita ad ogni misurazione. Il limite di quantificazione è di circa 4 ppb ($\mu\text{g/L}$).

ELISA per cilindrospermopsina

Il test ELISA per CYN è un ELISA competitivo diretto, basato sul riconoscimento della CYN da parte di anticorpi specifici. Quando è presente in un campione, la tossina e un analogo CYN-HRP (*Horseradish Peroxidase*, enzima perossidasi di rafano) competono per i siti di legame degli anticorpi anti-CYN di coniglio in soluzione. Gli anticorpi anti-CYN vengono quindi legati da un secondo anticorpo (di capra, anti-coniglio) immobilizzato sui pozzetti della piastra. Dopo una fase di lavaggio e l'aggiunta della soluzione di substrato, viene generato un segnale di colore blu. L'intensità del colore è inversamente proporzionale alla concentrazione di CYN presente nel campione. La reazione cromatica viene interrotta dopo un tempo specifico e il colore viene valutato utilizzando un lettore ELISA; le concentrazioni dei campioni sono determinate per interpolazione utilizzando la curva standard costruita ad ogni misurazione. Il limite di rilevabilità è 0,04 ppb ($\mu\text{g/L}$).

ELISA per anatoossina-a

Il test ELISA per anatoossina-a è anch'esso un test competitivo diretto basato sul riconoscimento dell'anatoossina-a da parte di un anticorpo monoclonale. Quando presente in un campione l'anatoossina-a, e un coniugato di anatoossina-a-enzima competono per i siti di legame degli anticorpi anti-Anatoossina-a di topo in soluzione. Gli anticorpi dell'Anatoossina-a vengono quindi legati da un secondo anticorpo (anti-topo) immobilizzato sulla piastra di microtitolazione. Dopo una fase di lavaggio e l'aggiunta della soluzione di substrato, viene generato un segnale di colore blu, la cui intensità è inversamente proporzionale alla concentrazione di anatoossina-a presente nel campione. La reazione cromatica viene interrotta dopo un tempo specificato e il colore viene valutato utilizzando un lettore ELISA; le concentrazioni dei campioni sono determinate per interpolazione utilizzando la curva standard costruita ad ogni misurazione. Il limite di rilevabilità è di 0,1 ppb ($\mu\text{g/L}$).

Analisi strumentali

Microcistine

Viene utilizzato un sistema HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*) accoppiato con una sorgente di ioni elettrospray (*ElectroSpray Ionization*, ESI) ed uno spettrometro di massa a triplo quadrupolo armato con una colonna C18 da $4,6 \times 150$ mm con eluizione in gradiente di fase mobile costituita da acqua con 19 mM di NH_4OH come eluente A e MeOH/acetonitrile (80:20) come eluente B. Un programma di eluizione binaria a tasso di flusso di 0,5 mL/min viene utilizzato come segue: 0-1 min, 0% eluente B; 1-3 min, 45 % eluente B; 7 min, 90% eluente B; 9-15 min, 100% eluente B; 17-27 min, equilibrazione con 0 % di eluente B. La sorgente ionica ESI viene utilizzata in polarità negativa e i dati vengono acquisiti in modalità di reazione multipla (MRM) consentendo il rilevamento altamente selettivo e sensibile dei frammenti selezionati. La quantificazione viene eseguita utilizzando ENK (*leucine enkephalin*, leucina encefalina) come standard interno per correggere la fluttuazione strumentale (Trifirò *et al.*, 2016).

Cilindrospermopsina

LC-MS/MS

Per l'analisi LC-MS/MS di CYN viene usato un sistema di cromatografia liquida in tandem con spettrometri di massa, comprendente uno spettrometro di massa a triplo quadrupolo dotato di interfaccia ESI ed una colonna C18. Le seguenti condizioni cromatografiche e di MS sono basate su quelle descritte in Guzmán-Guillén *et al.* (2012) e Hindle e Noot (2014) con modifiche. Condizioni cromatografiche: temperatura della colonna = 30°C ; volume di iniezione = 20 mL; portata = 0,2 mL/min; tempo di esecuzione = 5 minuti; fase mobile: A = 1% metanolo in acqua + 5 mM ammonio acetato e B = 60% metanolo in acqua + 5 mM di acetato di ammonio. Condizioni MS: temperatura del gas = 300°C ; velocità del flusso del gas = 10 mL/min; pressione nebulizzatore = 40 psi; tensione V_{cap} = 4000 v. Le transizioni per l'identificazione di CYN sono i prodotti ionici 416/194 e 416/176. Il limite di rilevamento di CYN è 0,5 $\mu\text{g/mL}$ ed il limite di quantificazione è 80 $\mu\text{g/mL}$.

BMAA e anatoossina-a

Estrazione per analisi strumentale

Vengono utilizzati standard DABA (DL-2,4-diamminobutirrico dicloridrato), anatoossina-a e L-BMAA (β -N-metilammino-L-alanina cloridrato) e AABA (acido DL-2-amminobutirrico). Le cartucce di estrazione sono LP Waters, Oasis-MCX 6cc (150 mg). I reagenti utilizzati nella sintesi AQC (6-aminoquinolil-N-hydrossisuccinimidil-carbamato) includono acetonitrile secco, 6-amminochinolina (AMQ) e Di (N-succinimide)-carbonato (DSC). Le cianotossine vengono estratte dall'acqua utilizzando cartucce di estrazione in fase solida (SPE) Oasis MCX. La colonna MCX viene condizionata utilizzando 5 mL di metanolo, lasciata asciugare per almeno 10 minuti e quindi lavata con 5 mL di acqua reagente. Le tossine estratte vengono eluite usando 6 mL di idrossido di ammonio ammoniacale al 5% (v/v) in metanolo, evaporate sotto azoto, disciolte in acqua per reagenti e derivatizzate usando AQC (Al-Sammak *et al.*, 2014).

I campioni vengono pesati (0,100 g) in una provetta per centrifuga da 15 mL, quindi miscelati con 1 mL di TCA (acido tricloroacetico) 0,1 N agitando su vortex per 1 minuto utilizzando un dismembratore Sonic Fisher Scientific. La sonda viene lavata tra i campioni con 100% di acqua purificata, 50% di metanolo in acqua e 100% di metanolo. La miscela sonicata viene conservata a 4 ° C durante la notte (16 h) per liberare gli aminoacidi legati alle proteine.

La miscela viene quindi agitata su vortex e centrifugata per 10 min a 1300 rpm per separare i solidi dall'estratto acquoso. L'estratto contenente aminoacidi non legati o "liberi", inclusi BMAA e DABA, viene trasferito in una provetta con filtro per microcentrifuga (microfiltro Whatman MWCO) per la rimozione delle proteine sospese e centrifugato per 10 min a 1300 rpm. L'estrazione viene ripetuta aggiungendo 1 mL di 0,1 N TCA al pellet nella provetta da centrifuga originale, agitando su vortex, sonicando, centrifugando e filtrando prima di combinare le porzioni per la successiva derivatizzazione. Le tossine legate vengono estratte nel pellet rimanente trasferendolo e mescolando con 2 mL di 6 N HCl in una provetta da centrifuga di vetro. Le tossine nel materiale solido sono rilasciate tramite idrolisi acida e riscaldate a 110°C durante la notte (16 h).

Dopo l'idrolisi, la sospensione viene filtrata utilizzando un filtro da microcentrifuga ed essiccata sotto vuoto per 2 ore. Dopo l'essiccazione, il filtrato del campione viene ricostituito con 1 mL di acqua da reagenti e derivatizzato con AQC.

HPLC-ESI-MS/MS

Viene utilizzato un sistema HPLC accoppiato con una sorgente ionica ESI e uno spettrometro di massa a triplo quadrupolo. Le prestazioni cromatografiche vengono eseguite utilizzando una colonna C18 da 4,6 × 150 mm con eluizione in scala mobile composta da acqua con NH₄OH 19 mM come eluente A e MeOH /acetonitrile (80:20) come eluente B. Il programma di eluizione binaria è utilizzato ad un flusso di 0,5 mL min⁻¹ come segue, 0-1%; 3 min, 45% eluente B; 7 min, 90% eluente B; 9-15 min, 100% eluente B; 17-27 min, equilibratura con 0% di eluente B; 80 μ L di estratto dal campione vengono iniettati per l'analisi. La sorgente ionica ESI viene azionata con polarità negativa ed i dati vengono acquisiti in modalità di reazione multipla (MRM) consentendo il rilevamento altamente selettivo e sensibile di frammenti selezionati.

La quantificazione viene eseguita utilizzando ENK come standard interno al fine di correggere le fluttuazioni strumentali. Aggiungendo ENK all'inizio della procedura di estrazione, si possono correggere le perdite di analiti durante le fasi di preparazione del campione. Quindi 100 mg del campione omogeneizzato vengono aggiunti a 50 ng di ENK in una provetta di polietilene prima di essere estratti in ultrasuoni con 5 mL di metanolo per 10 minuti a temperatura ambiente. L'estratto viene centrifugato a 3000 rpm per 5 minuti e quindi filtrato in una provetta di polietilene

da 15 mL attraverso un filtro PTFE (Politetrafluoroetilene) da 0,45 μm . Il pellet viene nuovamente estratto con altri 5 mL di metanolo, centrifugato e filtrato nella stessa provetta per riunire i due estratti. Il campione viene quindi diluito 1: 5 con acqua ultrapura in una fiala color ambra mediante campionatore automatico, e analizzato mediante il sistema HPLC-MS / MS.

HPLC/FD (Fluorescence Detection)

Gli aminoacidi e le cianotossine sono separati utilizzando una colonna a fase inversa (colonna C8, 4,6 \times 250 mm) su un controllore di solventi e un autocampionatore. Le concentrazioni di cianotossine vengono quantificate rilevando il tag fluorescente con eccitazione a 250 nm ed emissione a 395 nm in riferimento a una curva standard.

LC-MS/MS

Viene utilizzato uno spettrometro di massa tandem per cromatografia liquida-trappola ionica (LC-MS/MS) per la conferma e l'analisi quantitativa di BMAA, DABA ed anatossina-a. La separazione viene compiuta con un controller del solvente e un campionatore automatico interfacciato con uno spettrometro di massa a trappola ionica dotato di ionizzazione a pressione atmosferica adattata ad una sorgente ESI (LCQ Classic, Thermo Electron, Waltham, MA, USA). Per il controllo dello strumento, l'elaborazione dei dati e l'analisi viene utilizzato il software Xcalibur. Per la separazione viene utilizzata una colonna HPLC C18 (2,1 mm \times 250 mm \times 5 μm). La fase mobile è costituita dal solvente A (formiato di ammonio; 0,5 g / L in acqua) / solvente B (formiato di ammonio; 0,5 g / L in metanolo).

ESPERIMENTI DI DEPURAZIONE

Negli studi citati è stato dimostrato che le cellule cianobatteriche si accumulano sulle piante a foglia dopo l'irrigazione a spruzzo con acqua contenente cianobatteri e le MC vengono rilevate nel sistema radicale delle piante dopo irrigazione con acqua contaminata.

Un lavoro recente di Spoof *et al.* (2020) ha esaminato una serie di esperimenti in cui la lisi dei cianobatteri nell'acqua di lago estratta veniva indotta dall'uso di perossido di idrogeno, una sostanza depurativa tra le più economiche, ed è stato seguito il destino delle MC rilasciate. L'acqua trattata con perossido di idrogeno veniva quindi utilizzata per l'irrigazione a spruzzo di spinaci coltivati e veniva monitorato il possibile accumulo di tossine nelle piante.

L'acqua di lago esaminata conteneva concentrazioni piuttosto basse di MC intracellulare prima del trattamento con perossido di idrogeno (da 0,04 µg /L, luglio, a 2,4 µg /L, settembre 2014). Il perossido di idrogeno a dosi sufficienti è stato in grado di lisare i cianobatteri in modo efficiente, ma le MC rilasciate erano ancora presenti anche dopo l'applicazione della dose più alta di perossido di idrogeno (20 mg/L).

Nessuna traccia di MC è stata rilevata nelle foglie di spinaci analizzate con LC-MS-MRM. Il perossido di idrogeno a dosi di 10 mg/L o superiori ha avuto un effetto dannoso sul fitoplancton e sullo zooplancton in movimento. È stato esplorato l'equilibrio tra un'efficace eliminazione dei cianobatteri e un danno minimo ad altro biota e la dose ottimale di perossido di idrogeno è stata definita come quella che mantiene una concentrazione attiva di 2 mg H₂O₂/L per 5 ore dopo un trattamento (Weenink *et al.* 2015).

Mentre concentrazioni sufficientemente elevate di H₂O₂ uccidono efficacemente i cianobatteri, le concentrazioni sub-letali di H₂O₂ possono avviare rapidamente le difese antiossidanti nei cianobatteri. Tali meccanismi di difesa possono aumentare quantomeno la produzione di MC-LR (Giannuzzi *et al.* 2016).

È stato anche riportato che il legame di MC alle proteine aumenta la resistenza di *Microcystis* sotto stress ossidativo (Zilliges *et al.* 2011). Al fine di evitare una possibile produzione potenziata di MC o la promozione di ceppi produttori di MC, è essenziale che la concentrazione di H₂O₂ attiva superi la soglia dei cianobattericidi.

Appare necessario valutare gli effetti sulle comunità biotiche da parte di queste sostanze, al fine di non creare danni ambientali di maggiore gravità; allo stato attuale non esistono ancora sistemi preferibili alla depurazione mediante filtrazione con carboni attivi.

Nonostante il fatto che il bioaccumulo di MC nelle piante coltivate sia ben documentato, la depurazione dalle MC e il meccanismo coinvolto rimangono poco chiari.

Gli obiettivi dello studio di Cao *et al.*, (2019) erano studiare il bioaccumulo e la depurazione della MC-LR nella lattuga (*Lactuca sativa* L.) e negli spinaci (*Spinacia oleracea* L.), nonché esplorare il ruolo della biosintesi del glutatione (GSH) nella depurazione da MC-LR. Le piante testate sono state irrigate con acqua deionizzata contenente 10 µg/L MC-LR per 12 giorni (in modo da causare bioaccumulo), e successivamente, solo con acqua deionizzata o acqua deionizzata contenente 0,5 mM di butionina sulfoximina (BSO, un inibitore specifico della biosintesi del GSH) per 12 giorni (depurazione).

Dopo il periodo di bioaccumulo, le concentrazioni più elevate di MC-LR riscontrate nella lattuga e negli spinaci sono state rispettivamente di 114,4 e 138,5 µg/kg di peso secco (Dry Weight). I tassi di purificazione di MC-LR in lattuga e spinaci sono stati 9,5 e 8,1 µg/kg DW/giorno, che sono scesi a 3,7 e 4,6 µg/kg DW/giorno nei trattamenti con applicazione di BSO.

Il contenuto di GSH sia nella lattuga che negli spinaci non è stato significativamente influenzato durante la depurazione senza BSO; mentre dopo il trattamento con BSO, il contenuto

di GSH è diminuito significativamente del 36,0% e del 24,7% nella lattuga e negli spinaci a 15 giorni e la diminuzione è rimasta a 18 giorni e 21 giorni nella lattuga.

Inoltre, durante il periodo di bioaccumulo, le attività della glutatione reduttasi (GR) e della glutatione S-transferasi (GST) sono state potenziate in entrambe le piante. I risultati suggeriscono che la biosintesi del GSH svolge un ruolo importante nella depurazione da MC-LR nelle piante testate.

Per quanto riguarda il rischio per la salute umana, la maggior parte dei valori di assunzione giornaliera stimata (EDI) durante il periodo di bioaccumulo ha superato le linee guida dell'assunzione giornaliera tollerabile (TDI). È necessario un numero maggiore di studi sulla possibilità di attenuazione del rischio a seguito di irrigazione con acqua non contaminata, ma appare già chiaro come questa possibilità sembri essere molto variabile da specie a specie.

CONCLUSIONI

Gli studi hanno dimostrato che la fitotossicità delle MC interferisce con il metabolismo e la biomassa delle piante terrestri e acquatiche, causa riduzione delle protein fosfatasi 1 e 2A, stress ossidativo, diminuzione della attività fotosintetica e persino apoptosi. La sensibilità si verifica in semi, piantine e piante mature, in cui la radice è solitamente l'organo più colpito a causa del suo maggiore contatto con le MC.

Pertanto, il danno è generalmente più esteso con un crescente tempo di esposizione e concentrazione della tossina.

C'è un ridotto numero di esperimenti sul campo che esaminino l'irrigazione di colture alimentari in condizioni reali. Alcune ricerche indicano che vari tipi di terreno adsorbono cianotossine, riducendo la biodisponibilità delle tossine per le piante e che alcune specie di batteri del suolo possono biodegradare le cianotossine (Corbel *et al.*, 2014).

La letteratura si concentra principalmente sulla ricerca delle MC e trascura il bioaccumulo di altre cianotossine nelle colture degli alimenti, perché le MC sono generalmente considerate le più importanti tra le cianotossine (Health Canada, 2016).

Nelle ricerche mancano informazioni sulla frequenza e l'intensità delle annaffiature; sui diversi metodi di erogazione, ad esempio irrigazione a spruzzo, a goccia o per aspersione; e anche informazioni sui rischi per i lavoratori agricoli derivanti da questi metodi di somministrazione, ovvero l'inalazione di acqua dall'irrigazione a spruzzo.

C'è un solo studio sulla depurazione (l'escrezione o la scomposizione metabolica delle tossine) e questo ha esaminato solo due specie, lattuga e rucola (Cordeiro-Araújo *et al.*, 2016). Data la variabilità nei risultati presentati sopra, una gamma più ampia di colture alimentari, tra cui frutta e bacche, dovrebbero essere esaminati, preferibilmente con un focus sulle porzioni commestibili. Sarebbe utile anche lavorare per studiare la possibile biotrasformazione delle cianotossine.

Esporre le colture coltivate ad acqua contaminata da MC è una questione che va oltre i meri danni economici. La possibilità di contaminazione degli alimenti è, di gran lunga, una questione di salute pubblica e richiede, quindi, un severo monitoraggio di questo percorso di esposizione da parte dei governi e degli organi di controllo territoriale.

BIBLIOGRAFIA

- Abe T, Lawson T, Weyers JDB, Codd GA. Microcystin-LR inhibits photosynthesis of *Phaseolus vulgaris* primary leaves: implications for current spray irrigation practice. *New Phytol* 1996; 133:651-8.
- Ai Y, Lee S, Lee J. Drinking water treatment residuals from cyanobacteria bloom-affected areas: Investigation of potential impact on agricultural land application. *Sci Total Environ* 2020;706:135756.
- Alkio M, Tabuchi TM, Wang X, Colón-Carmona A. Stress responses to polycyclic aromatic hydrocarbons in *Arabidopsis* include growth inhibition and hypersensitive response-like symptoms. *J Exp Bot* 2005;56(421):2983-94.
- Al-Sammak MA, Hoagland KD, Cassada D, Snow DD. Co-occurrence of the cyanotoxins BMAA, DABA and anatoxin-a in Nebraska reservoirs, fish, and aquatic plants. *Toxins* 2014;6:488-508.
- Azevedo CC, Azevedo J, Osrio H, Vasconcelos V, Campos A. Early physiological and biochemical responses of rice seedlings to low concentration of microcystin-LR. *Ecotoxicology* 2014;23:107-21.
- Baars A, Bakker M, Baumann R, Boon P, Freijer J, Hoogenboom L, Hoogerbrugge R, Van Klaveren J, Liem A, Traag W. Dioxins, dioxin-like PCBs and non-dioxin-like PCBs in foodstuffs: occurrence and dietary intake in The Netherlands. *Toxicol Lett* 2004;151(1):51-61.
- Babica P, Blaha L, Marsalek B. Exploring the natural role of microcystins – a review of effects on photoautotrophic organisms. *Journal of Phycology* 2006;42(1):9-20.
- Barbaro E, Zangrando R, Barbante C, Gambaro A. Fast and sensitive method for determination of domoic acid in mussel tissue. *Sci World J* 2016;2016:6.
- Beyer D, Surányi G, Vasas G, Roszik J, Erdodi F, M-Hamvas M, Bácsi I, Bátori R, Serfozo Z, Szigeti ZM, et al. Cylindrospermopsin induces alterations of root histology and microtubule organization in common reed (*Phragmites australis*) plantlets cultured in vitro. *Toxicon* 2009;54:440-9.
- Bibo L, Yan G, Bangding X, Jiantong L, Yongding L. A laboratory study on risk assessment of microcystin-RR in cropland. *Journal of Environmental Management* 2008;86(3):566-74.
- Bihn EA, Smart CD, Hoepfing CA, Worobo RW. Use of surface water in the production of fresh fruits and vegetables: A survey of fresh produce growers and their water management practices. *Food Prot Trends* 2013;33:307-14.
- Bittencourt-Oliveira MC, Chia MA, Camargo-Santos D, Dias CTS. The effect of saxitoxin and non-saxitoxin extracts of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanobacteria) on cyanobacteria and green microalgae. *J Appl Phycol* 2016;28:241-50.
- Bittencourt-Oliveira MC, Chia MA, Oliveira HSB, Cordeiro-Araújo MK, Molica RJR, Dias CTS. Allelopathic interactions between microcystin-producing and non-microcystin-producing cyanobacteria and green microalgae: implications for microcystins production. *J Appl Phycol* 2015;27:275-84.
- Bittencourt-Oliveira MC, Cordeiro-Araújo MK, Chia MA, Arruda-Neto JD, De Oliveira ET, Dos Santos F. Lettuce irrigated with contaminated water: Photosynthetic effects, antioxidative response and bioaccumulation of microcystin congeners. *Ecotoxicol Environ Saf* 2016;128:83-90.
- Bittencourt-Oliveira MC, Hereman TC, Cordeiro-Araújo MK, Macedo-Silva I, Dias CT, Sasaki FFC, Moura AN. Phytotoxicity associated to microcystins: a review. *Braz J Biol* 2014;74(4):753-60.
- Bittencourt-Oliveira MC, Piccin-Santos V, Kujbida P, Moura AN. Cylindrospermopsin in water supply reservoirs in Brazil determined by immunochemical and molecular methods. *J Water Res* 2011;Prot.3:349-55.

- Bittencourt-Oliveira MC, Piccin-Santos V, Moura AN, Aragão-Tavares, NKC, Cordeiro-Araújo MK. Cyanobacteria, microcystins and cylindrospermopsin in public drinking supply reservoirs of Brazil. *An Acad Bras Ciênc* 2014;86:297-309.
- Buratti FM, Manganelli M, Vichi S, Stefanelli, M, Scardala S, Testai, E, Funari, E. Cyanotoxins: producing organisms, occurrence, toxicity, mechanism of action and human health toxicological risk evaluation. *Arch Toxicol* 2017;91:1049-130.
- Cao Q, Liu W, Jiang W, Shu X, Xie L. Glutathione biosynthesis plays an important role in microcystin-LR depuration in lettuce and spinach. *Environ Pollut* 2019;253:599-605.
- Cerasino L, Salmaso N. Co-occurrence of anatoxin-a and microcystins in Lake Garda and other deep subalpine lakes. *Adv Oceanogr Limnol* 2020;11(1).
- Chen J, Dai J, Zhang H, Wang C, Zhou G, Han Z, Liu Z. Bioaccumulation of microcystin and its oxidative stress in the apple (*Malus pumila*). *Ecotoxicology* (London, England) 2010;4:796-803.
- Chen J, Han FX, Wang F, Zhang H, Shi Z. Accumulation and phytotoxicity of microcystin-LR in rice (*Oryza sativa*). *Ecotoxicology and Environmental Safety* 2012;76(2):193-9.
- Chen J, Song L, Dai J, Gan N, Liu Z. Effects of microcystins on the growth and the activity of superoxide dismutase and peroxidase of rape (*Brassica napus L.*) and rice (*Oryza sativa L.*). *Toxicon* 2004;43(4):393-400.
- Chin-Chan M, Navarro-Yepes J, Quintanilla-Vega B. Environmental pollutants as risk factors for neurodegenerative disorders: Alzheimer and Parkinson diseases. *Frontiers in Cellular Neuroscience* 2015(9);124.
- Chiu AS, Gehringer MM, Welch JH, Neilan, BA. Does alpha-amino-beta-methylaminopropionic acid (BMAA) play a role in neurodegeneration? *International journal of environmental research and public health* 8,2011:3728-46.
- Christophoridis C, Zervou SK, Manolidi K, Katsiapi M, Moustaka-Gouni T, Kaloudis, Triantis TM, Hiskia A. Occurrence and diversity of cyanotoxins in Greek lakes. *Sci Rep* 2018;8:1-22.
- Codd GA, Metcalf JS, Beattie KA. Retention of *Microcystis aeruginosa* and microcystin by salad lettuce (*Lactuca sativa*) after spray irrigation with water containing cyanobacteria. *Toxicon* 1999;37(8):1181-5.
- Contardo-Jara V, Schwanemann T, Esterhuizen-Londt MPflugmacher S. Protein association of β -N-methylamino-L-alanine in *Triticum aestivum* via irrigation. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess* 2018;35:731-9.
- Contardo-Jara V, Schwanemann T, Pflugmacher S. Uptake of a cyanotoxin, β -N-methylamino-L-alanine, by wheat (*Triticum aestivum*). *Ecotoxicol Environ Saf* 2014;104:127-31.
- Corbel S, Bouaïcha N, Mougou C. Dynamics of the toxic cyanobacterial microcystin-leucine-arginine peptide in agricultural soil. *Environ Chem Lett* 2014;12(4):535-41.
- Corbel S, Mougou C, Bouaich N. Cyanobacterial toxins: Modes of actions, fate in aquatic and soil ecosystems, phytotoxicity and bioaccumulation in agricultural crops. *Chemosphere* 2014;96:1-15.
- Cordeiro-Araújo MK, Chia MA, Arruda-Neto JD, Tornisielo VL, Vilca FZ, Bittencourt-Oliveira Mdo, C. Microcystin-LR bioaccumulation and depuration kinetics in lettuce and arugula: Human health risk assessment. *Sci Tot Environ* 2016;566-567:1379-86.
- Cordeiro-Araújo MK, Chia MA, do Carmo Bittencourt-Oliveira M. Potential human health risk assessment of cylindrospermopsin accumulation and depuration in lettuce and arugula. *Harmful Algae* 2017;68:217-23.
- Cordeiro-Araújo MK, Chia MA, Hereman TC, Sasaki FF, Bittencourt-Oliveira MC. Selective membrane permeability and peroxidase activity response of lettuce and arugula irrigated with cyanobacterial-contaminated water. *Environ Earth Sci* 2015;74:1547-53.

- 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;100:13.380-3.
- Crush JR, Briggs LR, Sprosen JM, Nichols SN. Effect of irrigation with lake water containing microcystins on microcystin content and growth of ryegrass, clover, rape, and lettuce. *Environ Toxicol* 2008;23(2):246-52.
- De Pace R, Vita V, Bucci M S, Gallo P, Bruno M. Microcystin contamination in sea mussel farms from the Italian Southern Adriatic Coast following cyanobacterial blooms in an artificial reservoir. *Journal of Ecosystems*, 2014 ID 374027, 11 pages <http://dx.doi.org/10.1155/2014/374027>.
- Díez-Quijada L, Guzmán-Guillén R, Ortega AP, Llana-Ruíz-Cabello M, Campos A, Vasconcelos V, Jos Á, Cameán AM. New method for simultaneous determination of microcystins and cylindrospermopsin in vegetable matrices by SPE-UPLC-MS/MS. *Toxins* 2018;10:406.
- El Khalloufi F, El Ghazali I, Saqrane S, Oufdou K, Vasconcelos V, Oudra B. Phytotoxic effects of a natural bloom extract containing microcystins on *Lycopersicon esculentum*. *Ecotoxicol Environ Saf* 2012;79:199-205.
- El Khalloufi F, Oufdou K, Lahrouni M, El Ghazali I, Saqrane S, Vasconcelos V, Oudra B. Allelopathic effects of cyanobacteria extracts containing microcystins on *Medicago sativa*-*Rhizobia symbiosis*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 2011;74(3):431-8.
- Esterhuizen-Londt M, Pflugmacher S, Vegetables cultivated with exposure to pure and naturally occurring β -N-methylamino-L-alanine (BMAA) via irrigation. *Environmental Research* 2019;169:357-61.
- Facey JA, Apte SC, Mitrovic SM. A Review of the effect of trace metals on freshwater cyanobacterial growth and toxin production. *Toxins* 2019;11:643.
- Ferranti P, Nasi A, Bruno M, Basile A, Serpe L, Gallo P. A peptidomic approach for monitoring and characterising peptide cyanotoxins produced in Italian lakes by matrix-assisted laser desorption/ionisation and quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2011;25:1173-83.
- Freitas M, Azevedo J, Pinto E, Neves J, Campos A, Vasconcelos V. Effects of microcystin-LR, cylindrospermopsin and a microcystin-LR/cylindrospermopsin mixture on growth, oxidative stress and mineral content in lettuce plants (*Lactuca sativa L.*). *Ecotoxicol Environ Saf* 2015;116:59-67.
- Freitas M, Campos A, Azevedo J, Barreiro A, Planchon S, Renaut J, Vasconcelos V. Lettuce (*Lactuca sativa L.*) leaf-proteome profiles after exposure to cylindrospermopsin and a microcystin-LR/cylindrospermopsin mixture: A concentration-dependent response. *Phytochemistry* 2015;110:91-103.
- Froschio SM, Humpage AR, Burcham PC, Falconer IR. Cylindrospermopsin-induced protein synthesis inhibition and its dissociation from acute toxicity in mouse hepatocytes. *Environ Toxicol* 2003;18:243-51.
- Gambaro A, Barbaro E, Zangrando R, Barbante C. Simultaneous quantification of microcystins and nodularin in aerosol samples using high-performance liquid chromatography/negative electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2012;26(12):1497-506.
- Gehringer MM, Kewada V, Coates N, Downing TG. The use of *Lepidium sativum* in a plant bioassay system for the detection of microcystin-LR. *Toxicon* 2003;7:871-6.
- Giannuzzi L, Krock B, Minaglia MC, Rosso L, Houghton C, Sedan D, Malanga G, Espinosa M, Andrinolo D, Hernando M. Growth, toxin production, active oxygen species and catalase activity of *Microcystis aeruginosa* (Cyanophyceae) exposed to temperature stress. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 2016;189:22-30.
- Guo Y, Liu M, Liu L, Liu X, Chen H, Yang J. The antibiotic resistome of free-living and particle-attached bacteria under a reservoir cyanobacterial bloom. *Environ Int* 2018;11(7):107-15.

- Gutierrez-Praena D, Campos A, Azevedo J, Neves J, Freitas M, Guzman-Guillen R, Cameán AM, Renaut J, Vasconcelos V. Exposure of *Lycopersicon esculentum* to microcystin-LR: Effects in the leaf proteome and toxin translocation from water to leaves and fruits. *Toxins* 2014;6(6):1837-54.
- Guzmán-Guillén R, Campos A, Machado J, Freitas M, Azevedo J, Pinto E, Almeida A, Cameán AM, Vasconcelos V. Effects of *Chrysosporium (Aphanizomenon) ovalisporum* extracts containing cylindrospermopsin on growth, photosynthetic capacity, and mineral content of carrots (*Daucus carota*). *Ecotoxicology* 2017;26:22-31.
- Harada K, Tsuji K, Watanabe MF, Kondo F. Stability of microcystins from cyanobacteria—III. Effect of pH and temperature. *Phycologia* 1996;35(6S).
- Health Canada. *Cyanobacterial toxins in drinking water – Document for public consultation*. Ottawa, ON: Health Canada; 2016. Disponibile all'indirizzo: <https://www.canada.ca/en/health-canada/programs/cyanobacterial-toxins-drinking-water/cyanobacterial-toxins-drinking-water.html>; ultima consultazione 26/11/2021.
- Hereman TC, Bittencourt-Oliveira MC. Bioaccumulation of microcystins in lettuce. *Journal of Phycology* 2012;48(6):1535-7.
- Hindle R, Noot D. LC/MS/MS Analysis of cylindrospermopsin and anatoxin-a in drinking water using US EPA Method 545. Application note. Disponibile all'indirizzo: <https://www.agilent.com/cs/Library/applications/5991-4725EN.pdf>; ultima consultazione 26/11/2021.
- IARC. *Cyanobacterial peptide toxins*. Lyon: International Agency for Research on Cancer; 2010. (IARC Monographs 94).
- ISTAT. *Le statistiche dell'ISTAT sull'acqua - anni 2015-2018*. Roma: Istituto Nazionale di statistica; 2019. Disponibile all'indirizzo: https://www.istat.it/it/files/2019/03/Testo-integrale_Report_Acqua_2019.pdf; ultima consultazione 26/11/2021.
- Järvenpää S, Lundberg-Niinisto C, Spoof L, Sjøvall O, Tyystjärv E, Meriluoto J. Effects of microcystins on broccoli and mustard, and analysis of accumulated toxin by liquid chromatography-mass spectrometry. *Toxicon* 2007;49(6):865-74.
- JECFA. *Safety Evaluation of Certain Food Additives and Contaminants. Polychlorinated dibenzodioxins, polychlorinated dibenzofurans, and coplanar polychlorinated biphenyls. Report of the 57th Meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives and Contaminants*. Geneva: World Health Organization; 2002. (WHO Food Additives Series 48). 451-664. Disponibile all'indirizzo: <https://inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v48je20.htm>; ultima consultazione 26/11/2021.
- JECFA. *Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. Seventy-third meeting Geneva, 8–17 June 2010*. Food and Agriculture Organization/World Health Organization; 2010. (JECFA/73/SC). Disponibile all'indirizzo <http://www.who.int/foodsafety/publications/chem/summary73.pdf>; ultima consultazione 26/11/2021
- Jia Y, Li H, Qu Y, Chen W, Song L. Phytotoxicity, bioaccumulation and potential risks of plant irrigations using cyanobloom-loading freshwater. *Science of the Total Environment* 2018;624:s 704-12.
- Jones S, Shortt R. Improving on-farm safety through good irrigation practices. 2010 Disponibile all'indirizzo: <http://www.omafra.gov.on.ca/english/crops/facts/10-037.htm>; ultima consultazione 26/11/2021.
- Karamyan VT, Speth RC. Animal models of BMAA neurotoxicity: A critical review. *Life Sci.* 2008;82:233-46.
- Kim M, Lee J, Yang D, Park HY, Park W. Seasonal dynamics of the bacterial communities associated with cyanobacterial blooms in the Han River. *Environ Pollut* 2020; 266 (2), 115198.
- Kittler K, Schreiner M, Krumbein A, Manzei S, Koch M, Rohn S, Maul R. Uptake of the cyanobacterial toxin cylindrospermopsin in Brassica vegetables. *Food Chemistry* 2012;133(3):875-9.

- Kos P, Gorzò G, Surani G, Borbely G. Simple and efficient method for isolation and measurement of cyanobacterial hepatotoxins by plant tests (*Sinapis alba* L.). *Analytical Biochemistry* 1995;225(1):49-53.
- Kozdeba M, Borowczyk J, Zimoląg E, Wasylewski M, Dziga D, Madeja Z, Drukala J. Microcystin-LR affects properties of human epidermal skin cells crucial for regenerative processes. *Toxicol* 2014;80:38-46.
- Kurki-Helasma K, Meriluoto J. Microcystin uptake inhibits growth and protein phosphatase activity in mustard (*Sinapis alba* L.) seedlings. *Toxicol* 1998;36(12):1921-6.
- Lee S, Jiang X, Manubolu M, Riedl K, Ludsin SA, Martin JF, Lee J. Fresh produce and their soils accumulate cyanotoxins from irrigation water: implications for public health and food security. *Food Research International* 2017;102:234-45.
- Leflaive J, Ten-Hage L. Algal and cyanobacterial secondary metabolites in freshwaters: a comparison of allelopathic compounds and toxins. *Freshwater Biology* 2007;52(2):199-214.
- Levizou E, Papadimitriou T, Papavasileiou E, Papadimitriou E, Konstantinos A, Kormas KA. Root vegetables bioaccumulate microcystins-LR in a developmental stage-dependent manner under realistic exposure scenario—the case of carrot and radish. *Agricultural Water Management* 2020;240:106274.
- Levizou E, Statoris G, Papadimitriou T, Laspidou CS, Kormas KA. Lettuce facing microcystins-rich irrigation water at different developmental stages: effects on plant performance and microcystins bioaccumulation. *Ecotoxicol Environ Saf* 2017;143:193-200.
- Liang C, Wang W. Response and recovery of rice (*Oryza sativa*) seedlings to irrigation with microcystin-contaminated water. *Environ Earth Sci* 2015;73(8):4573-80.
- Llana-Ruiz-Cabello M, Jos A, Cameán A, Oliveira F, Barreiro A, Machado J, Azevedo J, Pinto E, Almeida A, Campos A, Vasconcelos V, Freitas M. Analysis of the use of cylindrospermopsin and/or microcystin-contaminated water in the growth, mineral content, and contamination of *Spinacia oleracea* and *Lactuca sativa*. *Toxins* 2019;11(11):624.
- Machado J, Azevedo J, Freitas M, Pinto E, Almeida A, Vasconcelos V, Campos A. Analysis of the use of microcystin contaminated water in the growth and nutritional quality of the root-vegetable, *Daucus carota*. *Environ Sci Pollut Res Int* 2017a;24(1):752-64.
- Machado J, Campos A, Vasconcelos V, Freitas M. Effects of microcystin-LR and cylindrospermopsin on plant-soil systems: a review of their relevance for agricultural plant quality and public health. *Environ Res* 2017b;153:191-204.
- Mackintosh C, Beattie KA, Klumpp S, Cohen P, Codd GA. Cyanobacterial microcystin-LR is a potent and specific inhibitor of protein phosphatases 1 and 2A from both mammals and higher plants. *FEBS Letters* 1990;264(2):187-92.
- Mathè C, M-Hamvas M, Vasas G, Suranyi G, Bacsi I, Beyer D, Toth S, Timar M, Borbely G. Microcystin-LR, a cyanobacterial toxin, induces growth inhibition and histological alterations in common reed (*Phragmites australis*) plants regenerated from embryogenic calli. *New Phytologist* 2007;176(4):824-35.
- Mathè C, Beyer D, Erdodi F, Serfozo Z, Szekvolgyi L, Vasas G, M-Hamvas M, Jambrik K, Gonda S, Kiss A, Szigeti ZM, Suranyi G. Microcystin-LR induces abnormal root development by altering microtubule organization in tissue-cultured common reed (*Phragmites australis*) plantlets. *Aquatic Toxicology* 2009;92(3):122-30.
- Máthé C, Vasas G. Microcystin-LR and cylindrospermopsin induced alterations in chromatin organization of plant cells. *Mar Drugs* 2013;11:3689-717.
- Mathè C, M-Hamvas M, Garda T, Beyer D, Vasas G. Cellular effects of cylindrospermopsin (cyanobacterial alkaloid toxin) and its potential medical consequences. *Curr Med Chem* 2017;24:91-109.

- Mc Elhiney J, Lawton LA, Leifert C. Investigations into the inhibitory effects of microcystins on plant growth, and the toxicity of plant tissues following exposure. *Toxicon* 2001;39(9):1411-20.
- Metcalf J, Barakate A, Codd GA. Inhibition of plant protein synthesis by cyanobacterial hepatotoxin cylindrospermopsin. *FEMS Microbiol Lett* 2004;235:125-9.
- M-Hamvas M, Mathè C, Molnar E, Vasas G, Grigorszky I, Borbely G. Microcystin-LR alters the growth, anthocyanin content and single-stranded DNase enzyme activities in *Sinapis alba L* seedlings. *Aquatic Toxicology*, 2003;62(1):1-9.
- M-Hamvas M, Ajtay K, Beyer D, Jámbrik K, Vasas G, Surányi G, Máthé C. Cylindrospermopsin induces biochemical changes leading to programmed cell death in plants. *Apoptosis* 2017;22:254-64.
- Miller A, Russell C. Food crops irrigated with cyanobacteria contaminated water: an emerging public health issue in Canada. *Environmental Health Review* 2017;60(3):58-63.
- Mitrovic SM, Allis O, Furey A, James KJ. Bioaccumulation and harmful effects of microcystin-LR in the aquatic plants *Lemna minor* and *Wolffia arrhiza* and the filamentous alga *Chladophora fracta*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 2005;61(3):345-52.
- Mohamed ZA, Al Shehri AM. Microcystins in groundwater wells and their accumulation in vegetable plants irrigated with contaminated waters in Saudi Arabia. *J Hazard Mater* 2009;172(1):310-5.
- Murch SJ, Cox PA, Banack SA. A mechanism for slow release of biomagnified cyanobacterial neurotoxins and neurodegenerative disease in Guam. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101:12228-31.
- Nery J, Nery G, Medeiros S. Microcystin bioaccumulation in cultures irrigated with eutrophized waters in Brazilian semiarid. *World Journal of Pharmaceutical Sciences* 2020;6:5-9.
- Niyonzima FN. *Bioaccumulation and ecotoxicology of β -methylamino-L-alanine (BMAA) in model crop plants*. [Master thesis]. Port Elizabeth, South Africa: Nelson Mandela Metropolitan University; 2010.
- Painter JA, Hoekstra RM, Ayers T, Tauxe RV, Braden CR, Angulo FJ, Griffin PM. Attribution of foodborne illnesses, hospitalizations, and deaths to food commodities by using outbreak data, United States, 1998–2008. *Emerg Infect Dis* 2013;19(3):407-15.
- Papadimitriou Th, Katsiapi M, Kormas KAr, Moustaka-Gouni M, Kagalou I. Artificially-born “killer” lake: Phytoplankton based water quality and microcystin affected fish in a reconstructed lake. *Science of the Total Environment* 2013; 452/453:116-124.
- Pereira AL, Azevedo J, Vasconcelos V. Assessment of uptake and phytotoxicity of cyanobacterial extracts containing microcystins or cylindrospermopsin on parsley (*Petroselinum crispum L.*) and coriander (*Coriandrum sativum L.*). *Environ Sci Pollut Res* 2017;24:1999-2009.
- Pereira S, Saker ML, Vale M, Vasconcelos VM. Comparison of sensitivity of grasses (*Lolium perenne L.* and *Festuca rubra L.*) and lettuce (*Lactuca sativa L.*) exposed to water contaminated with microcystins. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 2009;83(1):81-4.
- Peuthert A, Chakrabarti S, Pflugmacher S. Uptake of microcystins-LR and -LF (cyanobacterial toxins) in seedlings of several important agricultural plant species and the correlation with cellular damage (lipid peroxidation). *Environmental Toxicology* 2007;22(4):436-42.
- Peuthert A, Lawton L, Pflugmacher S. *In vivo* influence of cyanobacterial toxins on enzyme activity and gene expression of protein phosphatases in Alfalfa (*Medicago sativa*). *Toxicon* 2008;52(1):84-90.
- Peuthert A, Pflugmacher S. Influence of the cyanotoxin microcystin-LR on tocopherol in Alfalfa seedlings (*Medicago sativa*). *Toxicon* 2010;56:411-7.
- Peuthert, A, Kun, Baik S, Pflugmacher S. Transfer of cyanobacteria toxins into edible plants via irrigation with lake water - A Chinese case study. *Aperito Journal of Aquatic and Marine Ecosystems* 2015:1-10.
- Pflugmacher S, Aulhorn M, Grimm B. Influence of a cyanobacterial crude extract containing microcystin-LR on the physiology and antioxidative defense systems of different spinach variants. *New Phytol* 2007;175:482-9.

- Pflugmacher S, Hofmann J, Hübner B. Effects on growth and physiological parameters in wheat (*Triticum aestivum* L.) grown in soil and irrigated with cyanobacterial toxin contaminated water. *Environ Toxicol Chem* 2007;26:2710-16.
- Pflugmacher S, Jung K, Lundvall L, Neumann S, Peuthert A. Effects of cyanobacterial toxins and cyanobacterial cell-free crude extract on germination of alfalfa (*Medicago sativa*) and induction of oxidative stress. *Environ Toxicol Chem* 2006;25:2381-7.
- Pflugmacher S, Wiegand C, Beattie KA, Krause E, Steinberg CEW, Codd G. Uptake, effects and metabolism of cyanobacterial toxins in the emergent reed plant *Phragmites australis* (Cav.) Trin Ex. Steud. *Environ Toxicol Chem* 2001;20:846-52.
- Pflugmacher S, Wiegand C, Oberemm A, Beattie KA, Krause E, Codd GA, Steinberg CEW. Identification of an enzymatically formed glutathione conjugate of the cyanobacterial hepatotoxin microcystin-LR: the first step of detoxication. *Biochim Biophys Acta* 1998;1425:527-33.
- Pflugmacher S. Possible allelopathic effects of cyanotoxins, with reference to microcystin-LR, in aquatic ecosystems. *Environmental Toxicology* 2002;17(4):407-13.
- Pflugmacher S. Promotion of oxidative stress in the aquatic macrophyte *Ceratophyllum demersum* during biotransformation of the cyanobacterial toxin microcystin-LR. *Aquatic Toxicology* 2004;70(3):169-78.
- Pichardo S, Cameán AM, Jos A. In vitro toxicological assessment of cylindrospermopsin: A review. *Toxins* 2017;9:402.
- Prieto A, Campos A, Cameán A, Vasconcelos V. Effects on growth and oxidative stress status of rice plants (*Oryza sativa*) exposed to two extracts of toxin-producing cyanobacteria (*Aphanizomenon ovalisporum* and *Microcystis aeruginosa*). *Ecotoxicol Environ Saf* 2011;74:1973-80.
- Puerto M, Prieto AI, Maisanaba S, Gutiérrez-Praena D, Mellado-García P, Jos Á, Cameán AM. Mutagenic and genotoxic potential of pure Cylindrospermopsin by a battery of in vitro tests. *Food Chem Toxicol* 2018;121:413-22.
- Romero-Oliva CS, Contardo-Jara V, Pflugmacher S. Antioxidative response of the three macrophytes *Ceratophyllum demersum*, *Egeria densa*, and *Hydrilla verticillata* to a time dependent exposure of cell-free crude extracts containing three microcystins from cyanobacterial blooms of Lake Amatitlán, Guatemala. *Aquat Toxicol* 2015;163:130-9.
- Roy-Lachapelle A, Sollic M, Sauvé S, Gagnon C. A Data-independent methodology for the structural characterization of microcystins and anabaenopeptins leading to the identification of four new congeners. *Toxins* 2019;11(11):619.
- Sabart M, Crenn K, Perrière F, Abila A, Lereboure M, Colombet J, Jousse C, Latour D. Co-occurrence of microcystin and anatoxin-a in the freshwater lake Aydat (France): Analytical and molecular approaches during a three-year survey. *Harmful Algae* 2015;48:12-20.
- Sadler T, Von Elert E. Physiological interaction of Daphnia and Microcystis with regard to cyanobacterial secondary metabolites. *Aquatic Toxicology* 2014;156:96-105.
- Saito K, Sei Y, Miki S, Yamaguchi K. Detection of microcystin-metal complexes by using cryospray ionization-Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry. *Toxicon* 2008;51;8:1496-8.
- Saqrane S, El Ghazali I, Oudra B, Bouarab L, Vasconcelos V. Effects of cyanobacteria producing microcystins on seed germination and seedling growth of several agricultural plants. *Journal of Environmental Science and Health. Part. B, Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes*, 2008;43(5):443-51.
- Saqrane S, Elghazali I, Ouahid Y, ElHassni M, ElHadrami I, Bouarab L, Del Campo FF, Oudra B, Vasconcelos V. Phytotoxic effects of cyanobacteria extract on the aquatic plant *Lemna gibba*: Microcystin accumulation, detoxication and oxidative stress induction. *Aquat Toxicol* 2007;83:284-94.

- Saqrane S, Ouahid Y, Ghazali Y, Oudra B, Bouarab L, Campo FF. Physiological changes in *Triticum durum*, *Zea mays*, *Pisum sativum* and *Lens esculenta* cultivars, caused by irrigation with water contaminated with microcystins: A laboratory experimental approach. *Toxicon* 2009;53:786-96.
- Siegl G, Mackintosh C, Stitt M. Sucrose-phosphate synthase is dephosphorylated by protein phosphatase 2A in spinach leaves. Evidence from the effects of okadaic acid and microcystin. *FEBS Letters* 1990;270(1-2):198-202.
- Singh S, Rai PK, Chau R, Ravi AK, Neilan BA, Asthana RK. Temporal variations in microcystin producing cell sand microcystin concentrations in two freshwater ponds. *Water Res.* 2015;69:131-42.
- Sivapalasingam S, Friedman C, Cohen L, Tauxe R. Fresh produce: A growing cause of outbreaks of foodborne illness in the United States, 1973 through 1997. *J Food Protect* 2004;67(10):2342-53.
- Spoof L, Jaakkola S, Vazić T. et al. Elimination of cyanobacteria and microcystins in irrigation water—effects of hydrogen peroxide treatment. *Environ Sci Pollut Res* 2020;27:8638-52.
- Štraser A, Filipič M, Žegura B. Genotoxic effects of the cyanobacterial hepatotoxin cylindrospermopsin in the HepG2 cell line. *Arch Toxicol* 2011;85:1617-26.
- Stuven J, Pflugmacher S. Antioxidative stress response of *Lepidium sativum* due to exposure to cyanobacterial secondary metabolites. *Toxicon* 2007(50):1:85-93.
- Suk WA, Olden K, Yang RS. Chemical mixtures research: significance and future perspectives. *Environ Health Perspect* 2002(6):891.
- Svircev Z, Drobac D, Tokodi N, Mijovic B, Codd GA, Meriluoto J. Toxicology of microcystins with reference to cases of human intoxications and epidemiological investigations of exposures to cyanobacteria and cyanotoxins. *Arch Toxicol* 2017;91(2):621-50.
- Svirčev Z, Lalić D, Savić GB, Tokodi N, Backović DD, Chen L, Meriluoto J, Codd GA. Global geographical and historical overview of cyanotoxin distribution and cyanobacterial poisonings. *Arch Toxicol* 2019;93:2429-81.
- Trifirò G, Barbaro E, Gambaro A, Vita V, Clausi M, Franchino C, Palumbo M, Floridi F, Pace R. Quantitative determination by screening ELISA and HPLC-MS/MS of microcystins LR, LY, LA, YR, RR, LF, LW, and nodularin in the water of Occhito lake and crops. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 2016;408:7699-708.
- Tsuji K, Watanuki T, Kondo F, Watanabe MF, Suzuki S, Nakazawa H. Stability of microcystins from cyanobacteria-II. Effect of UV light on decomposition and isomerization. *Toxicon* 1995;33(12):1619-31.
- US FDA. *Standards for the growing, harvesting, packing, and holding of produce for human consumption*. Silver Spring, MD: US Food and Drug Administration; 2017. Disponibile all'indirizzo: <https://www.fda.gov/food/guidanceregulation/fsma/ucm334114.htm>; ultima consultazione 26/11/2021.
- Vasas G, Gáspár A, Surányi G, Batta G, Gyémánt G, M-Hamvas M, Máthé C, Grigorszky I, Molnár E, Borbély G. Capillary electrophoretic assay and purification of cylindrospermopsin, a cyanobacterial toxin from *Aphanizomenon ovalisporum*, by plant test (*Blue-Green Sinapis* Test). *Anal Biochem* 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.
- Wang Z, Xiao B, Song L, Wu X, Zhang J, Wang C. Effects of microcystin-LR, linear alkylbenzene sulfonate and their mixture on lettuce (*Lactuca sativa* L.) seeds and seedlings. *Ecotoxicology* 2011;20(4):803-14.
- Weenink EFJ, Luimstra VM, Schuurmans JM, Van Herk MJ, Visser PM, Matthijs HCP. Combatting cyanobacteria with hydrogen peroxide: a laboratory study on the consequences for phytoplankton community and diversity. *Front Microbiol* (2015);6:714.

- WHO. *Cyanobacterial toxins: microcystin-LR guidelines for drinking-water quality*. Geneva: World Health Organization; 1998.
- WHO. *Cyanobacterial toxins: microcystin-LR. Guidelines for drinking-water quality*. Geneva World Health Organization; 2011.
- Xiang L, Li YW, Liu BL, Zhao HM, Li H, Cai QY, Mo CH, Wong MH, Li QX. High ecological and human health risks from microcystins in vegetable fields in southern China. *Environ Int* 2019;133(Pt A):105142.
- Xiang L, Li YW, Wang ZR, Liu BL, Zhao HM, Li H, Cai QY, Mo CH, Li QX. Bioaccumulation and phytotoxicity and human health risk from microcystin-LR under various treatments: a pot study. *Toxins* 2020;12(8):523.
- Xiao FG, Zhao XL, Tang J. *et al.* Necessity of screening water chestnuts for microcystins after cyanobacterial blooms break out. *Arch Environ Contam Toxicol* 2009;57:256-63.
- Xue Y, Li Y, Yi N, Li H. Investigations into the effects of microcystin-LR on the growth and antioxidant enzymes in Chinese cabbage and rape. *Bioinformatics and Biomedical Engineering* 2010;1:1-5.
- Yamasaki S. Probable effects of algal bloom on the growth of *Phragmites australis* (Cav.) Trin. *Ex Steud. Journal of Plant Research* 1993;106(2):113-20.
- Yin L, Huang J, Huang W, Li D, Liu Y. Responses of antioxidant system in *Arabidopsis thaliana* suspension cells to the toxicity of microcystin-RR. *Toxicon* 2005b;46(8):859-64.
- Yin L, Huang J, Li D, Liu Y. Microcystin-RR uptake and its effects on the growth of submerged macrophyte *Vallisneria spiralis* (L.) L. *Environmental Toxicology* 2005a;20(3):308-13.
- Yuehan A, Seungjun L, Jiyoun L. Drinking water treatment residuals from Cyanobacteria bloom-affected areas: investigation of potential impact on agricultural land application. *Science Total Env* 2020;706:135756.
- Žegura B, Gajski G, Štraser A, Garaj-Vrhovac V, Filipič M. Microcystin-LR induced DNA damage in human peripheral blood lymphocytes. *Mutation Research* 2011;726(2):116-22.
- Žegura B, Štraser A, Filipič M. Genotoxicity and potential carcinogenicity of cyanobacterial toxins—A review. *Mutat Res Rev* 2011;727:16-41.
- Zhang Y, Whalen JK, Sauvé S. Phytotoxicity and bioconcentration of microcystins in agricultural plants: Meta-analysis and risk assessment. *Environ Pollut* 2021;272:115966.
- Zhu J, Ren X, Liu H, Liang C. Effect of irrigation with microcystins-contaminated water on growth and fruit quality of *Cucumis sativus* L. and the health risk. *Agric Water Manag* 2018; 204: 91-99.
- Zilliges Y, Kehr J-C, Meissner S, Ishida K, Mikkat S, Hagemann M, Kaplan A, Börner T, Dittman E. The cyanobacterial hepatotoxin microcystin binds to proteins and increases the fitness of *Microcystis* under oxidative stress conditions. *PLoS One* 2011; 6(3):e17615.

*Serie Rapporti ISTISAN
numero di dicembre 2021*

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

Roma, dicembre 2021