

**ALMA MATER STUDIORUM UNIVERSITÀ DI
BOLOGNA**

Scuola Di Scienze

Corso di Laurea Magistrale in Biologia Marina

**Profilo tossicologico di cianobatteri del genere
Microcystis e studio di trattamenti per la
prevenzione delle biointossicazioni**

Tesi di Laurea in Botanica Marina Applicata

Relatrice

Prof.ssa Franca Guerrini

Correlatrice

Dott.ssa Mara Simonazzi

Dott.ssa Sonia Dall'Ara

Presentata da

Simone Negri

III sessione

Anno accademico 2017/2018

Sommario

1. INTRODUZIONE.....	1
1.1 CARATTERISTICHE GENERALI DEI CIANOBATTERI	1
2. Cianobatteri tossici.....	5
2.1 Cianotossine	7
2.1.1 Epatossine.....	7
2.1.2 Neurotossine.....	11
2.1.3 Dermatossine.....	12
2.2 Cianobatteri tossici in Italia.....	13
3. Impatto delle fioriture di cianobatteri tossici sulle acque destinate al consumo umano: misure di sorveglianza e prevenzione	20
3.1 Tecniche d'indagine per la determinazione delle cianotossine.....	22
3.1.1 Metodi di screening.....	24
3.1.2 Metodi analitici di conferma	27
3.2 Trattamenti utilizzati nei processi di potabilizzazione per eliminare le cianotossine	28
4. SCOPO DELLA TESI	31
5. MATERIALI E METODI.....	33
5.1. Allestimento delle colture di <i>Microcystis aeruginosa</i>	33
5.1.1 Crescita di <i>Microcystis aeruginosa</i> in colture <i>batch</i>	33
5.2. Valutazione della crescita e dell'efficienza fotosintetica	35
5.2.1 Conta cellulare.....	35
5.2.2 Torbidità.....	36
5.2.3 Misura dell'efficienza fotosintetica con fluorimetro PAM.....	36
5.3. Valutazione dell'effetto degli ossidanti sull'efficienza fotosintetica di <i>M. aeruginosa</i> mediante la determinazione dell'EC50.....	38
5.4. Effetto di composti ossidanti sulla degradazione delle microcistine.....	39
5.5. Determinazione delle cianotossine	40
5.6. Elaborazione statistica dei dati	41
6. RISULTATI E DISCUSSIONE.....	42
6.1 Crescita e tossicità di <i>Microcystis aeruginosa</i> in colture <i>batch</i>	42
6.1.1 Valutazione della crescita.....	42
6.1.2 Determinazione del profilo tossicologico.....	44
6.1.3 Valutazione dello stato fisiologico delle cellule.....	46
6.2 Valutazione dell'effetto degli ossidanti sull'efficienza fotosintetica di <i>M. aeruginosa</i> e determinazione dell'EC50	47

6.3	Valutazione dell'effetto degli ossidanti sulle tossine prodotte da <i>M. aeruginosa</i>	53
6.3.1	Effetto degli ossidanti sulle microcistine totali ed extracellulari.....	53
6.3.2	Effetto degli ossidanti sui principali congeneri di microcistine	55
7.	CONCLUSIONI.....	61
8.	RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI	63

1. INTRODUZIONE

1.1 CARATTERISTICHE GENERALI DEI CIANOBATTERI

I cianobatteri sono organismi procarioti capaci di compiere la fotosintesi ossigenica. Presentano un'alta diversificazione morfologica, andando da organismi unicellulari di piccole dimensioni solitari o riuniti in colonie, a forme spesso filamentose ramificate o non ramificate denominate tricomi; questi organismi hanno anche una grande variabilità dimensionale: si va da cellule con diametro di 0,2 μm a forme filamentose con lunghezza che superai 200 μm tali da renderle visibili a occhio nudo. I cianobatteri, conosciuti anche con il nome di alghe azzurre o alghe blu-verdi per la presenza, in alcuni di essi di pigmenti come la ficocianina o la alloficocianina di colore azzurro, attualmente costituiscono un gruppo monofiletico nell'ambito degli Eubacteria in base a recenti studi di biologia molecolare sulle sequenze nucleotidiche più conservate (Skulberg *et al.*, 1993), e vengono riuniti nel phylum Cyanobacteria; essendo organismi procarioti nel loro citoplasma non sono presenti organelli tipici delle cellule eucariote (nucleo, plastidi, mitocondri, ditiostomi). La loro struttura cellulare tipica è riportata in figura 1.

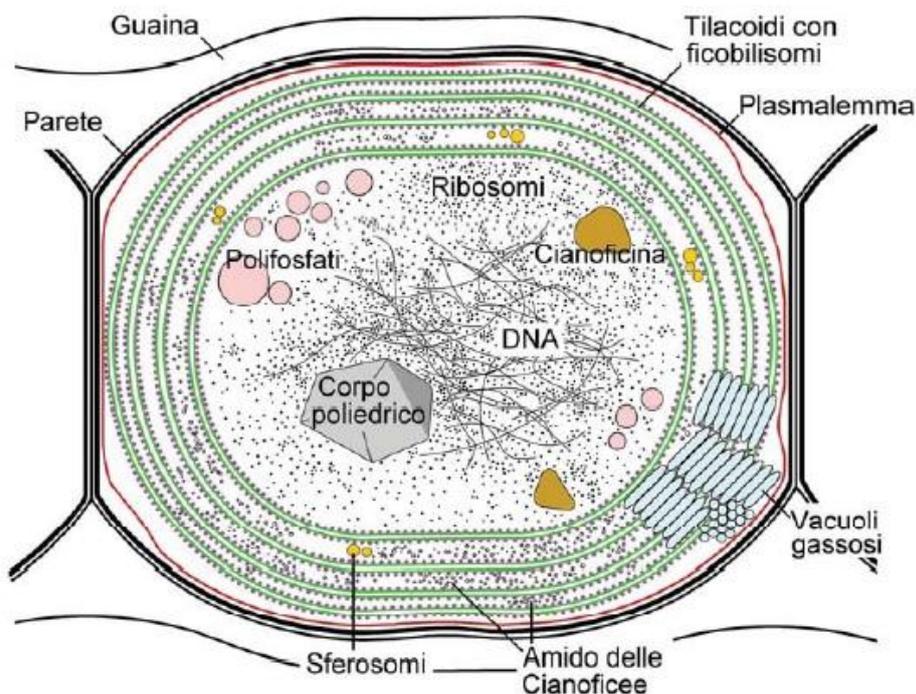


Figura 1. Organizzazione di una tipica cellula di un cianobatterio (disegno G.P.Felicini).

In una tipica cellula di un cianobatterio si possono distinguere tre parti: la parete cellulare, il cromatoplasma e il centroplasma. La porzione più esterna è costituita dalla parete cellulare, che ha le caratteristiche tipiche dei batteri Gram-negativi ed è composta da 4 strati: un primo strato sottile adiacente al plasmalemma, un secondo più spesso composto da mureina (glicopeptide formato da acido N-acetil-muramico, N-acetil-glucosamina e tre amminoacidi) che fornisce protezione meccanica alla cellula e due strati più esterni composti da proteine, fosfolipidi e lipopolisaccaridi. La parete è perforata da pori di diametro di 70 nm, utilizzati da alcune specie per il trasporto dei metaboliti da una cellula all'altra, ma principalmente per la secrezione delle mucillagini che formano una guaina esterna con funzione protettiva, aggregativa e in alcuni casi di locomozione. Sotto alla parete troviamo una fascia pigmentata denominata cromatoplasma, quest'ultima è la porzione cellulare che contiene i pigmenti fotosintetici quali clorofilla *a*, ficocianina, ficoeritrina, carotenoidi e xantofille; i pigmenti fotosintetici sono situati sulla membrana dei tilacoidi non aggregati a formare i cloroplasti, come accade nelle cellule vegetali eucarioti, ma liberi nel citoplasma e posizionati in maniera da circondare la periferia della cellula (Ressom *et al.*, 1994; Duy *et al.*, 2000). Nella zona centrale della cellula si trova il centroplasma, dove sono allocati i corpi poliedrici contenenti l'enzima RuBisCO, essenziale nel processo di fissazione del carbonio, ma anche le sostanze di riserva come i granuli di cianoficina e i granuli di polifosfati; il *centroplasma* inoltre è la sede del genoma che svolge la stessa funzione del nucleo nelle cellule eucariote. Il DNA contenuto al suo interno può essere di due tipologie: cromosomale, costituito da una molecola circolare non associata ad istoni ed extracromosomale, composto da piccole molecole circolari autonome (plasmidi). Nella maggior parte dei cianobatteri planctonici si trovano anche vacuoli gassosi che consentono alla cellula il galleggiamento lungo la colonna d'acqua.

I cianobatteri grazie alla loro capacità di adattamento hanno colonizzato la maggior parte degli ambienti acquatici e terrestri, compresi anche quelli più estremi come deserti o sorgenti termali; le principali strategie impiegate che ne hanno permesso la crescita e diffusione a spese di altri microrganismi appartenenti al fitoplancton sono:

- la capacità di aggregazione e formazione di colonie;
- la capacità di fissare l'azoto;
- l'assorbimento della radiazione luminosa con un'efficienza particolarmente elevata grazie alla presenza di differenti pigmenti fotosintetici;
- la capacità di galleggiamento nella colonna d'acqua (*buoyancy*);

- lo sfruttamento di sostanze nutritive con maggiore efficienza rispetto ad altri organismi competitori (Lindholm *et al.*, 1992);
- la produzione di composti tossici (cianotossine).

La capacità di aggregarsi è tipica della fase vegetativa di diverse specie di cianobatteri, che si associano in colonie o filamenti distribuiti in modo non omogeneo all'interno della colonna d'acqua. Le colonie di cianobatteri possono assumere svariate forme: alcune di esse hanno una struttura piatta con cellule disposte ordinatamente in fila in una matrice mucillaginosa come accade per i cianobatteri del genere *Merismopedia*, altre invece sono caratterizzate da un aspetto più irregolare e globulare come nel caso dei generi *Aphanocapsae* *Microcystis*. I cianobatteri filamentosi possiedono anch'essi una struttura variabile: i filamenti possono essere infatti ramificati, come in *Stigonema* spp., oppure non ramificati come per i generi *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Lyngbya* e *Planktothrix*. In alcune specie filamentose (Ordine Nostocales) possono inoltre essere presenti, assieme alle cellule vegetative, delle cellule specializzate con morfologia e funzioni differenti utili anche per l'identificazione tassonomica tramite osservazione al microscopio ottico.

Il processo di fissazione dell'azoto avviene grazie alla presenza dell'enzima nitrogenasi, che però viene inibito dalla presenza di ossigeno; alcuni cianobatteri quindi hanno compartimentalizzato l'enzima in cellule specializzate chiamate eterocisti, rivestite da una parete impermeabile ai gas che non permette il passaggio dell'ossigeno; la loro posizione può essere basale (adesione al substrato) o intercalare (ad intervalli regolari di 9-15 cellule vegetative). Una volta differenziata per apoptosi da una delle cellule del tricoma, l'eterocisti perde la capacità di dividersi. Gli scambi fra le eterocisti e le cellule adiacenti sono molto attivi grazie alla presenza di strutture definite microplasmodesmi (Mullineaux *et al.*, 2008), attraverso cui le eterocisti cedono i prodotti della fissazione dell'azoto alle cellule vicine e ricevono in cambio quelli della fotosintesi.

Un altro adattamento evidente nei cianobatteri è la presenza di pigmenti accessori come le ficobiliproteine, in particolare ficocianina e alloficocianina (di colore azzurro) e ficoeritrina (di colore rosso), che spesso sono presenti in concentrazioni tali da mascherare il normale colore verde della clorofilla. Le ficobiliproteine svolgono l'importante funzione di assorbire le radiazioni luminose di lunghezze d'onda diverse da quelle assorbite dalla clorofilla *a* e di trasferire energia a quest'ultima per il processo fotosintetico, ampliando così lo spettro di radiazioni fotosinteticamente attive o PAR (dall'inglese *Photosynthetically Active Radiation*). Le ficobiliproteine sono parte costituente di complessi proteici definiti

ficobilisomi ancorati lungo la superficie dei tilacoidi. Come nelle cellule eucariote, nei cianobatteri la fotosintesi avviene ad opera di complessi molecolari noti come fotosistemi (PS I e PS II) associati a pigmenti accessori, come β -carotene e xantofille. La capacità di adattarsi di questi organismi ai diversi ambienti è dimostrata anche da come riescono a sopravvivere in risposta alle variazioni di luminosità. Molte specie in condizioni di bassa luce sono in grado di aumentare il contenuto di clorofilla *a*, ficocianina, ficoeritrina determinando un aumento dell'efficienza fotosintetica, ciò permette un tasso di crescita più alto rispetto ad altri organismi competitori; altre invece sopravvivono meglio in condizioni di luce elevata.

I cianobatteri non sono dotati di flagelli per il movimento, ma molte specie planctoniche sono provviste di vacuoli gassosi che conferiscono alla cellula la capacità di galleggiamento o *buoyancy* che permette loro di ottimizzare la posizione nella colonna d'acqua, rispetto alla luce e alla disponibilità di nutrienti (Reynolds, 1984). La compressione o dilatazione delle vescicole gassose è a sua volta regolata dal bilancio intracellulare di carboidrati prodotti durante la fotosintesi che, variando la densità della cellula, modificano lo stato delle vescicole gassose e quindi la galleggiabilità (Oliver *et al*, 2012).

La crescita dei cianobatteri dipende da un processo di divisione cellulare detto fissione o scissione binaria, il quale a sua volta dipende da diversi fattori ambientali come temperatura, luce, pH, e disponibilità di nutrienti. In condizioni di crescita ottimale le cellule hanno un'elevata velocità di replicazione e possono dare luogo ad una fioritura o *bloom* in un tempo ridotto, la quale può persistere per qualche giorno spesso 5/7 giorni (Ressom *et al.*, 1994). Uno dei fattori che influisce maggiormente sulla proliferazione dei cianobatteri è la presenza dei nutrienti inorganici disciolti in acqua, fra questi, i cianobatteri utilizzano principalmente il fosforo, sottoforma di ortofosfato e l'azoto come nitrato inoltre, rispetto ad altri organismi autotrofi fotosintetici, possono sfruttare efficacemente l'azoto anche sotto forma ammoniacale (Prescott, 1968; Bold & Wynne, 1985). Alcuni cianobatteri possono adattarsi ad ambienti con pH elevato e basse concentrazioni di CO₂ come ad esempio *Arthrospira platensis*; la presenza di metalli può avere un effetto differente a seconda degli elementi considerati e delle loro concentrazioni, manganese e rame sono cofattori di importanti reazioni enzimatiche ma possono essere tossici qualora presenti a concentrazioni micromolari, mentre ferro e molibdeno sembrano promuoverne la crescita (Reuter & Petersen, 1987). Infine, molte specie di cianobatteri sono in grado di produrre metaboliti secondari tossici di diverso tipo definiti cianotossine, che rappresentano una problematica a livello ecologico e sanitario.

2. Cianobatteri tossici

La capacità di molte specie di cianobatteri di produrre tossine e l'aumento della distribuzione e della frequenza delle loro fioriture (Anderson *et al.*, 2002; Hudnell, 2008; Lopez *et al.*, 2008), ha portato negli anni ad un maggiore interesse per questi fenomeni, in particolare considerando l'impatto che possono avere non solo sull'ambiente ma anche sulla salute umana (Anderson *et al.*, 2002; Lopez *et al.*, 2008). Una delle maggiori difficoltà che si riscontra attualmente nella gestione di questi eventi è definirne in modo univoco la tossicità, dal momento che, una stessa specie di cianobatterio può dar luogo sia a fioriture tossiche che non tossiche. Molte specie di cianobatteri che provocano *bloom* presentano al loro interno ceppi tossici e non tossici che possono coesistere e non sono morfologicamente distinguibili fra loro se non attraverso indagini di biologia molecolare: i ceppi tossici di *Microcystis* spp. ad esempio, possiedono un corredo di geni per la sintesi delle microcistine (*mcyA–mcyJ*), che i ceppi non tossici non hanno (Davis *et al.*, 2009; Kurmayer & Christiansen, 2009).

L'espressione della tossicità nei cianobatteri in molti casi è stata associata alla fase di crescita dell'organismo, in *Microcystis aeruginosa* ad esempio, la produzione delle tossine tende ad aumentare durante la fase di crescita esponenziale per poi diminuire gradualmente durante quella stazionaria (Watanabe & Oishi, 1985). La crescita dei cianobatteri tossici e l'espressione della tossicità inoltre è in relazione alle condizioni ambientali di temperatura, luce e disponibilità di nutrienti. Considerando nuovamente come esempio *Microcystis aeruginosa*, la sua temperatura ottimale di crescita risulta essere di 25-30°C (Reynolds, 2006) mentre la massima produzione di tossine si osserva a temperature inferiori pari a 18-20°C; anche la luce sembra influenzare in maniera significativa la produzione di tossine in questo genere, che tende ad arrestarsi in condizioni di bassa intensità luminosa (7,53 $\mu\text{E}/\text{m}^2$ per s) (van der Westhuizen & Eloff, 1985; Watanabe & Oishi, 1985).

Un fattore molto importante che determina la formazione dei *bloom* è lo stato trofico del sistema idrico. Alcuni studi riportano che le fioriture di cianobatteri si manifestano prevalentemente in acque eutrofiche con un rapporto N/P che varia da 10 a 15 (Merel *et al.*, 2013). E' stato inoltre dimostrato un effetto sinergico fra aumento di temperatura e l'incremento della concentrazione del fosforo nel favorire la crescita di ceppi tossici di *Microcystis* spp. (Davis *et al.*, 2009); questi studi sottolineano che nel contesto attuale di incremento dei fenomeni di eutrofizzazione e di riscaldamento globale si potrebbe verificare

un generale incremento delle fioriture di specie produttrici di tossine, come mostrato in figura 2.

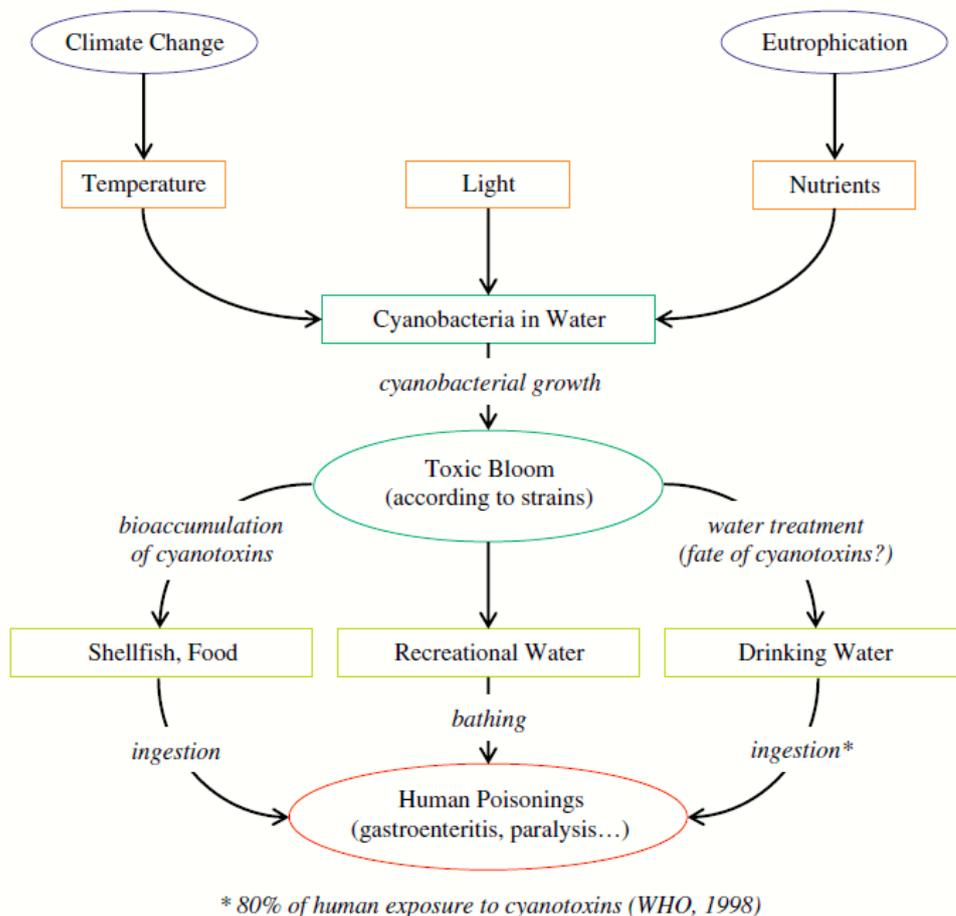


Figura 2. Condizioni che possono determinare la comparsa di fioriture di cianobatteri tossici e vie di esposizione per l'uomo.

Le fioriture di cianobatteri tossici hanno un impatto notevole sia per l'ambiente che per l'uomo: le problematiche per l'ambiente sono associate ad esempio ad anossia dei fondali per degradazione di materiale organico in eccesso con conseguente peggioramento della qualità dell'acqua per la formazione di cattivi odori e schiume. L'uomo può essere esposto alle cianotossine prodotte durante questi *bloom* (figura 2) direttamente attraverso le attività di balneazione oppure in seguito dell'ingestione di acqua potabile contaminata dalle cianotossine non trattata in maniera tale da garantire la totale eliminazione di questi composti; anche il consumo di alimenti contaminati, come molluschi bivalvi o pesci può portare ad eventi di intossicazione.

2.1 Cianotossine

Le cianotossine prodotte possono essere classificate in differenti categorie in base agli effetti fisiologici sugli organismi o tessuti bersaglio (Merel *et al.*,2013):

- *Epatotossine* che hanno effetti sul fegato (80 varianti di microcistine, 6 diverse forme di nodularine e cilindropermopsine);
- *Neurotossine* che agiscono sul sistema nervoso (anatotossina-a, omoanatotossina-a, anatotossina a-(S), 20 varianti di saxitossine e β -N-methylamino-L-alanine abbreviato con BMAA);
- *Dermatotossine* che causano dermatiti, disturbi gastrointestinali e infiammatori, oltre ad essere dei potenti promotori tumorali, alcune molecole come aplisiatossina e lingbiatossina sono prodotte da cianobatteri marini.

2.1.1 Epatossine

Epatotossine: Microcistine (MC)

Dal punto di vista chimico queste tossine sono degli eptapeptidi monociclici con un peso molecolare che varia da 500-4000 Da. La loro struttura chimica è mostrata in figura 3.

Queste molecole sono costituite da sette amminoacidi di cui cinque conservati (D-alanina, D-eritro- β -metilaspartato, D-glutammato, N-mitildiidro-alaninae e Adda, un amminoacido aromatico tipico dei cianobatteri) e due L-amminoacidi variabili denominati X e Z che identificano i diversi congeneri di microcistine (Sivonen & Jones, 1999; McElhiney & Lawton, 2005). I più comuni sostituenti X sono leucina (L), arginina (R) e tirosina (Z), mentre i sostituenti Z sono arginina (R), alanina (A) e metionina (M) (Carmichael. 1988); in base ad essi, ogni congenere è identificato da un diverso suffisso (e.g. MC-LR, MC-RR, MC-YR).

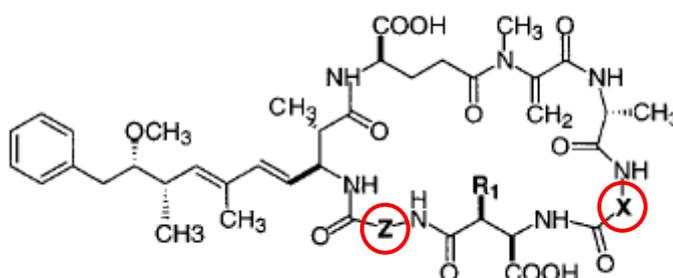


Figura 3. Struttura chimica delle microcistine (Rapporto ISTISAN 08-6).

Le microcistine sono molecole stabili e solubili in acqua e una volta assorbite dall'organismo raggiungono il fegato accumulandosi velocemente nelle cellule epatiche. All'interno degli epatociti, svolgono la loro attività come potenti inibitori delle fosfatasi PP1 e PP2A; tale inibizione, alle alte dosi, porta ad una iperfosforilazione delle proteine del citoscheletro con rottura finale dell'ultrastruttura epatica. Il fegato si rigonfia raddoppiando il suo volume e può provocare una cospicua emorragia. Alle dosi più basse si ha induzione della proliferazione cellulare e ipertrofia epatica (Rapporto ISTISAN 11/35, Pt.1).

Alcuni studi (Ikehara *et al.*, 2009) hanno determinato la tossicità di 21 varianti di microcistine (MC) e della nodularina (NOD) sulla base della loro capacità di inibizione della fosfatasi 2A (IC_{50} : = *Inhibitory Concentration*50%); questi risultati indicano che la MC-LR è l'inibitore più potente della fosfatasi 2A (tabella 1). Sulla base di questi valori di inibizione gli autori hanno calcolato un fattore di conversione per stimare le concentrazioni di MC e di NOD come equivalenti di MC-LR, applicando la seguente formula:

$$\text{Fattore di conversione} = IC_{50} \text{ MC-LR} / IC_{50} \text{ MC}_{\text{considerata}}$$

Tossina	IC_{50} (nM)	Fattore di conversione
MC-LR	0,032±0,004	1,000
MC-RR	0,056±0,002	0,571
MC-FR	0,069±0,003	0,464
MC-LF	0,096±0,0019	0,333
[D-Asp ³]MC-HtyR	0,098±0,006	0,327
[D-Asp ³ , (Z)-Dhb ⁷]MC-HtyR	0,110±0,008	0,291
MC-LW	0,114±0,003	0,291
[D-Asp ³ , (E)-Dhb ⁷]MC-HtyR	0,122±0,005	0,262
MC-YR	0,125±0,005	0,256
MC-LA	0,161±0,002	0,199
[D-Asp ³ , (Z)-Dhb ⁷]MC-LR	0,164±0,010	0,195
[Dha ⁷]MC-LR	0,167±0,003	0,192
MC-WR	0,179±0,011	0,179
[D-Asp ³ , (E)-Dhb ⁷]MC-LR	0,201±0,003	0,159
[D-Asp ³ , Dha ⁷]MC-RR	0,220±0,012	0,145
[D-Asp ³ , Dha ⁷]MC-LR	0,254±0,004	0,126
[Dha ⁷]MC-RR	0,293±0,012	0,109
[D-Asp ³]MC-RR	0,300±0,009	0,107
[Dha ⁷]MC-YR	0,379±0,003	0,084
NOD	0,540±0,063	0,059
[6-(Z)-ADDA ⁵]MC-RR	0,126±0,314	0,003

Tabella 1. Fattori di conversione e valori di IC_{50} per 21 varianti di microcistine e per la nodularina (Rapporto ISTISAN 11/35 Pt.1).

Fra gli organismi produttori di queste molecole troviamo i cianobatteri appartenenti ai generi *Microcystis*, *Anabaena*, *Pseudanabaena*, *Oscillatoria*, *Planktothrix*, *Nostoc* e *Anabaenopsis*. Come precedentemente riportato, è stato dimostrato che la tossicità dei ceppi di *Microcystis* dipende dalla presenza di un gruppo di geni responsabili della sintesi delle tossine (Kurmayer *et al.*, 2002). Anche se non sono ancora noti i meccanismi, si è osservato inoltre, che in natura le condizioni ambientali possono influire sulla predominanza del ceppo tossico rispetto a quello non tossico. Indagini effettuate su organismi come *Microcystis aeruginosa*, hanno dimostrato che le tossine possono essere rilasciate rapidamente in ambiente in condizioni di stress (Rapala *et al.*, 1997), anche se ciò comporta un dispendio energetico non trascurabile per la cellula.

Epatotossine: Nodularina (NOD)

Le NOD sono pentapeptidi monociclici con una struttura simile alle MC: ad oggi si conoscono pochi congeneri, identificati per la variabilità dell'unico L-amminoacido presente in posizione 2, oltre a piccole modificazioni strutturali come le demetilazioni. (figura 4). Queste molecole agiscono come potenti promotori tumorali e sono state riscontrate in Australia, Nuova Zelanda e mar Baltico. Sembrano essere associate alla specie planctonica *Nodularia spumigena* presente nelle acque salmastre (Merel *et al.*, 2013) e alla specie bentonica *Nodularia sphaerocarpa* : entrambe possiedono infatti un cluster di geni (nda) che codifica per la sintesi della NOD (Moffitt & Neilan, 2004). Recenti studi hanno però dimostrato che queste tossine potrebbero essere sintetizzate anche ad alcune specie terrestri simbionti di piante appartenenti al genere *Nostoc* (Gehring *et al.*, 2012).

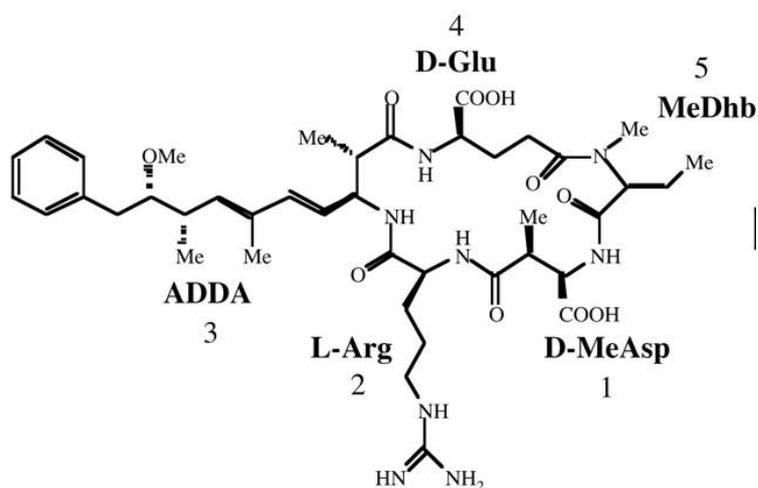
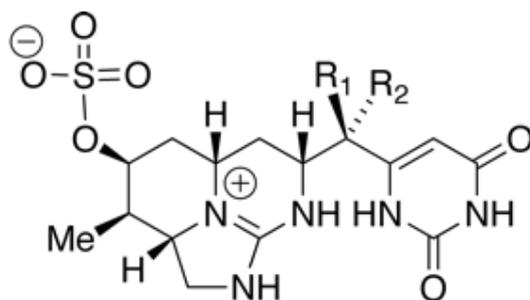


Figura 4. Struttura chimica della nodularina (Moffitt & Neilan, 2004).

Epatotossine: cilindrospermopsine (CYN)

Sono una classe di molecole costituite da tre congeneri mostrati in figura 5 (cilindrospermopsina, 7-epicilindrospermopsina e 7-deossicilindrospermopsina) prodotte da cianobatteri dei generi *Cylindrospermopsis*, *Aphanizomenon*, *Anabaenae Lyngbya*. La cilindrospermopsina è un alcaloide guanidico molto attivo con effetti epatotossici, nefrotossici e citotossici generici (Ohtani *et al.*, 1992) che agisce direttamente attraverso l'inibizione della sintesi proteica con meccanismo non reversibile e indirettamente tramite metaboliti citotossici che vengono formati in seguito alla bio-attivazione della tossina da parte del citocromo P450 (Froschio *et al.*, 2003; Runnegar *et al.*, 1994; Runnegar, 1995; Runnegar *et al.*, 2002). Nei mammiferi la cilindrospermopsina provoca avvelenamento a carico del fegato, dei reni e possibili danni al cuore (Terao *et al.*, 1994; Wiegand & Pflugmacher, 2005). È stato inoltre osservato che, in carenza di fosfato inorganico, il cianobatterio *Aphanizomenon ovalisporum* produce CYN che agiscono come sostanze allelopatiche inducendo la trascrizione e secrezione di fosfatasi in altri organismi fitoplanctonici; questo meccanismo consente di aumentare la concentrazione di fosfato inorganico in acqua e renderlo indirettamente più disponibile (Yosef *et al.*, 2010). Anche per la cilindrospermopsina è stato individuato il cluster genico (*cyr*) responsabile della sua sintesi in due specie di cianobatteri del genere *Oscillatoria* (Mazmoutz *et al.*, 2010, Mihali *et al.*, 2008).



Compound name	R ₁	R ₂	Mw
Cylindrospermopsin (7-R)	OH	H	415.42
7-Epi-cylindrospermopsin (7-S)	H	OH	415.42
7-Deoxy-cylindrospermopsin	H	H	399.42

Figura 5. Struttura chimica delle cilindrospermopsine (Mazmoutz *et al.*, 2010).

2.1.2 Neurotossine

Neurotossine: anatossine (ANA)

Fra le neurotossine, l' anatossina-a è un potente alcaloide a basso peso molecolare pari a 165 Da (figura 6.a), di cui è stato individuato un suo congenere denominato omoanatossina-a del peso di 179 Da (Figura 6.b) caratterizzato dalla stessa struttura ma con un gruppo metilico in più (Devlin *et al.*, 1977). L'anatossina-a (ANA-a) è prodotta da cianobatteri appartenenti ai generi *Anabaena*, *Phormidium*, *Planktothrix*, *Oscillatoria* e *Aphanizomenon*. (Rapporto ISTISAN 11/35 pt.1). La ANA-a(s) ha una struttura chimica diversa essendo un estere fosforico della N-idrossiguanidina (Figura 6.c), la produzione di questa molecola è stata associata solamente a ceppi di *Anabaena*, ma non è nota la via biosintetica (Merel *et al.*, 2013). L'ANA-a è un potente agente depolarizzante pre- e post-sinaptico. Si lega ai recettori dell'acetilcolina nel sistema nervoso centrale e periferico e nelle giunzioni neuromuscolari, con blocco della trasmissione dell'impulso nervoso. La morte sopraggiunge per paralisi muscolare e asfissia. Gli effetti acuti sembrano rappresentare il rischio principale per la salute umana. L'ANA-a(s) inibisce l'attività dell'acetilcolinesterasi ma solo nel sistema nervoso periferico.

Neurotossine: Saxitossine

Un'altra classe di neurotossine è costituita dalle saxitossine (Figura 6.d), note da tempo in mare perché associate alle maree rosse prodotte dai *bloom* di dinoflagellate del genere *Alexandrium* che le sintetizzano (Lopez *et al.*, 2008; Westrick *et al.*, 2010); queste molecole in acqua dolce sono prodotte principalmente dai cianobatteri dei generi *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Lyngbya* e *Cylindrospermopsis* (Lopez *et al.*, 2008; Westrick *et al.*, 2010). Le saxitossine agiscono bloccando i canali voltaggio dipendenti del sodio e del calcio; in seguito ad intossicazione acuta gli effetti sull'uomo si manifestano entro 30 minuti dall'ingestione ed includono formicolio o bruciore alle labbra, lingua e gola, sudorazione, vomito e diarrea e nei casi gravi morte per paralisi respiratoria (Kao & Levinson, 1986; Su *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2003).

Neurotossine: β -N-metilammino-L-alanina (BMAA)

Il BMAA è un aminoacido non proteico di 118 Da (Figura 6.e) che agisce principalmente sui neuroni legandosi ai recettori del glutammato. Il BMAA potrebbe anche essere associato all'insorgenza di importanti malattie neurodegenerative quali la Sclerosi Laterale

Amiotrofica (SLA) e il morbo di Parkinson, determinando un ripiegamento non corretto delle proteine intraneuronali con conseguente modifica della loro struttura tridimensionale (Merel *et al.*, 2013). Questa neurotossina è ancora poco studiata e non se ne conosce l'origine con esattezza, anche se da un lavoro di Cox *et al.*, (2005) sembra che questa molecola venga prodotta da molti gruppi di cianobatteri.

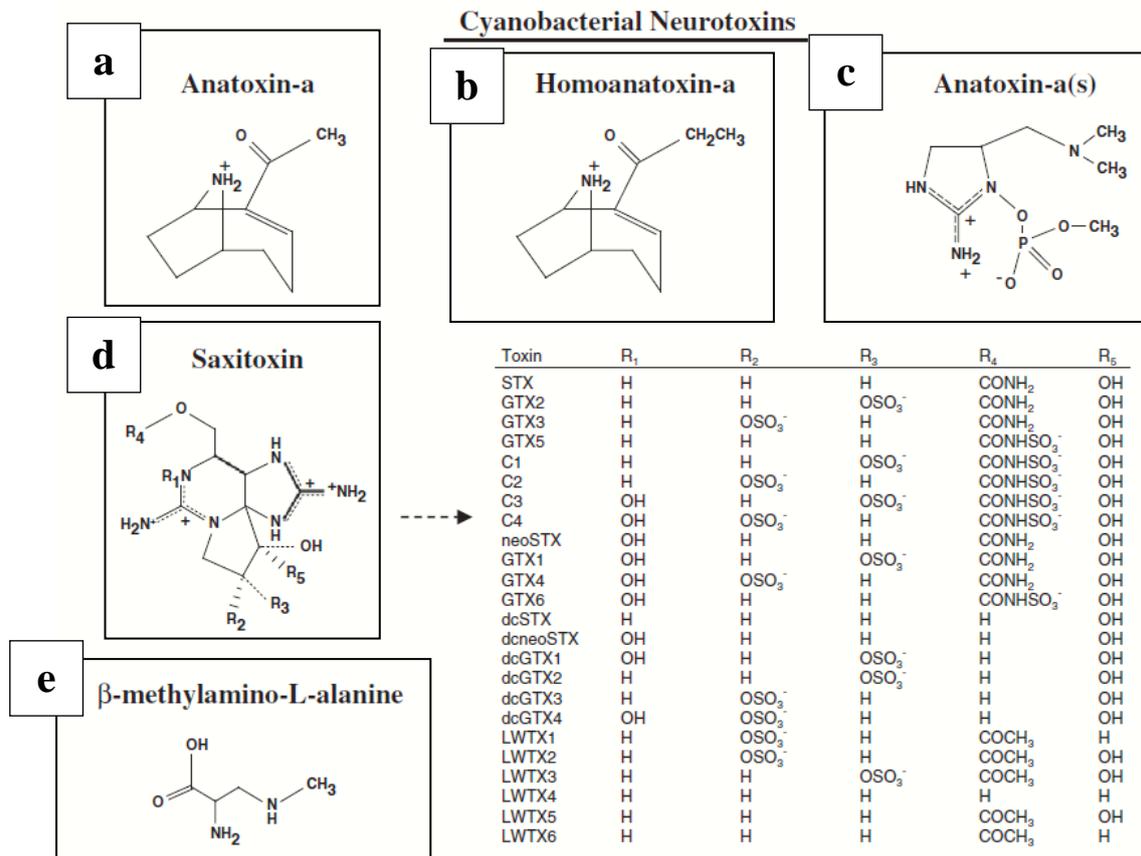


Figura 6. Struttura chimica delle principali neurotossine prodotte da cianobatteri (Merel *et al.*, 2013).

2.1.3 Dermatossine

Le dermatossine prodotte da cianobatteri includono molecole come le aplisiatossine (APTXs) e le lingbiatossine (LTXs) prodotte principalmente da *Lyngbya majuscula*. Queste tossine per ora sono state ritrovate solamente nell'acqua di mare. Dopo l'esposizione i sintomi caratteristici di queste intossicazioni comprendono dermatiti e infiammazione gastrointestinale con diarrea. Inoltre questo gruppo di molecole sono considerate dei potenti promotori tumorali che agiscono attraverso l'attivazione della protein-chinasi C (van Apeldoorn *et al.*, 2007).

2.2 Cianobatteri tossici in Italia

La presenza di cianobatteri tossici nei sistemi di approvvigionamento idrico è una problematica sempre più rilevante a livello globale e dagli anni '70 ad oggi, in diverse parti del mondo, si è osservato un costante aumento nella frequenza dei fenomeni associati a fioriture algali di specie produttrici di tossine. Questa tendenza è ascrivibile sia alla maggiore attenzione del mondo scientifico per questo tipo di problema, sia per l'aumentata frequenza di episodi di intossicazione negli animali, uomo compreso (Figura 7). In particolare, in letteratura sono riportati diversi casi di intossicazione da microcistine che nell'uomo sono limitate a gastroenteriti (Merel *et al.*, 2013 e referenze al suo interno), tuttavia eventi eccezionali hanno portato anche al decesso di diverse persone come nel caso verificatosi in Brasile nel 1996 dove sono morti 56 pazienti dei 130 sottoposti a dialisi con acqua risultata contaminata da microcistine (Jochimsen *et al.*, 1998; Azevedo *et al.*, 2002).

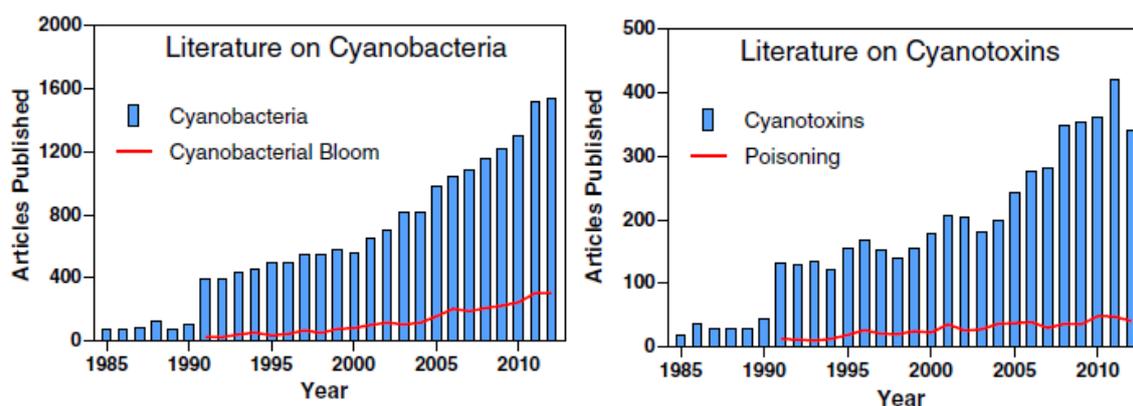


Figura 7. Letteratura su cianobatteri e eventi di *bloom* (sinistra) e letteratura su cianotossine e eventi di intossicazione (destra) (Merel *et al.*, 2013).

In Italia un'imponente fioritura di cianobatteri tossici ha interessato nel 1985, due grandi invasi artificiali della Sardegna, il Medio Flumendosa e il Mulargia, costruiti a scopo di approvvigionamento di acqua potabile. In entrambi gli invasi è stata riscontrata la presenza dominante di *Planktothrix rubescens*, *Microcystis aeruginosa*, e *Anabaena planctonica* (Rapporto ISTISAN 08/6).

Oggi, l'evidente tendenza all'aumento del fenomeno sta ad indicare un generale peggioramento della qualità trofica dei corsi d'acqua italiani. Per questo anche in Italia gli organi competenti hanno messo in atto una serie di misure di prevenzione volte ad aumentare i propri sistemi di sorveglianza per stimare la distribuzione e abbondanza dei cianobatteri tossici nella penisola. Da queste studi è emerso che le specie tossiche più comuni distribuite

lungo tutto il territorio nazionale appartengono ai generi *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Cylindrospermopsis*, *Planktothrix* e *Microcystis* come riportato nella figura 8 sottostante.

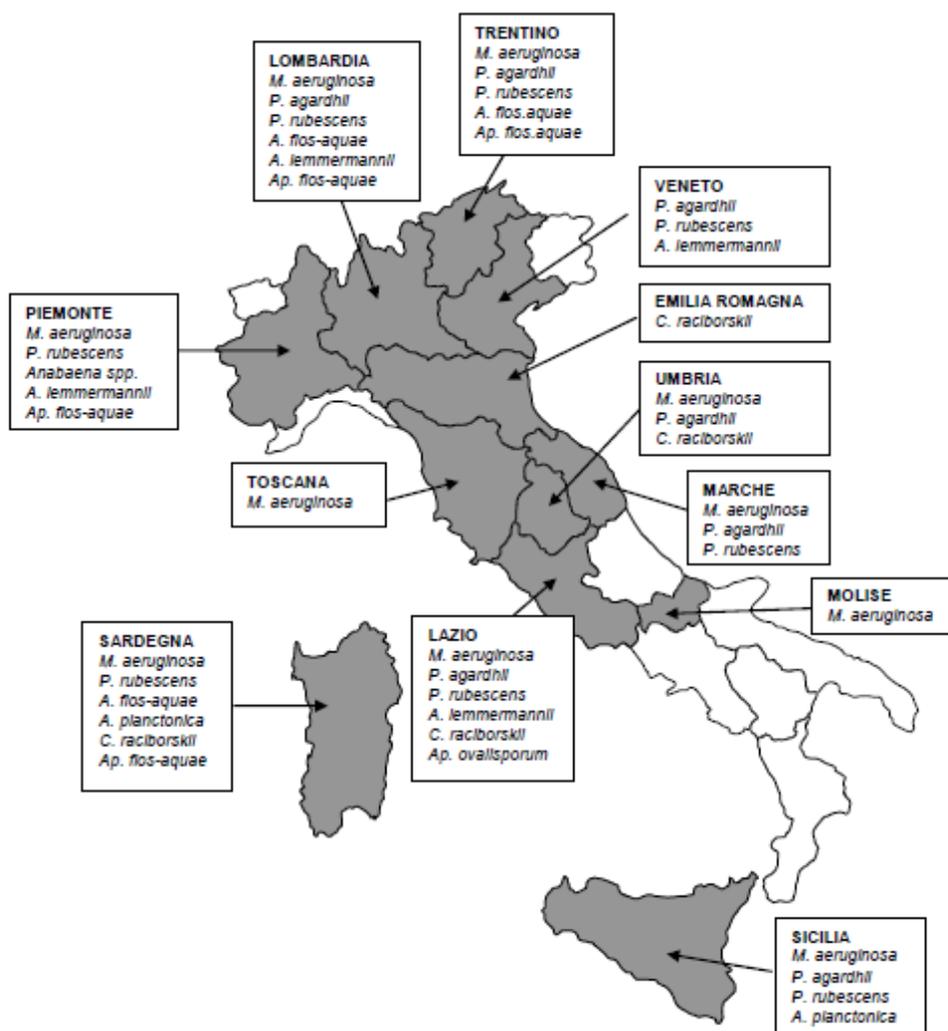


Figura 8. Mappa della distribuzione dei cianobatteri tossici in Italia (Rapporto ISTISAN 08/6).

Fra i cianobatteri tossici censiti in Italia, alcuni appartengono all'ordine dei Nostocales, cianobatteri filamentosi provvisti delle cellule specializzate eterocisti e acineti. Di questi, il genere *Anabaena* comprende diverse specie tossiche (Figura 9); recentemente è stata proposta una rivisitazione tassonomica di questo gruppo sulla base della netta distinzione genetica fra le specie planctoniche dotate di vescicole gassose (nuovo genere: *Dolichospermum*) e quelle bentoniche (Wacklin *et al.*, 2009).

Fra le specie tossiche in Italia quelle maggiormente riscontrate sono: *A. circinalis*, *A. flos-aquae*, *A. lemmermannii* e *A. planctonica*.



Fig. 9. Specie tossiche del genere *Anabaena* segnalate in Italia: a) *A. circinalis* (foto di Kheon-hee *et al.*, 2014); b) *A. flos-aquae*; c) *A. lemmermannii*; d) *A. planctonica* (foto da Algaebase).

- *Anabaena circinalis* (figura 9.a) è costituita da tricomi liberi a forma di spirale con una lunghezza variabile di circa 70-120 µm, le cellule vegetative sono di forma sferica o compressa di colore verde-azzurro e munite di vescicole gassose; le eterocisti hanno le stesse dimensioni delle cellule vegetative mentre gli acineti sono ellissoidali. Sono organismi produttori di anatoossine e saxitossine (Sivonen *et al.*, 1989; Humpage *et al.*, 1994). In Italia le fioriture sono state osservate in Lombardia, le acque temperate eutrofiche sembrano favorirne la formazione.
- *Anabaena flos-aquae* (figura 9.b) forma tricomi a spirale spesso inglobati in materiale gelatinoso con cellule sferiche o di forma cilindrica. È una specie produttrice di anatoossine e microcistine (Carmichael *et al.*, 1984). È un organismo tipicamente eutrofico e può produrre cisti di resistenza durante l'inverno. In Italia questa specie è stata osservata in Sardegna, Lombardia e Trentino, le condizioni favorevoli per la fioritura sono: temperatura fra i 20/25 °C, luce elevata e stratificazione.

- *Anabaena lemmermannii* (figura 9.c) si presenta con tricomi liberi o inglobati all'interno di un involucro mucillaginoso, con cellule vegetative munite di vescicole gassose che possono essere cilindriche o sferiche; le eterocisti si raggruppano nel centro del tricoma e alle due estremità troviamo gli acineti di forma cilindrica. Produce diversi tipi di tossine come le anatossine-a (s), saxitossine e microcistine (Henriksen, 1996). Questa specie è stata segnalata in Italia in Lazio, Lombardia, Veneto e Piemonte ed è tipica dei laghi più estesi e meno eutrofizzati; presenta una marcata stagionalità in grado di svilupparsi in acque abbastanza calde e con una bassa tolleranza alle acque più fredde (<17 °C).
- *Anabaena planctonica* (figura 9.d) è costituita da tricomi liberi e solitari con largo involucro mucillaginoso trasparente; le cellule vegetative, provviste di vescicole gassose, possono essere di forma sferica o cilindrica, mentre gli acineti sono ellissoidali e solitari oppure presenti in coppia distanti dalle eterocisti. Si tratta di una specie produttrice di microcistine (Nogueira *et al.*, 2001). In Italia è stata osservata in Sardegna e Sicilia con fioriture in primavera-estate; la sua temperatura ottimale di crescita è di circa 25 °C e può tollerare anche ambienti con pH molto elevati, predilige acque ricche di nutrienti.

Sempre appartenenti all'ordine delle Nostocales in Italia si osservano anche specie tossiche appartenenti al genere *Aphanizomenon* (figura 10): *Aph. flos-aquae* e *Aph. ovalisporum*.

- *Aphanizomenon flos-aquae* (figura 10.a) presenta tricomi non ramificati che si assottigliano leggermente verso la parte finale, spesso questi filamenti sono uniti fra di loro a formare un fascio; al centro di ogni filamento, sono localizzati acineti e eterocisti. Questa specie produce anatossine (Rapala *et al.*, 1993) e in Italia è stata segnalata in Sardegna, Trentino e Piemonte. Può crescere anche in inverno prediligendo temperature non troppo elevate e basse radiazioni luminose.
- *Aphanizomenon ovalisporum* (figura 10.b) produce tossine del genere cilindrospermopsina (Banker *et al.*, 1997). È un organismo composto da tricomi solitari con lunghezze che variano da 60-700 µm con poche cellule ialine terminali, le cellule vegetative contengono vescicole gassose e le eterocisti sono sferiche o ellissoidali, mentre gli acineti sono localizzati nella porzione centrale dei tricomi. Questo organismo predilige temperature variabili dai 26 ai 30 °C, pertanto il suo periodo ottimale di crescita risulta essere quello estivo e autunnale, anche se il

massimo tasso di crescita si ottiene con un basso livello di irradiazione. In Italia ci sono state delle segnalazioni della presenza di questa specie nel Lazio.

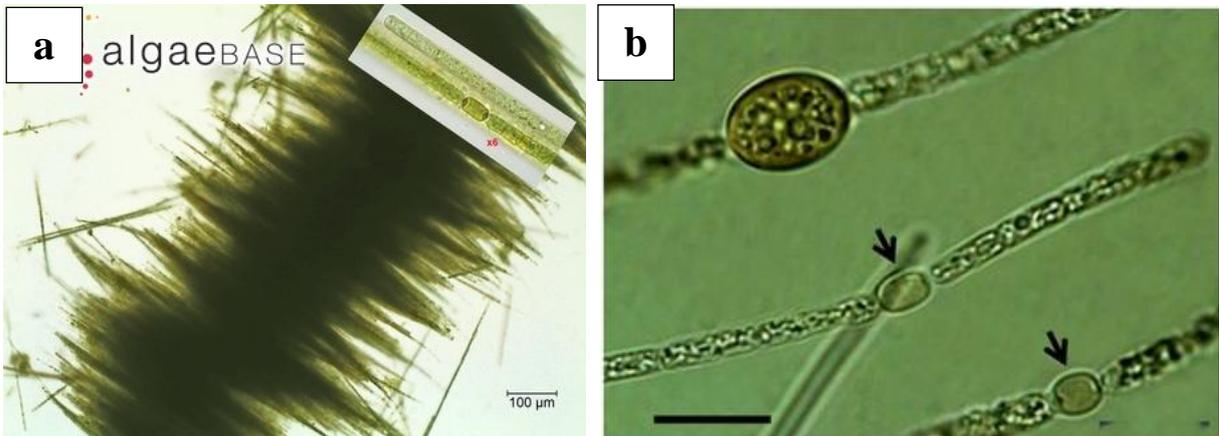


Figura 10. Specie tossiche del genere *Aphanizomenon* segnalate in Italia: a) *Aph.flos-aquae* (foto da Algaebase); b) *Aph. ovalisporum* (foto da Zohary *et al.*, 2014).

Un'altra specie tossica dell'ordine Nostocales è *Cylindrospermopsis raciborskii* (figura 11): questa specie filamentosa presenta le estremità dei tricomi appuntite e terminanti con le eterocisti; le cellule non sono distinguibili facilmente poiché spesso prive di parete cellulare. Una delle caratteristiche peculiari di questa specie è la presenza di due diversi morfotipi, curvo (figura 11.a) e dritto (figura 11.b); il morfotipo dritto è generalmente associato ad una produzione di tossine più elevata. *C. raciborskii* è noto per produrre le tossine CYN e saxitossine (Hawkins *et al.*, 1985). Pur essendo una specie sub-tropicale, recentemente è stato osservato anche nelle zone temperate. In Italia questa specie è stata segnalata in Lazio, Sardegna, Umbria e Emilia Romagna. Tendenzialmente predilige con temperature superiori a 23 °C e condizioni di bassa luminosità. Le fioriture sono difficili da rilevare in quanto non si osservano variazioni macroscopiche nell'acqua sottoforma ad esempio di schiume o colorazioni particolari.

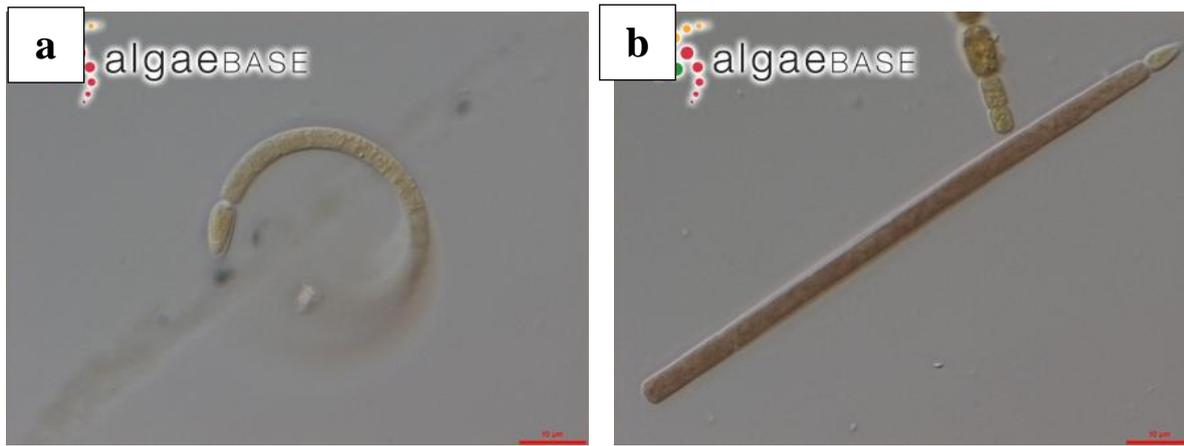


Figura 11. *Cylandrospermopsis raciborskii*, a) morfotipo curvo, b) morfotipo dritto (foto da Algaebase)

All'ordine delle Oscillatoriales, appartengono alcune specie tossiche del genere *Planktothrix* mostrate in figura 12: *P. agardhii* e *P. rubescens*, questi sono cianobatteri filamentosi che non presentano cellule specializzate all'interno delle colonie.

- *Planktothrix agardhii* (figura 12.a) presenta cellule di piccole dimensioni (3-4 μm) riunite in tricoli solitari, dritti di colore verde-azzurro con cellule apicali talvolta terminanti con un ispessimento della parete cellulare (caliptra). Questa specie produce microcistine (Henriksen *et al.*, 1996) e anatoossine (Hawser *et al.*, 1990). È stata segnalata in Marche, Umbria, Lazio, Lombardia, Trentino, Veneto e Sicilia con fioriture tardo-estive. Essendo una specie ricca di ficocianina, può adattarsi a corpi d'acqua poco profondi e molto illuminati, anche in limitazione da nutrienti; la sua temperatura ottimale di crescita è compresa fra 10-30 °C e può tollerare salinità fino al 7.8 ‰
- *Planktothrix rubescens* (figura 12.b) presenta una struttura molto simile a *P. agardhii*, è infatti composto da cellule di forma tonda o conica, tranne quelle apicali usate per il riconoscimento morfologico; le cellule sono ricche di ficoeritrina che ne determina la caratteristica colorazione rosso porpora o bruna dei tricoli con lunghezze molto variabili. *P. rubescens* produce microcistine in quantità circa doppie rispetto ad altri cianobatteri (Chorus *et al.*, 1999; Codd *et al.*, 2005). In natura possono coesistere sia ceppi tossici che non, che possono essere discriminati mediante studi di tipo molecolare sui genotipi contenenti i geni *mcy*. In Italia ci sono segnalazioni provenienti da Lazio, Sicilia, Sardegna, Marche, Lombardia, Trentino, Veneto e Piemonte. Questa specie è adattata a crescere in condizioni di basse luminosità in corpi idrici profondi. La temperatura ottimale di crescita è di 10-20 °C

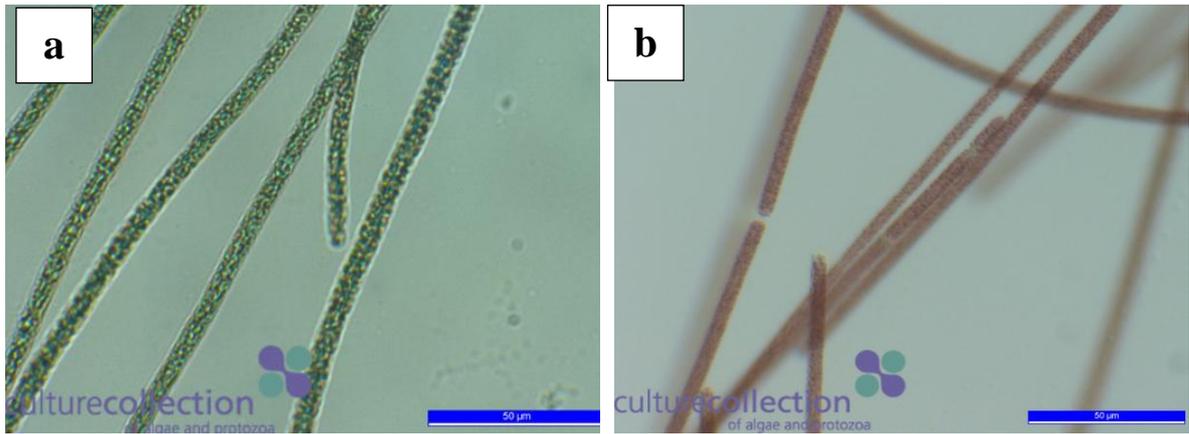


Figura 12. Specie tossiche del genere *Planktothrix* segnalate in Italia, a) *P. agardhii*, b) *P. rubescens* (foto da Culture Collection of Algae and Protozoa, CCAP)

Microcystis aeruginosa (figura 13), oggetto di questo studio, appartiene invece all'ordine dei Chroococcales, un gruppo di cianobatteri non filamentosi che formano colonie di varia natura. Le cellule sono sferiche e piccole (1-6 µm); sono caratterizzate dalla presenza di vescicole gassose e tendono a formare colonie sferoidali o lobate, spesso di forma irregolare e clatrate ovvero con una cavità al loro interno (figura 13.a). Le colonie possono essere costituite da pochi individui fino ad alcune centinaia di cellule che sono tenute insieme da una matrice trasparente gelatinosa. *M. aeruginosa* produce microcistine (Carmichael *et al.*, 1988); ci sono segnalazioni di questa specie provenienti da quasi tutte le regioni italiane, infatti è stata ritrovata in Lombardia, Emilia Romagna, Trentino, Piemonte, Toscana, Umbria, Marche, Lazio, Molise, Sicilia e Sardegna. La sua diffusione risulta maggiore nelle regioni temperate, le fioriture si verificano generalmente a fine estate e possono perdurare nel tempo se nei corpi idrici sono presenti nutrienti e temperature superiori a 15 °C.

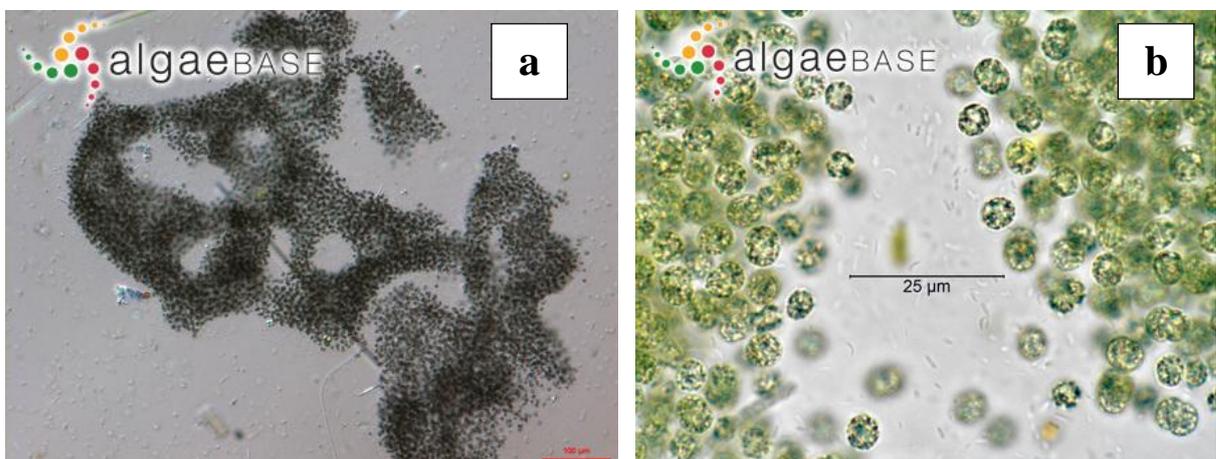


Figura 13. *Microcystis aeruginosa*, a) colonie irregolari clatrate, b) singole cellule (foto da Algaebase).

3. Impatto delle fioriture di cianobatteri tossici sulle acque destinate al consumo umano: misure di sorveglianza e prevenzione

Vista l'ampia distribuzione spaziale dei cianobatteri tossici e la loro capacità di raggiungere densità elevate durante le fioriture (Bruno *et al.*, 2003), è stato necessario istituire una serie di sistemi di controllo, in modo da evitare che le cianotossine da loro prodotte possano entrare a contatto con l'uomo, nel caso in cui le acque interessate dalle fioriture vengano utilizzate a scopi potabili. I trattamenti di potabilizzazione impiegati tradizionalmente negli impianti di depurazione spesso non sono in grado di rimuovere completamente la biomassa algale eventualmente presente indipendentemente dalla presenza o meno di specie tossiche; il processo di rimozione degli organismi fitoplanctonici è meno complesso per diatomee e cloroficee, e più articolato per i cianobatteri, soprattutto se filamentosi (Rapporto ISTISAN, 35/11, Pt. 1).

La diversa struttura chimica delle tossine, inoltre influenza la loro reattività con gli ossidanti come cloro e ozono normalmente impiegati nei processi di depurazione determinando la formazione di eventuali prodotti di degradazione la cui tossicità non è nota. Le tossine inoltre possono essere intracellulari o extracellulari; questo complica ulteriormente le operazioni di potabilizzazione, in quanto la distruzione delle cellule durante il trattamento fisico (ad esempio miscelazione, sedimentazione e filtrazione) o il trattamento chimico (ad es., preossidazione e disinfezione) potrebbe portare ad una maggiore liberazione e accumulo di tali tossine nell'acqua (He *et al.*, 2016). Cianobatteri e microalghe e i metaboliti rilasciati interferiscono, quindi, con i sistemi di potabilizzazione incidendo fortemente sui costi di trattamento e sulla loro efficacia.

A livello internazionale molti paesi hanno focalizzato da tempo la propria attenzione sulle microcistine, un gruppo di metaboliti epatotossici ampiamente considerati come la più importante causa di possibili danni per la salute umana da cianobatteri su scala mondiale, adottando in molti casi come valori guida per l'acqua potabile dati relativi alla loro presenza e concentrazione.

Nel 2008 l'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS o WHO, dall'inglese World Health Organization) ha definito delle linee guida per la gestione delle acque potabili, che sono state successivamente inserite da molte nazioni nelle proprie legislazioni, indicando per la prima volta per le cianotossine un valore massimo consentito di microcistina-LR pari a 1,0 µg/L; tale valore è riferito alla somma di tutti i congeneri noti di microcistine considerati come equivalenti della MC-LR (WHO, 2008).

Il valore delle linee guida WHO per la microcistina consente di affermare che il consumo giornaliero per l'intero arco di vita di acqua potabile che contiene una concentrazione di 1,0 µg/L di tale sostanza non rappresenta un rischio sanitario apprezzabile.

Per l'anatossina, i dati tossicologici disponibili non sono sufficienti per calcolare una dose giornaliera tollerabile per l'acqua potabile da cui estrapolare un valore di linea guida specifico, così come per le altre cianotossine. Tuttavia, in base agli studi disponibili, è stato valutato che il valore guida di 1,0 µg/L per l'anatossina possa fornire comunque un margine di sicurezza per il consumo di acqua potabile di circa 3 ordini di grandezza.

Sulla base di questi valori soglia, è stato istituito un sistema di allerta per il monitoraggio delle acque destinate ad uso potabile definito *Alert Level Framework* (ALF), che prevede diversi livelli di intervento oltre alle procedure standard di accertamento della qualità dell'acqua, riassunti in tabella 2.

Base decisionale	Definizione della soglia e rischio configurabile ¹	Azioni raccomandate	Provvedimenti ed eventuali limitazioni d'uso ²
0 Livello di rivelazione			
Rivelazione della presenza di cianobatteri potenzialmente tossici nel corso del monitoraggio ^{3,4}	Specie potenzialmente tossiche ^{4,6} : 500-2.500 cell/mL <i>oppure</i> Clorofilla cianobatterica: 1-2,5 µg/L <i>Rivelazione di cianobatteri a ridotte concentrazioni, non configurabili rischi sanitari immediati.</i>	Intensificare ispezione visiva sull'invaso. Implementare monitoraggio regolare almeno su base quindicinale del conteggio algale o clorofilla cianobatterica ^{9,11,12}	-
1 Livello di allerta			
Allerta per possibile rischio sanitario: conteggio algale associato a potenziale presenza di cianotossine nelle acque da destinare al consumo (prima della filiera di potabilizzazione) a livelli pari al valore massimo ammissibile ^{7,8}	<i>P. rubescens</i> : 2.500 cell/mL ^{4,6} <i>oppure</i> Altre specie tossiche: 5.000 cell/mL ^{4,6} <i>Insediamiento e sviluppo della popolazione di cianobatteri nel corpo idrico tale da configurare in condizioni di peggiore scenario' un potenziale di produzione di tossina nelle acque da destinare a consumo a concentrazioni nell'intorno del valore massimo ammissibile (1,0 µg/L MC-LR²)</i>	Notifica ad autorità sanitaria locale in circostanze dove i fenomeni non sono ricorrenti/sistematici e adeguatamente gestiti, a conoscenza dell'autorità sanitaria ⁹ . Implementare monitoraggio regolare su base quindicinale o, preferibilmente, settimanale mediante conteggio algale ^{9,11,12} almeno sulle acque in entrata e uscita dall'impianto. Se il livello di protezione del sistema è considerato inadeguato ⁹ implementare analisi settimanale di cianotossine nelle acque in entrata e, se necessario, in uscita dall'impianto e/o in distribuzione ¹³ . Ottimizzare per quanto possibile le misure di mitigazione nella filiera di potabilizzazione ^{9,14} . Assicurare un'adeguata clorazione ¹⁵	Limitazioni d'uso ² in seguito a riscontro di concentrazioni di tossine superiori ai valori massimi ammissibili nelle acque in distribuzione ^{8,13}
2 Livello di allerta elevato			
Allerta elevato per possibile rischio sanitario: conteggio algale associato a potenziale presenza di cianotossine nelle acque da destinare al consumo (prima della filiera di potabilizzazione) a livelli pari a 10x del massimo ammissibile ^{7,8} nelle acque destinate al consumo umano	<i>P. rubescens</i> : 25.000 cell/mL ^{4,6} <i>oppure</i> Altre specie tossiche: 50.000 cell/mL ^{4,6} <i>Insediamiento e sviluppo della popolazione di cianobatteri nel corpo idrico tale da configurare in condizioni di peggiore scenario' un potenziale di produzione di tossine nelle acque da destinare a consumo a concentrazioni nell'intorno di 10x il valore riferimento massimo ammissibile (1,0 µg/L MC-LR²). Misure di prevenzione e trattamento adeguate devono essere implementate per mitigare i rischi, altrimenti sono richiesti provvedimenti di limitazioni d'uso e implementazione di piani di risposta all'emergenza¹⁶ e adeguata informazione e comunicazione¹⁷</i>	Notifica ad autorità sanitaria ⁵ . Monitoraggio regolare settimanale o preferibilmente bisettimanale mediante conteggio algale ^{9,11,12} . Determinazione cianotossine frequenza settimanale o preferibilmente bisettimanale ¹¹ su acque in entrata, in uscita dal potabilizzatore e in distribuzione ^{9,10,11,12,13} . Ottimizzare e/o potenziare le misure di mitigazione nella filiera di potabilizzazione ^{9,14} . Assicurare un'adeguata clorazione ¹⁵ . Predisposizione dei piani di emergenza ¹⁶ informazione e comunicazione ¹⁷	Limitazioni d'uso ² in seguito a riscontro di concentrazioni di tossine superiori ai valori massimi ammissibili nelle acque in distribuzione ^{8,13}

Tabella 2. Schema riassuntivo dei livelli di rischio e della loro gestione adottati nel sistema di sorveglianza.

Inizialmente si ha un livello di rivelazione 0, in cui viene segnalata la presenza di cianobatteri nel corpo idrico; il programma di sorveglianza resta immutato fino a quando i cianobatteri non superano una densità cellulare di 2500 cell/mL, in queste condizioni infatti non sussiste alcun rischio sanitario. Si passa successivamente ad un livello di allerta 1 che si attiva quando i cianobatteri superano il valore limite di 2500 cell/mL, in tal caso è richiesto

l'accertamento e la quantificazione delle tossine nell'acqua grezza; qualora venga accertata la presenza di cianotossine devono essere attivati tutta una serie di processi di potabilizzazione dell'acqua idonei per la loro eliminazione. Infine si passa ad un livello di allerta 2 che si attiva durante una fioritura di cianobatteri con densità cellulari superiori a 100000 cell/ml e possibile formazione di schiume e che può rappresentare un reale rischio per la salute umana. In questo caso gli organi competenti hanno l'obbligo, oltre a trattare le acque per l'eliminazione di cianobatteri e cianotossine, di predisporre dei piani di emergenza e cercare fonti idriche di approvvigionamento alternative (Rapporto ISTISAN 11-35 Pt.2).

3.1 Tecniche d'indagine per la determinazione delle cianotossine

In un campione naturale contenente cianobatteri potenzialmente dannosi le cianotossine eventualmente presenti si dividono in intra e extracellulari; infatti una parte di queste tossine è di norma disciolta nella soluzione acquosa a causa del rilascio da parte dell'organismo, mentre un'altra parte è contenuta nelle cellule e può essere liberata solo in seguito alla lisi cellulare. Per determinare la concentrazione delle cianotossine totali è necessario pertanto, lisare le cellule prima di effettuarne l'analisi, la tecnica più appropriata consiste nel congelare e scongelare i campioni determinando una rottura meccanica della parete cellulare per shock termico e il rilascio nell'acqua delle tossine. Prima di procedere all'analisi delle tossine, i campioni devono essere sottoposti a procedure di conservazione ben precise volte a prevenire una eventuale degradazione microbica e fotochimica delle tossine. Le tecniche disponibili per l'indagine di composti tossici da cianobatteri sono molteplici e si possono dividere in metodi di screening e metodi analitici di conferma (tabella 3 e tabella 4).

Esempi di metodi per l'analisi di cianotossine in acque da destinare e destinate al consumo umano

Sistema di rivelazione scelto	LOD µg/L	P	Costo		Commenti	Rif.
			Str*	Per		
Saggi biologici generici						
Mouse bioassay ^S			B/M	M	Responso per classe tossica, non selettivo. Necessità di autorizzazioni, risvolti etici	52
<i>Artemia salina</i> bioassay ^S <i>Daphnia</i> bioassay ^S			B/M	M	Poco sensibile, non selettivo. Disponibili kit commerciali	3-7, 43
Microcistine e nodularine						
ELISA, policlonale ^S	0,8-2,5	-	A	B	Sensibile. Rapido Risposta per tutte le MC espressa in equivalenti di MCLR. Reattività dei congeneri può variare.	10, 15, 53
ELISA, monoclonale ^S	0,1	-	A	B	Molto sensibile. Rapido Risposta per tutte le MC espressa in equivalenti di MCLR. Reattività dei congeneri può variare.	10, 15, 54
Inibizione della protein fosfatasi, radioattivo ^S	0,1	-	M	B	Sensibile. Non selettivo. Richiede attrezzatura speciale	15
Inibizione della protein fosfatasi, spettrofotometrico ^S	0,1-2,5	-	M	B	Sensibile, non selettivo. Necessità di enzimi purificati	10, 15
LC-DAD ^C	0,25	SPE	B/M	M	Selettività in funzione della separazione cromatografica Necessità di standard esterni per quantitativa	10
LC-MS/MS ^C	0,002-0,017	SPE	B/M	A	Alta sensibilità e selettività per le diverse varianti. Necessità di standard esterni per quantitativa	10, 18, 25, 45

segue

Tabella 3. Saggi biologici e biochimici per l'analisi delle MC e NOD (Rapporto ISTISAN 11-35 Pt. 1).

Sistema di rivelazione scelto	LOD µg/L	P	Costo		Commenti	Rif.
			Str*	Per		
ANA-a e analoghi strutturali						
LC-DAD ^C	0,05	SPE	B/M	M	Necessità di standard esterni per quantitativa	28
LC-FLD ^C	0,01	SPE	B/M	M	Alta selettività nei confronti di interferenti** Necessità di derivatizzazione Necessità di standard esterni per quantitativa	32
LC-MS/MS ^C	0,008-0,2	- /SP E	B	M/A	Alta sensibilità. Alta selettività nei confronti di interferenti* Necessità di standard esterni per quantitativa	17, 27, 28
					Analisi diretta, rapido	17
Cilindropermopsina e analoghi strutturali						
ELISA, policlonale ^S	0,04	-	A	B	Sensibile. Possibile risposta per analoghi strutturali o coniugati.	9
LC-MS/MS ^C	0,3	-	B	A	Alta sensibilità e selettività. Analisi diretta, rapido Necessità di standard esterni per quantitativa	18

^S metodo di screening; ^C metodo di conferma; LC cromatografia liquida; MS/MS spettrometria di massa tandem;
DAD Photodiode Array Detector; FLD Fluorimetric Detector;
P Preparazione del campione; SPE Solid Phase Extraction
Str Strumentazione; Per Personale
B basso; M medio; A alto;
* per costi strumentazione si intende la somma del capitale iniziale e del materiale consumabile necessario
** Caso della fenitlanina

Tabella 4. Saggi biologici e biochimici per l'analisi del ANA e CYD (Rapporto ISTISAN 11-35 Pt.1).

3.1.1 Metodi di screening

I metodi di screening consentono di individuare precocemente la presenza di cianotossine nell'acqua; questi metodi sono caratterizzati dalla semplicità nell'esecuzione e dalla possibilità di analizzare velocemente e a basso costo un gran numero di campioni: comprendono metodi biologici, immunologici e biochimici. Si tratta di metodi qualitativi e/o semiquantitativi che non necessitano l'utilizzo di standard analitici esterni. Alcuni di questi test sono in grado di identificare la classe chimica delle tossine, ma non specificatamente il singolo composto.

Saggi in vivo

Si tratta di saggi biologici che si avvalgono di vertebrati (biosaggio sul topo o *Mouse Bioassay*, MBA) e invertebrati (come gli organismi *Artemia salina* e *Daphnia* spp.) che permettono di misurare la tossicità totale del campione attraverso uno studio dei sintomi o della morte degli organismi. Il MBA è usato come routine per i campioni incogniti, in quanto identifica la presenza delle tossine in risposta alla loro tossicità e non alla specifica famiglia chimica di appartenenza; il test prevede la somministrazione per iniezione intraperitoneale di un estratto contenente le tossine e la successiva osservazione per un tempo variabile da 60 min a 24 h. Qualora non vengano osservati sintomi evidenti in questo lasso di tempo il test è considerato negativo e il campione analizzato non presenta composti tossici. Il biosaggio sul topo presenta una serie di svantaggi, legati in particolare alla bassa sensibilità e specificità in quanto non discrimina fra le diverse cianotossine presenti. Il tempo di indagine relativamente ridotto non mostra gli eventuali effetti ritardati che possono essere dati da alcune tossine. Inoltre ci sono molte controversie di tipo etico legate all'impiego di mammiferi da laboratorio per i test di tossicità. In alternativa si può ricorrere talvolta ai test su invertebrati, di norma effettuato su diverse diluizioni del campione con un tempo di indagine di 18-24 h. I risultati vengono poi espressi come *Lethal Concentration* al 50% (LC_{50}), ma presentano gli stessi problemi di aspecificità del MBA. Va inoltre considerato che l'impiego di crostacei per i test eco-tossicologici rende difficile definire i rischi relativi all'esposizione sui mammiferi. In più l'organismo target ha una sensibilità diversa alle diverse cianotossine ed alla matrice in cui sono contenute, influenzando così il test.

Metodi immunoenzimatici ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*)

Questi metodi sono stati sviluppati in particolare per la classe delle microcistine (MC) e si dividono in test per competizione diretta, tramite anticorpi policlonali oppure competizione indiretta, con anticorpi monoclonali.

Nella competizione diretta, gli anticorpi policlonali anti-MC sono legati ad un supporto solido e viene usato un complesso MC-LR-perossidasi come competitore rispetto alla tossina libera (figura 14).

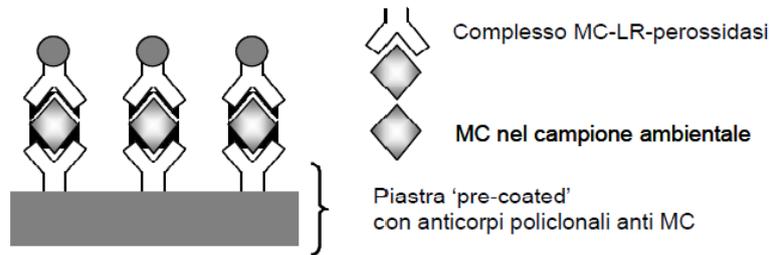


Figura 14. Metodo ELISA per competizione diretta(Rapporto ISTISAN 08/6).

Nella competizione indiretta invece sul supporto solido è immobilizzato un complesso proteico, la BSA a cui è legata la MC-LR (figura 15). L'anticorpo primario si lega sia alla MC libera che a quella con il complesso proteico adesa al supporto; il secondo anticorpo permette la rivelazione della tossina mediante legame con l'anticorpo primario.

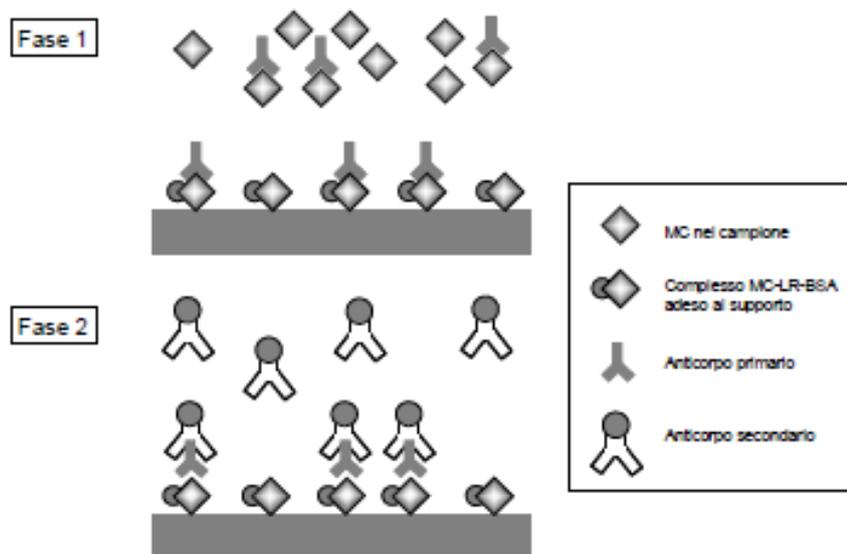


Figura 15. Metodo ELISA per competizione indiretta (Rapporto ISTISAN 08/6).

I due metodi forniscono risultati molto simili, ma il metodo indiretto mostra maggiore sensibilità; in entrambi i casi occorre ricordare che la rivelazione delle tossine avviene mediante lettura allo spettrofotometro e l'affidabilità e la sensibilità di un test ELISA dipendono essenzialmente dalla natura dell'anticorpo e dalla sua *cross*-reattività con i vari congeneri di MC; una scarsa *cross*-reattività dell'anticorpo, che si ottiene con anticorpi monoclonali molto specifici, può fornire informazioni accurate ma per effettuare uno screening preliminare è più vantaggiosa una *cross*-reattività elevata.

Metodi biochimici

La conoscenza dei meccanismi di azione delle cianotossine nei confronti dell'organismo ha permesso di sviluppare test biochimici diagnostici che permettono una quantificazione delle stesse. Nel caso ad esempio delle MC, trattandosi di molecole che agiscono come potenti inibitori naturali delle protein-fosfatasi (serina/treonina) PP1 e PP2A (Yoshizawa *et al.*, 1991), è possibile misurare la presenza delle MC in base all'inibizione della suddetta attività enzimatica.

3.1.2 Metodi analitici di conferma

I metodi analitici di conferma, invece basano l'identificazione delle tossine sulle loro proprietà chimico-fisiche quali peso molecolare, presenza di gruppi cromofori o funzionali in grado di dare reazioni specifiche.

I metodi chimico-fisici, se sufficientemente selettivi, possono permettere la contemporanea analisi di MC, CYN e anatoossina-a (ANA-a) e composti di degradazione e/o analoghi strutturali di interesse tossicologico, come la omo-anatoossina, la diidro- ed epossianatoossina.

La cromatografia liquida ad alta prestazione (HPLC) accoppiata a rivelatori spettrofotometrici, amperometrici o a spettrometria di massa è il sistema di elezione per la determinazione chimica delle cianotossine. Queste metodiche sono molto precise e sensibili e danno una determinazione quantitativa delle singole tossine ma necessitano di strumentazioni complesse e l'utilizzo di standard esterni che sono generalmente molto costosi e di difficile reperibilità.

Per la determinazione delle MC nelle acque da destinare al consumo umano incluse le acque di sorgente, di piscina e quelle utilizzate per la produzione di acque per dialisi, la metodica analitica più usata è basata sull'accoppiamento cromatografia liquida a fase inversa-spettrometria di massa (LC-MS) e permette di identificare tutta una serie di composti quali: Dem-MC-RR, MC-RR, MC-YR, Dem-MC-LR, MC-LR, MC-LA, MC-LY, MC-LF, MC-LW. Il limite di rivelabilità di questa metodica è compreso nell'intervallo 0,002-0,025 µg/L.

3.2 Trattamenti utilizzati nei processi di potabilizzazione per eliminare le cianotossine

Nel caso in cui, nonostante l'adozione di misure preventive e di controllo, si verifichi una fioritura algale potenzialmente tossica, è necessario attuare un adeguato piano per l'eliminazione delle tossine. La strategia può prevedere sia l'utilizzo di fonti d'approvvigionamento alternative non contaminate da cianobatteri che l'attuazione di trattamenti in grado di rimuoverli dalla fonte inquinata. Poiché le tossine intracellulari possono essere rilasciate in acqua nel caso in cui la parete cellulare subisca danni, e dal momento che la tossina disciolta non viene facilmente rimossa dai trattamenti convenzionali di potabilizzazione, è preferibile impiegare metodi che rimuovono le cellule intatte senza causarne possibilmente la rottura (Chow *et al.*, 1999; Newcombe & Nicholson, 2004).

Nella tabella 5 sono riportati i trattamenti effettuati sulle acque grezze e il loro effetto sui cianobatteri e sui diversi tipi di cianotossine:

Trattamenti	Efficacia relativa nella rimozione di				
	C	MC	S	CYN	ANA-a
Coagulazione e flocculazione	+	-	-	-	-
Flottazione	++	-	-	-	-
Microstacciatura	++	-	-	-	-
Filtrazione lenta:					
<i>attraverso la sponda di un fiume</i>	+++	+	+	+	+
<i>su sabbia</i>	+++	+	-	-	-
Microfiltrazione	++	-	-	-	-
Ultrafiltrazione	+++	-	-	-	-
Nanofiltrazione	N/A	++	++	++	++
Osmosi inversa	N/A	+++	+++	+++	+++
PAC	N/A	++++	++++	++++	++++
GAC	N/A	++++	++++	++++	++++
Clorazione	++	+++	++	+++	-
Disinfezione con:					
<i>monoclorammina</i>	-	-	-	-	-
<i>biossido di cloro</i>	-	-	-	-	-
<i>perossido di idrogeno</i>	-	-	-	-	-
<i>permanganato di potassio</i>	-	+	+	+	+
Ozonizzazione	++	+++	+	+++	+++
Irraggiamento UV	-	-	-	-	-
Trattamenti biologici	+	+	+	+	+

C: cianobatteri; MC: microcistine; S: saxitossine; CYN: cilindropermopsina; ANA-a: anatoxina A
 - Inefficace, + poco efficace, ++ moderatamente efficace, +++ efficace, ++++ molto efficace; N/A: non applicabile

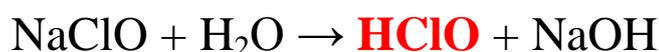
Tabella 5: trattamenti per l'eliminazione delle cianotossine (Rapporto ISTISAN 11-35. Pt 1).

I vari metodi di filtrazione (microstacciatura, filtrazione lenta, micro- e ultrafiltrazione) risultano efficaci nel rimuovere le cellule dei cianobatteri, in quanto generalmente le dimensioni delle cellule e delle colonie filamentose sono maggiori di 1 µm. Tali metodi però sono inefficaci nella rimozione delle eventuali cianotossine presenti in acqua e possono

comunque causare la rottura delle cellule contribuendo ad un incremento delle tossine libere (Han *et al.*, 2012; Şengül *et al.*, 2018).

Nei processi di potabilizzazione sono quindi impiegati una serie di trattamenti (chimico-fisici, chimici e biologici) che hanno il fine di eliminare anche la porzione di tossine extracellulari e quelle eventualmente liberate durante la lisi. Ciò avviene principalmente attraverso l'impiego di composti chimici ossidanti. Fra i principali ossidanti, molti sono composti clorurati come ipoclorito di sodio (NaClO) e biossido di cloro (ClO₂), ma anche altri come l'ozono (O₃) possono essere comunemente utilizzati.

L'aggiunta di NaClO all'acqua determina la formazione di acido ipocloroso (HClO):



A sua volta, l'acido ipocloroso in soluzione acquosa si dissocia nell'anione ipoclorito (ClO⁻):



Sia l'acido ipocloroso che lo ione ipoclorito agiscono come agenti ossidanti della materia organica e sono efficaci nella disinfezione di alghe, batteri, virus, funghi e loro metaboliti organici come le cianotossine; in particolare l'acido ipocloroso ha un potere ossidante molto maggiore rispetto all'ipoclorito (Nicholson *et al.*, 1994). L'equilibrio in soluzione acquosa delle due specie chimiche (HClO/ClO⁻) è determinato dalla temperatura e in particolare dal pH: l'acido HClO è favorito da valori di pH < 8, mentre lo ione ClO⁻ tende a formarsi prevalentemente a pH superiori. Ad alti valori di pH la materia organica naturalmente presente nell'acqua può anch'essa reagire con l'acido HClO consumandolo rapidamente e riducendo l'efficacia del trattamento ossidante nei confronti delle cianotossine. Questa reazione può inoltre determinare la formazione di sottoprodotti indesiderati e dannosi per la salute umana come i trialometani (THMs) (Acero *et al.*, 2008). Pertanto l'impiego di NaClO per la disinfezione è efficace ma alle appropriate condizioni del corpo idrico, in particolare con poca materia organica disciolta e con valori di pH intermedi. Il ClO₂ è altrettanto utilizzato, in quanto gas altamente solubile in acqua e con potere ossidante maggiore rispetto al cloro (Cl₂), risultando meno corrosivo e in generale più efficace; inoltre, a differenza del Cl₂ ma anche dell'NaClO, l'impiego di ClO₂ evita la formazione dei sottoprodotti indesiderati come i THMs (Hua *et al.*, 2007). Per questi motivi il ClO₂ ha ormai ampiamente sostituito il Cl₂ nei trattamenti di potabilizzazione delle acque destinate al consumo umano (Gordon & Rosenblatt, 2005). Il meccanismo di azione in soluzione acquosa del ClO₂ è

diverso da quello del NaClO, questo perché in acqua tende a restare in soluzione come gas disciolto senza reagire con le molecole d'acqua. Tuttavia a pH alcalini può reagire con l'ione idrossile (OH⁻), formando ione clorito (ClO₂⁻) e ipoclorato (ClO₃⁻); questo porta ad una riduzione della concentrazione di ClO₂ in acqua, che risulta quindi meno disponibile per la reazione con le cianotossine (Kull *et al.*, 2004). Il ClO₂ agisce come un buon battericida, virucida, sporicida e algicida ed è ampiamente utilizzato per la disinfezione delle acque e per inibire la crescita delle alghe. Tuttavia alle concentrazioni normalmente impiegate durante i trattamenti di potabilizzazione dell'acqua risulta inefficace nell'eliminare le principali tossine algali (Rodríguez *et al.*, 2007). Infine, al contrario dell'NaClO che è spesso disponibile in commercio in soluzione concentrata al 5%, il ClO₂ è un gas altamente instabile che richiede di essere preparato *in situ* al momento dell'uso (Gordon & Rosenblatt, 2005).

Un'altra forma di ossidazione comunemente impiegata nel trattamento delle acque è l'ozonizzazione. L'ozono (O₃) è un ossidante estremamente reattivo, molto efficace in ambienti con un pH > 8, in cui si decompone spontaneamente formando radicali idrossilici estremamente reattivi. Le MC sono molto suscettibili all'azione prodotta dal trattamento, ad esempio si è visto che mantenendo una concentrazione residua di 0.3 mg/L di O₃ per 5 min a contatto con acqua contenente MC, si ottiene un abbattimento della loro concentrazione fino a valori inferiori al limite di rilevabilità cromatografico (Rapporto ISTISAN, 11/35, Pt. 1).

Altre metodiche prevedono la disinfezione tramite perossido di idrogeno (H₂O₂), un prodotto poco efficace se impiegato da solo, e quindi spesso associato ad un trattamento con l'ozono o a un irraggiamento UV. D'altro canto, l'impiego dell'irraggiamento UV da solo permette di degradare le MC-LR e la CYN tuttavia a dosaggi troppo elevati, è pertanto impiegato tendenzialmente assieme ad altri composti ossidanti.

Per concludere, rimangono da considerare i trattamenti biologici come i fanghi attivi; le tossine più sensibili a tali trattamenti sono le MC e la CYN. Spesso i trattamenti biologici sono associati ai filtri a carbone attivo in quanto un sistema di filtraggio lento garantisce il tempo necessario per l'eliminazione delle tossine biodegradabili.

L'adsorbimento con i carboni attivi viene di norma effettuato per la fase di raffinazione nei processi di depurazione in quanto permette di eliminare dall'acqua sostanze microinquinanti organiche ed inorganiche (es. metalli pesanti, insetticidi e altri fitofarmaci, clorammine, trialometani ecc.) che possono dare origine ad alterazione dell'odore e del sapore; è fondamentale inoltre per assicurarsi che le eventuali cianotossine libere e i loro prodotti di degradazione a seguito dei trattamenti ossidanti vengano rimosse (Ho *et al.*, 2011).

4. SCOPO DELLA TESI

Negli ultimi decenni, si è assistito all'aumento dei fenomeni delle fioriture di microalghe e di cianobatteri. Queste fioriture si verificano sia in acqua dolce che in acqua salata e possono risultare dannose sia per l'ambiente che per la salute umana. Alcuni cianobatteri sono in grado di produrre composti altamente tossici denominati cianotossine in grado di arrivare all'uomo principalmente tramite l'ingestione di acqua contaminata. A livello internazionale molti paesi hanno focalizzato da tempo la propria attenzione su un gruppo di cianotossine denominate microcistine (MC), potenti molecole epatotossiche che agiscono inibendo l'attività delle fosfatasi PP1 e PP2A. L'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) ha definito un valore limite di legge per questi composti pari a 1,0 µg/L, tale da rendere sicura l'assunzione delle acque potabili; questo limite è stato adottato da molti Paesi UE fra cui l'Italia. Gli organi competenti la qualità dell'acqua hanno pertanto messo in atto una serie di procedimenti volti da un lato al monitoraggio delle specie di cianobatteri tossici e dall'altro al potenziamento dei trattamenti da effettuare nei processi di potabilizzazione delle acque per eliminare le cianotossine.

In questo contesto di miglioramento dei sistemi di potabilizzazione si inserisce il mio lavoro di tesi. L'obiettivo è stato quello di valutare l'effetto di due fra i principali composti ossidanti normalmente utilizzati nei processi di potabilizzazione, l'ipoclorito di sodio (NaClO) e il biossido di cloro (ClO₂), impiegati a diverse concentrazioni per eliminare le cianotossine prodotte da un ceppo tossico in coltura del cianobatterio *Microcystis aeruginosa*. Lo studio è stato svolto in collaborazione con Romagna Acque Società delle Fonti, un'azienda che gestisce gli impianti di potabilizzazione situati nell'area romagnola.

L'esperimento è stato diviso in tre fasi:

- Una fase iniziale in cui è stata valutata la crescita, l'efficienza fotosintetica e il profilo tossicologico di un ceppo di *M. aeruginosa* mantenuto in colture *batch*;
- Nella seconda fase è stato determinato l'effetto prodotto dall'NaClO e dal ClO₂ sull'efficienza fotosintetica del cianobatterio, come misura indiretta di un danno cellulare; a questo scopo è stato utilizzato un ampio intervallo di concentrazioni per entrambi gli ossidanti, per stabilire quale fra queste portasse al 50% dell'inibizione dell'efficienza fotosintetica (EC50);

- Nella terza fase è stato studiato l'effetto degli ossidanti NaClO e ClO₂ a due diverse concentrazioni, bassa 0,5 mg/L e alta 2,0 mg/L, sulle microcistine prodotte e rilasciate da *M. aeruginosa* dopo 1 ora di trattamento. I dosaggi degli ossidanti sono stati scelti poiché rappresentano le concentrazioni minime e massime usate normalmente negli impianti di depurazione. L'effetto di degradazione delle tossine è stato valutato sul campione totale e nel mezzo di crescita privato delle cellule per filtrazione (tossine extracellulari). Le analisi quali-quantitative delle microcistine sono state effettuate presso il Centro Ricerche Marine di Cesenatico.

5. MATERIALI E METODI

5.1. Allestimento delle colture di *Microcystis aeruginosa*

Le prove sperimentali riportate in questo studio sono state svolte sia presso il laboratorio di Biologia e Fisiologia delle Alghe dell'Università di Bologna, situato nel Campus di Ravenna (RA) dove sono state allestite le colture di *Microcystis aeruginosa*, sia presso il Centro Ricerche Marine (CRM) di Cesenatico dove è stata svolta l'analisi delle cianotossine.

5.1.1 Crescita di *Microcystis aeruginosa* in colture *batch*

Il ceppo di *M. aeruginosa* CCAP 1450/10 impiegato nello studio è stato acquistato presso il Culture Collection of Algae and Protozoa (CCAP) di Oban in Scozia. Le prove di crescita, svolte presso il Laboratorio di Biologia e Fisiologia delle Alghe dell'Università di Bologna, sono state effettuate allestendo colture in modalità *batch* utilizzando beute sterili dalla capacità di 1 L in condizioni controllate di temperatura (20 ± 2 °C) e illuminazione ($90-120 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$) con un fotoperiodo di 16:8 h (luce: buio). La modalità di coltura *batch* prevede che un inoculo di sospensione algale venga posto inizialmente in un volume costante di terreno di coltura senza ulteriori aggiunte di nutrienti nel tempo; in questo modo le cellule algali aumentano la loro biomassa e riducono sempre di più la quantità di nutrienti disponibile fino ad arrivare all'esaurimento di almeno uno dei componenti (fattore limitante). Seguendo nel tempo una coltura *batch* possiamo osservare diverse fasi:

1. **Fase di latenza o lag:** rappresenta la fase di adattamento dell'alga al terreno dopo l'inoculo;
2. **Fase esponenziale:** rappresenta la fase in cui l'alga non è limitata dalle condizioni di crescita, la crescita cellulare ha un andamento logaritmico;
3. **Fase stazionaria:** in cui le cellule raggiungono la crescita massima, durante questa fase la crescita rallenta in conseguenza all'esaurimento dei nutrienti, può durare alcune settimane;
4. **Fase di declino:** o di morte cellulare.

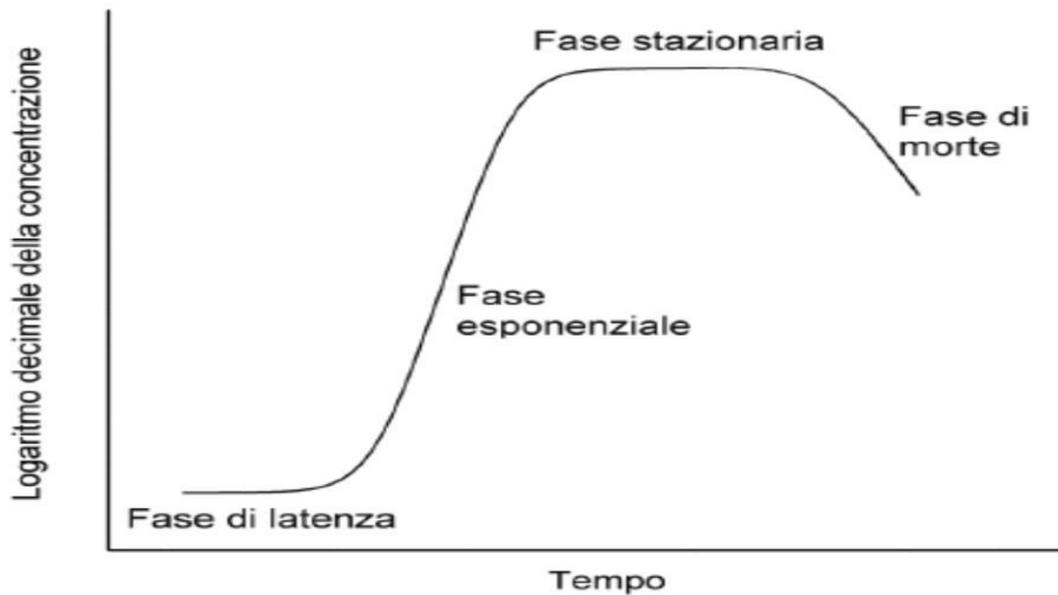


Figura 16. Grafico di crescita delle colture algali in condizioni stabili.

La crescita di *M. aeruginosa* è stata seguita impiegando il terreno di coltura Blue-Green Medium (BG11), la cui composizione è riportata nella tabella 6.

BG11 (Blue-Green Medium)

Freshwater algae and protozoa

Stocks		per 500ml
(1) NaNO ₃		75.0 g
		per 500 ml
(2) K ₂ HPO ₄		2.0 g
(3) MgSO ₄ ·7H ₂ O		3.75 g
(4) CaCl ₂ ·2H ₂ O		1.80 g
(5) Citric acid		0.30 g
(6) Ammonium ferric citrate green		0.30 g
(7) EDTANa ₂		0.05 g
(8) Na ₂ CO ₃		1.00 g
(9) Trace metal solution:		per litre
H ₃ BO ₃		2.86 g
MnCl ₂ ·4H ₂ O		1.81 g
ZnSO ₄ ·7H ₂ O		0.22 g
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O		0.39 g
CuSO ₄ ·5H ₂ O		0.08 g
Co(NO ₃) ₂ ·6H ₂ O		0.05 g
Medium		per litre
Stock solutions 1 - 8		10.0 ml each
Stock solution 9		1.0 ml

Tabella 6. Composizione del terreno utilizzato nelle colture *batch* di *M. aeruginosa*.

Giornalmente durante la sperimentazione, le beute sono state agitate delicatamente manualmente in modo da mantenere le cellule in sospensione e garantire così il giusto apporto di luce e di nutrienti. La coltura è stata seguita dall'inoculo fino all'inizio della fase di crescita stazionaria.

5.2. Valutazione della crescita e dell'efficienza fotosintetica

Le colture di *M. aeruginosa* sono state seguite per un periodo complessivo di 12 giorni, effettuando una serie di analisi necessarie per valutarne la crescita. Con cadenza giornaliera sono state analizzate sia la torbidità o assorbanza a 750 nm (*abs* a 750 nm) che il numero di cellule su unità di volume, mentre ad intervalli di due giorni è stata effettuata la misura dell'attività fotosintetica mediante l'utilizzo di un fluorimetro PAM, per valutare lo stato di salute della coltura.

5.2.1 Conta cellulare

Per valutare la variazione del numero di cellule nel tempo è stato effettuato un conteggio delle alghe in rapporto ad uno specifico volume di campione (cell/ml). Giornalmente, dopo aver agitato le colture per uniformare al meglio il campione, sono stati prelevati 5 ml di sospensione algale che sono stati posti in provette di plastica con alcune gocce di soluzione di Lugol (fissativo iodio-iodurato) per fissare le cellule. Un'aliquota da 1 ml di questa sospensione algale, opportunamente diluita, è stata posta in un pozzetto di sedimentazione e dopo un periodo di tempo adeguato per fare depositare le cellule, è stato effettuato il conteggio utilizzando un al microscopio ottico invertito (Zeiss Axiover S 100) con un ingrandimento 32x secondo il metodo di Uthermö. Dato l'elevato numero di cellule presenti nei campioni, il conteggio è stato effettuato utilizzando la metodica per campi, selezionati in maniera casuale. Dal valore medio delle cellule contate nei vari campi, moltiplicato per un fattore ($F = 1497$), ottenuto dal rapporto fra l'area del pozzetto e l'area del campo, e per l'opportuno fattore di diluizione, è stata ottenuto il numero di cellule presenti nell'aliquota di 1 ml esaminata. La determinazione del numero delle cellule presenti ha permesso di seguire la coltura nelle differenti fasi di crescita, il conteggio è infatti stato interrotto quando il numero di cellule è rimasto presso che costante nel tempo e la coltura è entrata in fase stazionaria.

5.2.2 Torbidità

L'analisi della torbidità della coltura è stata effettuata giornalmente attraverso la lettura spettrofotometrica dell'assorbanza ad una lunghezza d'onda (λ) di 750 nm: a questa lunghezza d'onda i pigmenti fotosintetici non assorbono e quindi la quantità di luce assorbita della sospensione algale è correlabile al numero di cellule presenti in sospensione. Quotidianamente dalla coltura madre dopo averla agitata per renderla omogenea, sono stati prelevati 5 ml di sospensione algale, una parte opportunamente diluita è poi stata inserita in una cuvetta di vetro dal cammino ottico di 1 cm; la lettura dell'assorbanza a 750 nm è stata effettuata utilizzando uno spettrofotometro a doppio raggio (Jasco V-650).

5.2.3 Misura dell'efficienza fotosintetica con fluorimetro PAM

Per valutare lo stato fisiologico delle colture di *M. Aeruginosa*, periodicamente ne è stata misurata l'efficienza fotosintetica. Nel processo fotosintetico i fotoni della sorgente luminosa che raggiungono cellule algali provviste di cloroplasti, colpiscono i complessi antenna o LHC (*Light-Harvesting Complex*) situati nella periferia dei fotosistemi. questi complessi pigmento-proteine eccitandosi e diventano instabili elettronicamente, l'energia in eccesso viene trasferita all'interno dei centri di reazione fotosintetica al primo accettore della catena di trasporto degli elettroni, il plastochinone Q_A che riducendosi avvia le reazioni fotochimiche. Non tutta l'energia in eccesso viene trasferita ai centri di reazione, una parte è dissipata sotto forma di calore o fluorescenza, proprio la variazione di quest'ultima è rilevata nell'analisi in fluorimetria PAM (*Pulse Amplitude Modulation*) fornendo così un'indicazione dell'efficienza fotosintetica (Maxwell & Johnson, 2000; Schreiber, 2004). L'analisi è stata svolta con fluorimetro PAM ad impulsi di ampiezza modulata (101 con PDA-100, Walz, software WinControl), uno strumento che consente di valutare nel complesso il processo di fotosintesi inviando impulsi luminosi alle cellule algali e sulla base della risposta ottenuta il metodo fornisce informazioni sul loro stato di salute. Per lo svolgimento dell'analisi si preleva un'aliquota di sospensione algale che viene posta al buio per un periodo di almeno 20 minuti, in questo modo i centri di reazione dei cloroplasti, si rendono il più possibile disponibili alla luce nel tentativo di acquisire i pochi fotoni presenti, un fenomeno noto come *effetto Kautsky* (Kautsky & Hirsch, 1931). Dalla sospensione algale adattata al buio sono prelevati 3 ml che vengono posti in una cuvetta in quarzo con cammino ottico di 1 cm, all'interno dello strumento. Nell'analisi fluorimetrica vengono impiegati due tipi di segnali luminosi, una luce di misura e una saturante, la loro intensità viene determinata attraverso una sonda a fibre ottiche che viene immersa nella cuvetta contenente il campione. Inizialmente

è prodotta una luce di misura BM (*measuring Beam*) in grado di indurre una variazione della fluorescenza senza innescare il processo fotochimico; è una luce modulata, accesa e spenta ad intermittenza individuando così il livello minimo di fluorescenza costante emesso dalle alghe (F_0) che indica che i centri di reazione risultano aperti. Successivamente lo strumento produce una luce saturante o SAT *pulse*, caratterizzata da un'elevata intensità pari a $3000 \mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$ di brevissima durata ($<1 \text{ s}$) in grado di saturare tutti i centri di reazione, in modo che questi risultino "chiusi" cioè incapaci di accettare altri elettroni da indirizzare alla reazione fotochimiche. Con il SAT *pulse* le cellule emettono la fluorescenza massima F_m e la differenza fra F_m e F_0 fornisce il valore di F_v (fluorescenza variabile). L'analisi fluorimetrica prosegue dopo il SAT *pulse* con l'accensione di luce attinica la quale è caratterizzata da uno spettro di lunghezze d'onda utili ad indurre la fotosintesi (PAR, *Photosynthetically Active Radiation*) e con un'intensità costante simile a quella alla quale erano sottoposte le cellule algali nella coltura. Nei primi secondi, immediatamente successivi all'impulso saturante, si registra però un aumento transitorio della fluorescenza, dovuto ad una fase latente precedente alla fissazione del carbonio. La fluorescenza cala nel tempo, fino al raggiungimento di un valore costante di fluorescenza definito F_t grazie alla progressiva ossidazione dei centri di reazione, attivando i processi fotochimici dalla luce attinica. Fornendo un secondo SAT *pulse* si instaura nuovamente un altro meccanismo di saturazione dei centri di reazione ottenendo un altro valore di fluorescenza massima, inferiore a quello ottenuto inizialmente dal campione adattato al buio (F'_m) riferito all'adattamento alla luce attinica. Tutti i valori ricavati dall'analisi sono usati per calcolare diversi parametri, in questo caso, il rendimento quantico massimo (*yield* massimo) e il rendimento quantico effettivo (*yield* effettivo). Lo *yield* massimo è la resa potenziale che si ha quando tutti i centri di reazione sono disponibili alla fotosintesi dopo l'adattamento al buio, calcolata con il rapporto:

$$(F_m - F_t) / F_m = F_v / F_m$$

Lo *yield* effettivo invece, quantifica la reale posizione di energia associata ai fotoni della radiazione luminosa impiegata dai centri di reazione del PSII nel processo fotochimico rispetto alla quantità totale di luce assorbita dal LHC, dando quindi una stima generica delle cellule attive fotosinteticamente e quindi in buono stato di salute e si ottiene dal rapporto:

$$(F'_m - F_t) / F'_m = F'_v / F'_m$$

Per ottenere una misura più accurata di quest'ultimo parametro sono state eseguite delle curve di induzione o *induction curve* (IC), un'analisi che in seguito all'acquisizione dello *yield* massimo sottopone il campione ad una serie di impulsi saturanti ad intervalli regolari in presenza di luce attinica costante, che consentono di ottenere una misura dello *yield* effettivo o efficienza fotosintetica dell'organismo.

5.3. Valutazione dell'effetto degli ossidanti sull'efficienza fotosintetica di *M. aeruginosa* mediante la determinazione dell'EC50

Nella prima parte sperimentale è stata effettuata la valutazione dell'effetto degli ossidanti (NaClO e ClO₂) su cellule di *M. aeruginosa*, attraverso l'inibizione dell'efficienza fotosintetica. Per calcolare l'EC50 (*Half maximal effective concentration*) è stato svolto uno *screening* preliminare, con un ampio intervallo di concentrazioni degli ossidanti, compreso fra 0,125 e 4,0 mg/L. Ciascuna prova della durata di un'ora è stata condotta con 6 diverse concentrazioni per ogni ossidante, le prove sono state effettuate in provette da 50 ml, con una concentrazione algale di 3,0·10⁵ cell/ml. Al termine del trattamento l'effetto degli ossidanti sui cianobatteri è stato valutato attraverso la misura dell'efficienza fotosintetica al buio (*yield* massimo) e alla luce (*yield* effettivo) rispetto ad un controllo, mediante fluorimetria PAM. Da questo primo test, è stato individuato un intervallo di concentrazione ridotto per ogni tipo di composto con cui sono state effettuate le prove definitive per determinare i valori di l'EC50: per il ClO₂ tali concentrazioni erano comprese tra 0,2-2,0 mg/L, mentre per l'NaClO, che ha mostrato un maggior effetto nel test preliminare, è stato impiegato un intervallo ridotto compreso fra 0,1-1,0 mg/L; tutte le prove sono state svolte in triplicato e per ogni composto sono state impiegate sei concentrazioni. I valori ottenuti dall'esperimento hanno quindi permesso di ottenere l'EC50 per ciascun ossidante. Questo parametro è stato calcolato applicando il modello matematico alle curve concentrazioni/risposta, di seguito riportato (Picherri *et al.*, 2016):

$$y = bot + \frac{(top - bot)}{(1 + (x/EC_{50})^c)}$$

I parametri dell'equazione sono stati calcolati usando la formula della regressione non lineare attraverso il software Statistica.

Le cellule di *M. aeruginosa* inoltre, dopo i trattamenti sono state osservate al microscopio ottico per valutare se il trattamento avesse determinato la lisi cellulare. Sono state inoltre allestite nuove colture per valutare la capacità di recupero del cianobatterio, prelevando da ogni trattamento, un'aliquota di 5 ml di sospensione algale, che è stata utilizzata per allestire in beute sterili da 25 ml, una nuova coltura con l'aggiunta del terreno BG11. Le colture sono state seguite per 8 giorni valutandone la crescita attraverso la misura della torbidità.

5.4. Effetto di composti ossidanti sulla degradazione delle microcistine

Dopo la valutazione dei risultati preliminari si è proceduto all'allestimento di un esperimento per la determinare gli effetti degli ossidanti (NaClO e ClO₂) sulla degradazione delle microcistine una coltura di *M. aeruginosa* mantenuta in fase di crescita esponenziale con una densità cellulare pari a $3,0 \cdot 10^5$ cell/ml, è stata utilizzata per allestire 5 prove in triplicato con i due ossidanti, ciascuno a due diverse concentrazioni con un periodo di esposizione di un'ora. L'esperimento è stato impostato in modo da garantire la ripetibilità dei dati e l'accuratezza dei tempi d'esposizione e delle concentrazioni; In tabella 5 è mostrato lo schema dei trattamenti effettuati.

Trattamento	Concentrazione ossidante (mg/L)
Controllo	0
NaClO	0,5
NaClO	2,0
ClO ₂	0,5
ClO ₂	2,0

Tabella 7. Elenco delle prove effettuate per valutare l'effetto degli ossidanti sulle cianotossine.

Al termine del trattamento sono state prelevate due aliquote da ciascuna beuta: la prima, destinata all'analisi delle microcistine totali è stata congelata a -20 °C la seconda per la valutazione delle tossine extracellulari è stata prima filtrata con filtri GF/F con porosità 0,7 µm in modo da eliminare le cellule e successivamente congelata. Il processo di congelamento è necessario per poter poi svolgere le analisi chimiche per la determinazione delle cianotossine.

5.5. Determinazione delle cianotossine

I campioni trattati e suddivisi in aliquote da 100 ml, sono stati consegnati al laboratorio chimico-biotossicologico del Centro ricerche marine di Cesenatico (CRM) per l'analisi delle microcistine. La procedura applicata per l'estrazione delle microcistine è quella riportata in Appendice A Rapporti ISTISAN (11/35 Pt.1).

Procedura estrattiva

I campioni dopo un primo ciclo di congelamento/scongelamento vengono filtrati su filtri con porosità 0,45 μm e sottoposti a un processo di estrazione in fase solida (SPE) utilizzando cartucce Oasis Hlb, costituite da materiali polimerici funzionalizzati con gruppi polari (HLB) (ISO 20179, 2005; Rapala *et al.*, 2002). La procedura prevede l'attivazione della fase stazionaria delle cartucce con metanolo e acqua, il caricamento dei campioni precedentemente filtrati (0,45 μm) attraverso la fase stazionaria delle SPE, seguito da una fase di lavaggio con metanolo al 20% e da una fase di eluizione con metanolo al 100%. Gli eluati così ottenuti vengono evaporati sotto flusso di azoto, in bagni termostatici a temperatura di 50 °C per un periodo di 40 minuti. L'estratto viene ripreso con 200 μL di metanolo al 50% e trasferito in vial adatti per analisi in LC-MS/MS.

Determinazione al LC-MS/MS

L'identificazione inequivocabile delle MC si ottiene solo con i rilevatori di massa. La spettrometria di massa è una tecnica analitica potente usata per identificare prodotti incogniti, per la determinazione quantitativa di composti noti e per chiarire le proprietà strutturali e chimiche delle molecole; lo spettro di massa è come un' impronta digitale della molecola in esame e quindi identifica la molecola in modo univoco. Lo spettrometro di massa non misura direttamente la massa molecolare, ma il rapporto fra massa/carica degli ioni che si formano dalla molecola in esame; la carica elettrica è una proprietà quantizzata. Il sistema è composto da diversi blocchi riportati nella figura 17.

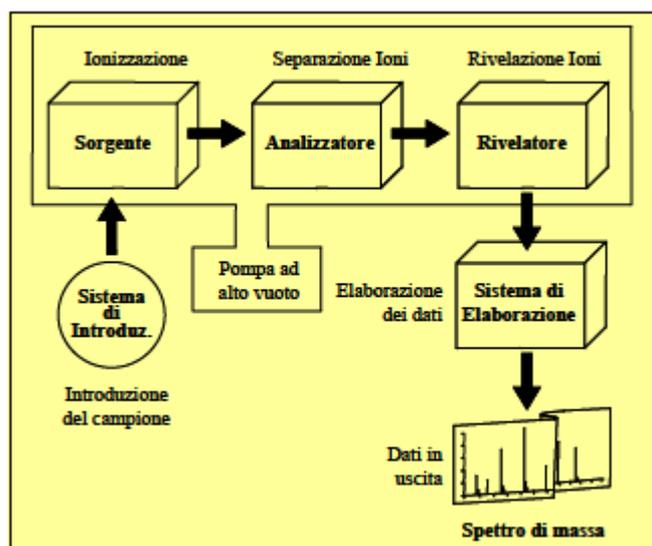


Figura 17. Schema di uno spettrometro di massa .

La formazione di ioni di campione in fase gassosa è un pre-requisito essenziale per i processi di separazione e di rilevazione tipici in uno spettrometro di massa. Il campione, che può essere solido, liquido o gassoso, è inserito in una camera da vuoto tramite un sistema apposito. Gli ioni prodotti sono quindi separati nell'analizzatore sulla base del loro rapporto massa/carica (m/z), tramite un sistema di settori magnetici che deviano le traiettorie degli ioni, che compiono percorsi circolari con un raggio variabile. Maggiore il rapporto m/z porta a traiettorie con raggio più ampio. I dati sono poi raccolti in un rivelatore ed elaborati.

5.6. Elaborazione statistica dei dati

Per valutare se i trattamenti con gli ossidanti abbiano determinato una riduzione significativa del contenuto totale ed extracellulare delle microcistine è stata applicata l'analisi della varianza ANOVA con un livello di confidenza del 95% ($p < 0,05$). Le analisi statistiche sono state svolte con il software PAST 3.0 (Hammer *et al.*, 2001), mentre i grafici sono stati elaborati con il software Microsoft Office Excel ©.

6. RISULTATI E DISCUSSIONE

6.1 Crescita e tossicità di *Microcystis aeruginosa* in colture *batch*

6.1.1 Valutazione della crescita

La crescita di *M. aeruginosa* è stata valutata attraverso le misure della torbidità e conta cellulare. In figura 18 è mostrata la curva di crescita ottenuta attraverso il conteggio delle cellule al microscopio ottico. Dal grafico è possibile osservare che la coltura entra in una fase di crescita più rallentata dopo circa 12-13 giorni, e il numero di cellule che si raggiungono in tale fase ($2,88 \cdot 10^6$ cell/ml al giorno 13) è paragonabile a quanto osservato in studi precedenti (Orr & Jones, 1998; Watanabe & Oishi, 1985). Il tasso di crescita invece da noi osservato pari a $0,186$ (giorni⁻¹) è risultato inferiore a quanto precedentemente riportato in altri lavori (Islam & Beardall, 2017), questo valore potrebbe essere una caratteristica del ceppo utilizzato, oppure dipendere dalle condizioni di coltura impiegate come luce, temperatura e apporto di nutrienti. Alcuni studi, hanno riportato inoltre, che la temperatura ottimale di crescita per *M. aeruginosa* è di circa 28-30 °C, e il massimo valore del tasso di crescita si osserva in questo intervallo (Reynolds, 2006); al contrario la tossicità risulta essere superiore a temperature più basse intorno a 20-25 °C (Watanabe & Oishi, 1985; van der Westhuizen & Eloff, 1985). Nelle prove da noi condotte poiché era necessario potenziare la produzione di tossine per cellula da parte del ceppo utilizzato, è stato scelto di effettuare le colture a 20 °C.

Curva di crescita di *M. aeruginosa*

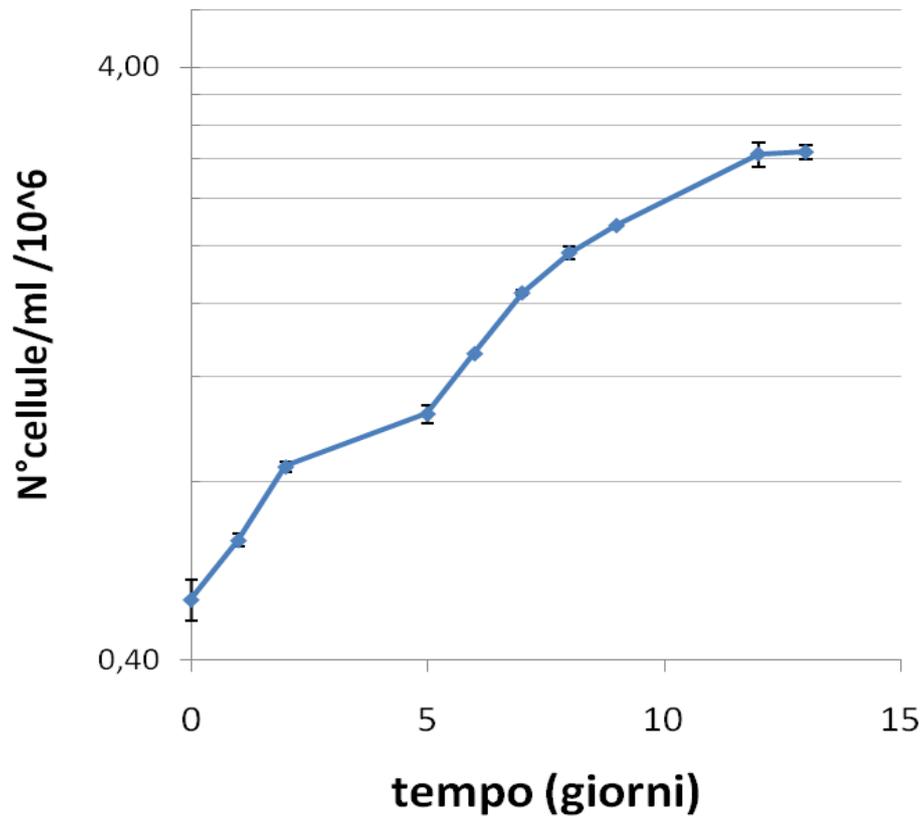


Figura 18. Curva di crescita di *M. aeruginosa* in coltura *batch* seguita fino al giorno 13.

Mettendo a confronto i dati ottenuti attraverso il conteggio con i valori di assorbanza a 750 nm (torbidità) è possibile osservare che esiste una relazione matematica lineare fra questi due parametri (figura 19).

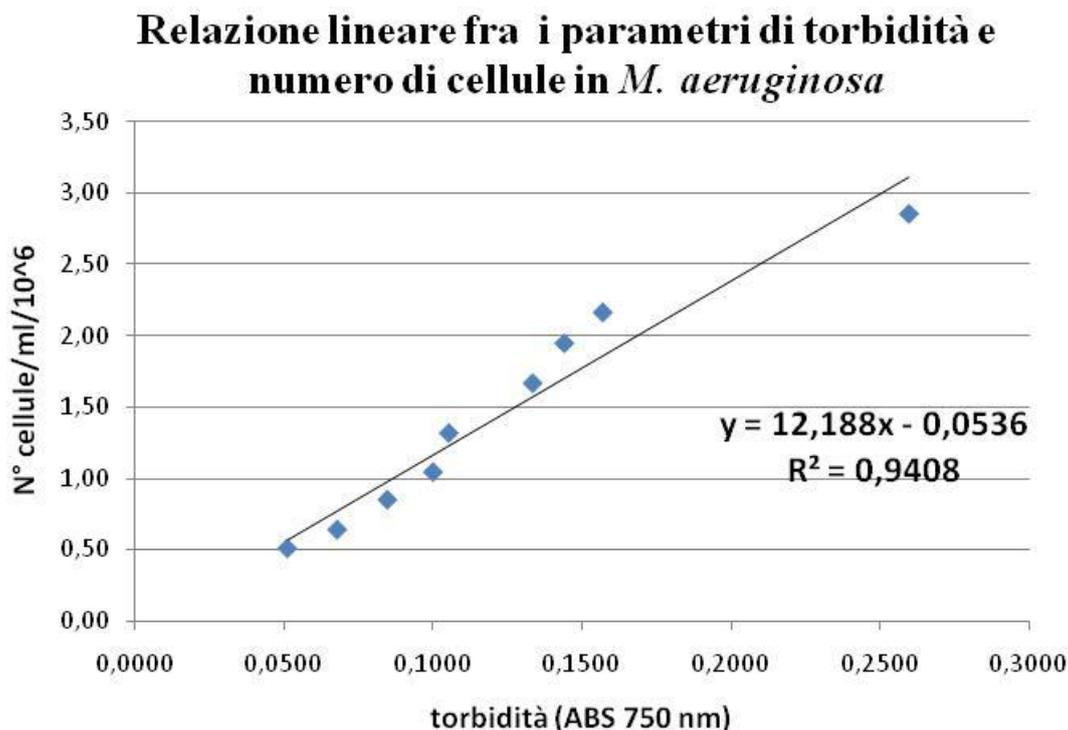


Figura 19. Relazione lineare fra il numero di cellule su ml e la torbidità in colture di *M.aeruginosa* .

Questa relazione ci ha permesso di estrapolare negli esperimenti condotti successivamente, il dato relativo al numero di cellule su unità di volume attraverso la misura della torbidità applicando la seguente equazione:

$$\mathbf{N. cell/mL = (12,188 \times Abs\ 750\ nm - 0,0536) \cdot 10^6}$$

È stato possibile utilizzare questa relazione nelle successive fasi dello studio solamente perché il ceppo di *M. aeruginosa* da noi impiegato, in coltura tende a formare micro colonie di 3-4 cellule al massimo, al contrario di quanto si osserva normalmente in natura; questa specie infatti forma colonie di grandi dimensioni che non permettono di effettuare un campionamento omogeneo, pertanto tale relazione in campo non sarebbe applicabile.

6.1.2 Determinazione del profilo tossicologico

Durante il periodo di valutazione della crescita, sono state svolte alcune analisi preliminari per determinare il profilo tossicologico di *M. aeruginosa*, la prima al giorno 5, in cui la coltura era in fase di crescita esponenziale, la seconda al giorno 13 in cui la coltura era in una fase di crescita rallentata e stava per entrare in fase stazionaria. I

risultati ottenuti sono mostrati nella tabella 8, si può osservare che il contenuto di MC totali per unità di volume è di 115,18 µg/L in fase esponenziale e raggiunge una concentrazione tre volte superiore al giorno 13 (344,80 µg/L); tuttavia se esprimiamo il contenuto di tossine per cellula, osserviamo che non c'è differenza fra i due momenti di campionamento. Questo dato è diverso da quanto osservato da Orr e Jones (1998) in cui è riportato che il contenuto di microcistine diminuisce di due o tre volte nel passaggio dalla fase esponenziale di crescita a quella stazionaria, in relazione al consumo di azoto da parte di *M. aeruginosa*. Nei nostri dati questa differenza non si osserva probabilmente perché al momento della raccolta della biomassa algale (giorno 13), la coltura non era ancora in fase stazionaria avanzata e le cellule non erano in condizione di limitazione da azoto. Osservando il profilo tossicologico quali-quantitativo completo (figura 20), è possibile notare come le concentrazioni dei diversi congeneri di microcistine varino in base alla specifica fase di crescita; ad esempio durante la fase esponenziale al giorno 5, la concentrazione espressa su cellula (µg/cell) di MC-LR, il congenere a più alta tossicità (Gupta *et al.*, 2003) e quella della sua forma demetilata (Dem-MC-LR) risultano maggiori del 20-30%, così come la forma MC-YR per il 60% rispetto a quanto osservato al giorno 13. Questo dato è in accordo con quanto osservato da Lee *et al.*, (2000) in cui viene riportata una maggiore concentrazione in termini di tossina su peso secco del cianobatterio (µg/g) dei congeneri MC-LR e MC-YR in fase esponenziale di crescita. Da questa distribuzione emerge che nonostante il contenuto totale di microcistine per cellula sia uguale in entrambi i momenti della raccolta, le cellule in fase esponenziale possono risultare più tossiche poiché predomina il congenere MC-LR.

Fase di crescita	Dem-MC-LR	Dem-MC-RR	MC-LF	MC-LR	MC-LW	MC-LY	MC-YR	MC totali
Quantità di tossina per unità di volume (µg/L)								
Esp	22,62	<LOQ	14,36	63,31	0,96	13,81	0,12	115,18
Staz	49,18	0,26	73,06	156,74	11,46	53,80	0,12	344,80
Quantità di tossina espressa su cellula (µg/cell·10⁻⁸)								
Esp	2,26	<LOQ	1,44	6,33	0,096	1,38	0,010	11,5
Staz	1,63	0,0086	2,43	5,21	0,381	1,79	0,004	11,4

Tabella 8. Concentrazione dei diversi congeneri di MC, espressa per unità di volume (µg/L) e su cellula (µg/cell); la dicitura <LOQ indica che il composto è presente in concentrazione al di sotto del limite di rilevanza.

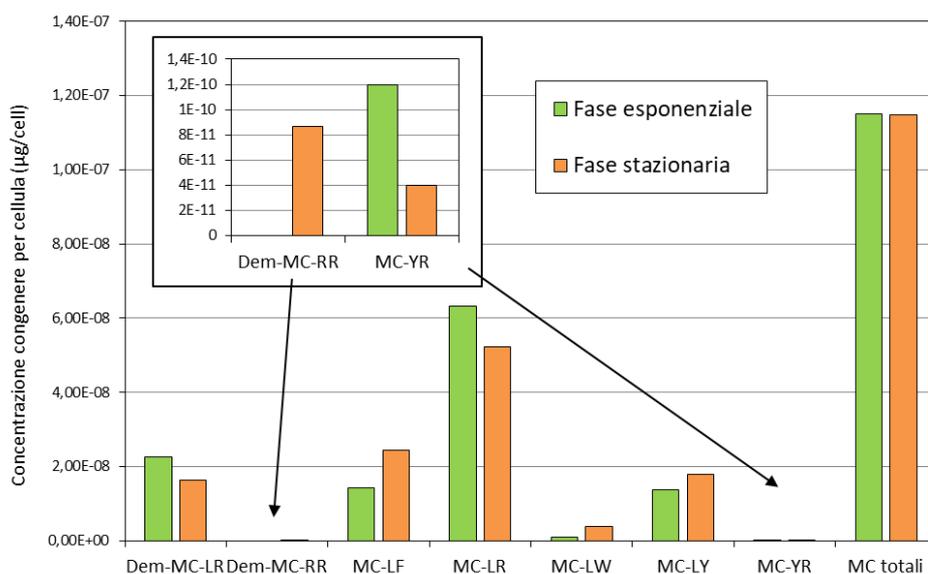


Figura 20. Concentrazione ($\mu\text{g}/\text{cell}$) dei diversi congeneri di microcistine in *M. aeruginosa* nei due momenti della raccolta.

6.1.3 Valutazione dello stato fisiologico delle cellule

La coltura è stata seguita per un totale di 13 giorni, nei quali è stata monitorata la risposta fotosintetica tramite il fluorimetro PAM misurando l'efficienza fotosintetica massima (*yield* al buio) e l'efficienza fotosintetica effettiva (*yield* alla luce). Attraverso l'esame della curva di induzione (figura 21) di *M. aeruginosa* in fase di crescita esponenziale, è stato possibile individuare i valori più alti di *yield* massimo ed effettivo: rispettivamente di $0,298 \pm 0,015$ e $0,279 \pm 0,012$. In letteratura sono riportati per i cianobatteri valori di *yield* massimo ed effettivo nel range di 0,3-0,4 (Gao *et al.*, 2007; Schuurmans *et al.*, 2015) in linea con quanto da noi osservato; in particolare Islam & Beardall (2017) hanno riportato per un ceppo tossico australiano di *M. aeruginosa* valori di *yield* massimo (al buio) vicini a 0,3-0,4 simili a quanto da noi osservato. Generalmente, alti valori di *yield* indicano che le cellule non si trovano in condizioni di stress e lo stato fisiologico risulta ottimale, tuttavia rispetto ad altre classi algali, come nelle cloroficee in cui si osservano valori di *yield* vicini a 0,7 (Young & Beardall, 2003) nei cianobatteri questi risultano tendenzialmente più bassi. Ciò è attribuito alla presenza dei ficobilisomi, i complessi proteici pigmentari tipici dei cianobatteri, che con la loro fluorescenza mascherano in parte quella associata al PSII dei tilacoidi, determinando una sottostima dell'efficienza fotosintetica mediante fluorimetria PAM (Schuurmans *et al.*, 2015). Nonostante ciò, l'impiego del PAM per una singola specie risulta comunque utile nel

rilevare condizioni di stress in maniera rapida e alcuni autori hanno utilizzato questa metodica per valutare l'effetto di trattamenti ossidanti sulle risposte fotosintetiche di *M. aeruginosa* (Zhou *et al.*, 2014). Nel nostro studio, dalla curva di induzione ottenuta per *M. aeruginosa* (figura 21), si può dire che la misura dello *yield* effettivo può essere ricavata già dopo pochi minuti dal primo impulso saturante; già partendo dal terzo impulso l'altezza dei picchi di fluorescenza risulta simile, indicando che le cellule necessitano di un tempo molto basso per rendere nuovamente disponibili i fotosistemi per il processo fotochimico.

Da queste osservazioni nelle prove condotte in seguito per valutare l'efficienza fotosintetica massima ed effettiva dopo i trattamenti con gli ossidanti, non è stato necessario effettuare le curve di induzione ma solamente la lettura dello *yield* al buio e dopo 5 minuti di illuminazione con luce actinica la lettura dello *yield* effettivo.

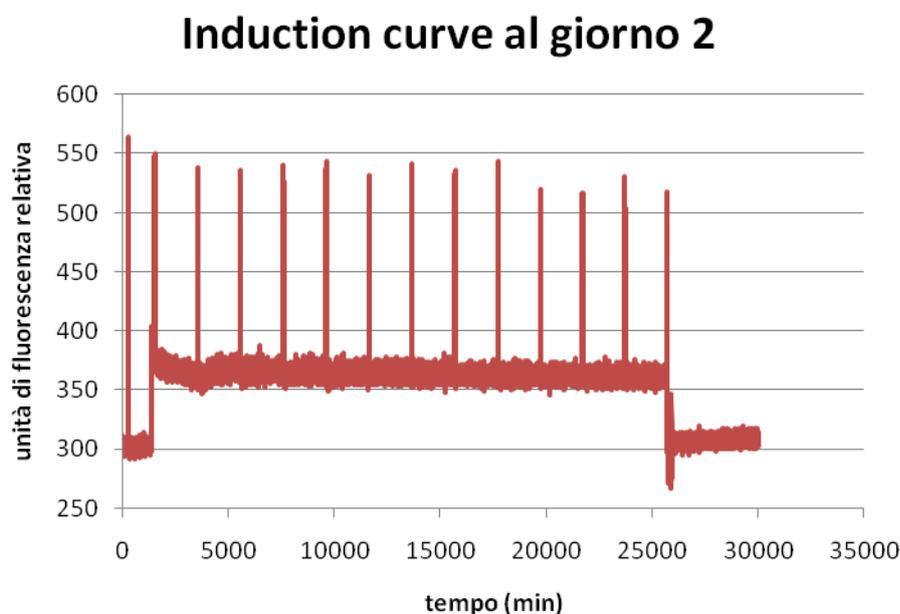


Figura 21. Curva di induzione rilevata in fase di crescita esponenziale di una coltura di *M. aeruginosa*, analizzata con l'ausilio del fluorimetro PAM.

6.2 Valutazione dell'effetto degli ossidanti sull'efficienza fotosintetica di *M. aeruginosa* e determinazione dell'EC50

Per valutare l'effetto prodotto su una coltura di *M. aeruginosa* dagli ossidanti NaClO e ClO₂ è stato scelto come parametro l'efficienza fotosintetica, intesa da un lato come misura di efficienza fotosintetica massima (*yield* al buio) che ci fornisce un'indicazione dell'integrità strutturale dei fotosistemi e dall'altro dell'efficienza fotosintetica effettiva (*yield* alla luce);

quest'ultima misura consente di valutare l'effettiva capacità del cianobatterio di acquisire fotoni dalla radiazione luminosa e di convertire l'energia associata nel processo fotochimico. La riduzione dello *yield* effettivo potrebbe indicare solamente uno stato temporaneo di stress per la cellula dovuto a variazioni chimico-fisiche dell'ambiente intra ed extra-cellulare; mentre una contemporanea riduzione dello *yield* massimo, evidenzia che il danno cellulare in questo caso potrebbe essere non reversibile con compromessa capacità fotosintetica. Come mostrato nella tabella 9, i risultati dello screening preliminare hanno evidenziato una prima differenza fra i due ossidanti, in quanto la concentrazione necessaria per inibire completamente l'efficienza fotosintetica è di 1,0 mg/L per il ClO₂, mentre per il NaClO è sufficiente una concentrazione di 0,5 mg/L. Questo primo dato evidenzia un maggior effetto sullo stato fisiologico delle cellule del NaClO rispetto al ClO₂.

NaClO			ClO ₂		
mg/L	<i>Yield</i> buio	<i>Yield</i> luce	mg/L	<i>Yield</i> buio	<i>Yield</i> luce
TQ	0,237	0,210	TQ	0,328	0,297
0,125	0,229	0,228	0,125	0,285	0,257
0,250	0,181	0,181	0,250	0,253	0,242
0,500	0,000	0,000	0,500	0,205	0,174
1,000	0,005	0,018	1,000	0,000	0,000
2,000	0,018	0,019	2,000	0,000	0,012
4,000	0,017	0,020	4,000	0,026	0,000

Tabella 9. Valori di *yield* massimi ed effettivi ottenuti in seguito al trattamento con i due ossidanti, in giallo sono evidenziate le concentrazioni che portano alla completa inibizione dell'efficienza fotosintetica.

Sulla base dei risultati ottenuti dallo screening preliminare, è stato ripetuto il test con un range di concentrazioni specifico per ciascun ossidante variabili fra 0,1-1,0 mg/L per l'NaClO e fra 0,2-2,0 mg/L per il ClO₂. I risultati ottenuti riportati nella figura 22, mostrano che l'efficienza fotosintetica viene inibita completamente dai due ossidanti, con concentrazioni molto diverse fra di loro: rispettivamente 0,4 mg/L per l'NaClO (figura 22.a) e 0,8 mg/L per il ClO₂ (figura 22.b).

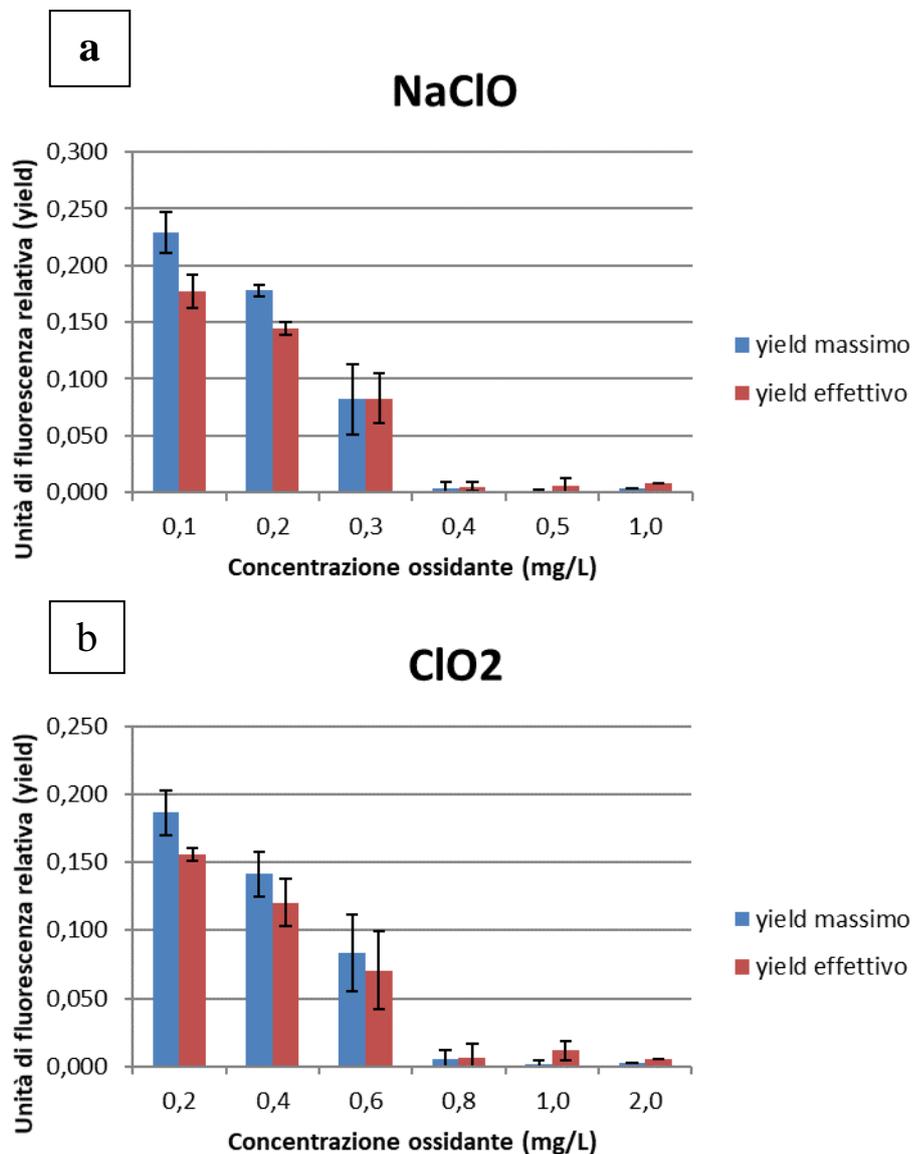
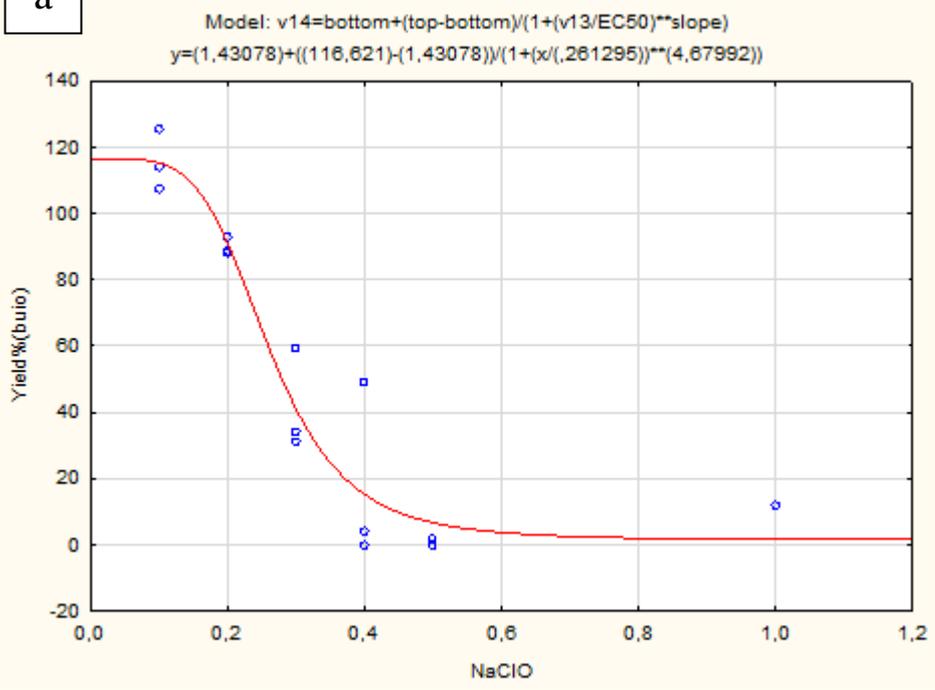


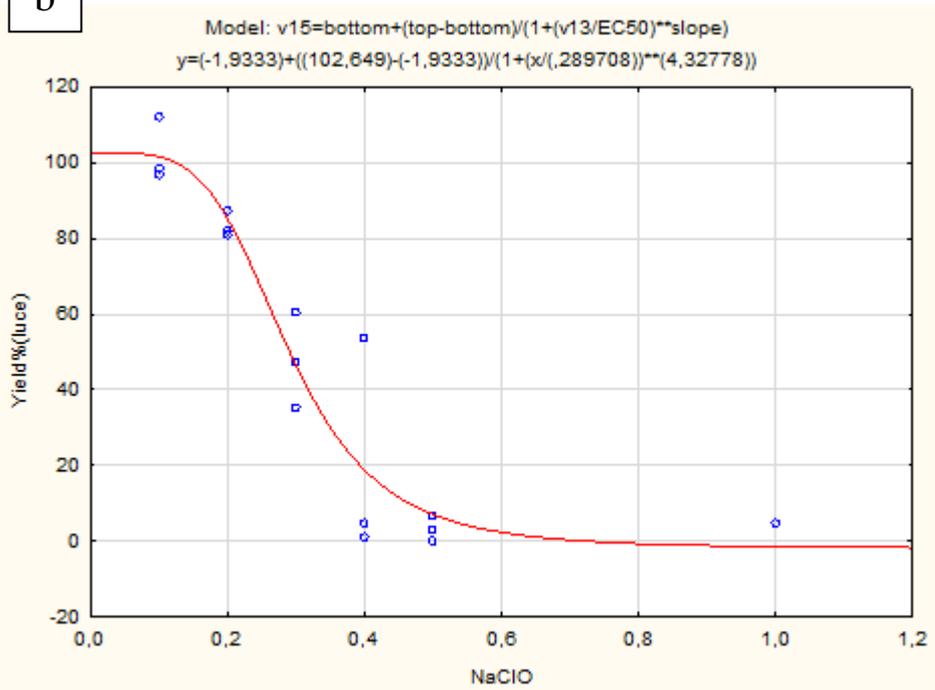
Figura 22. Misura dell'efficienza fotosintetica in relazione a diverse concentrazioni di NaClO (a) e di ClO₂ (b).

Da questi dati è stato possibile calcolare i valori dell'EC50 per entrambi gli ossidanti considerando sia lo *yield* massimo che lo *yield* effettivo. Entrambi i valori di *yield* diminuiscono progressivamente all'aumentare delle concentrazioni degli ossidanti e gli EC50 calcolati a partire da questi parametri non sono molto diversi fra loro, passando rispettivamente da 0,26 mg/L (figura 23.a) a 0,29 mg/L (figura 23.b) per l'NaClO e da 0,55 mg/L (figura 23.c) a 0,53 mg/L (figura 23.d) per il ClO₂. Si può ipotizzare pertanto che entrambi i trattamenti producano un danno strutturale all'apparato fotosintetico della cellula. I valori di EC50 hanno confermato la differente efficacia dei trattamenti, in quanto la concentrazione di NaClO necessaria a determinare una riduzione del 50% dell'efficienza fotosintetica di *M. aeruginosa*, risulta essere la metà di quella necessaria con il ClO₂.

a



b



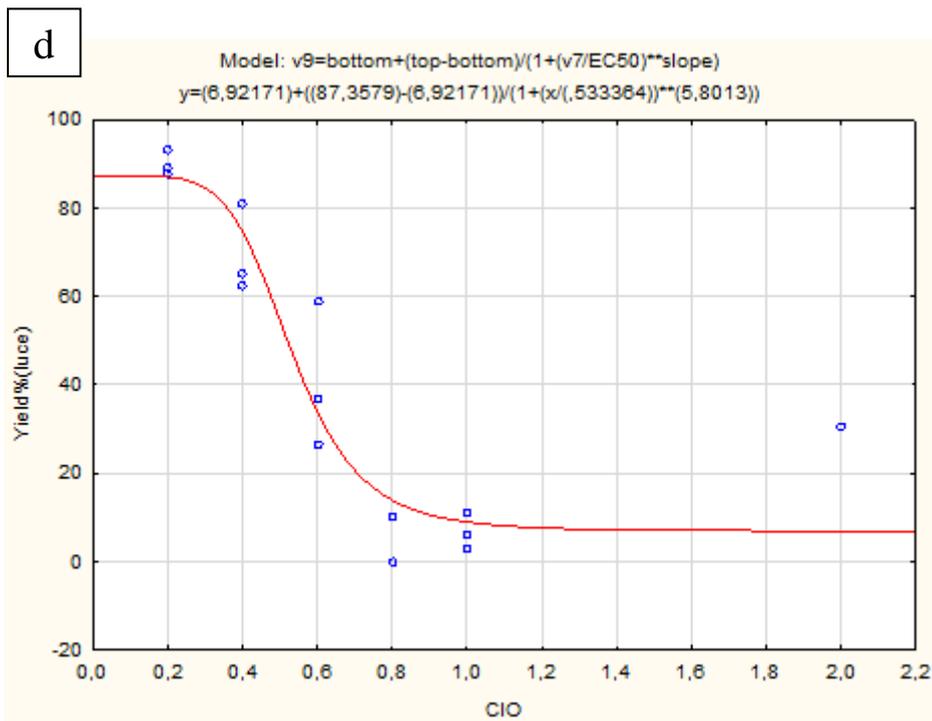
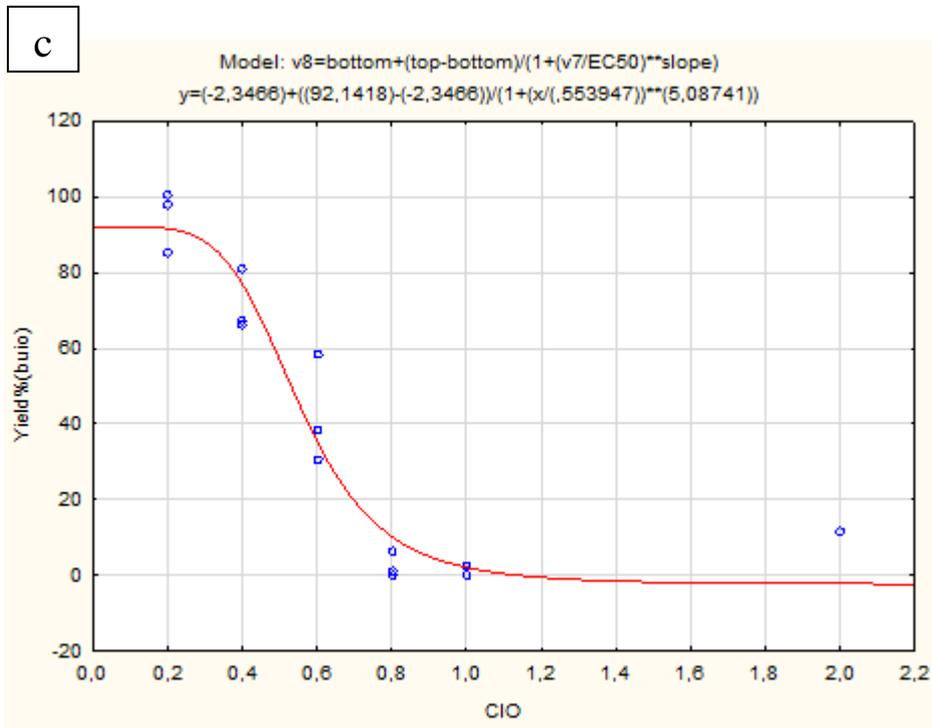


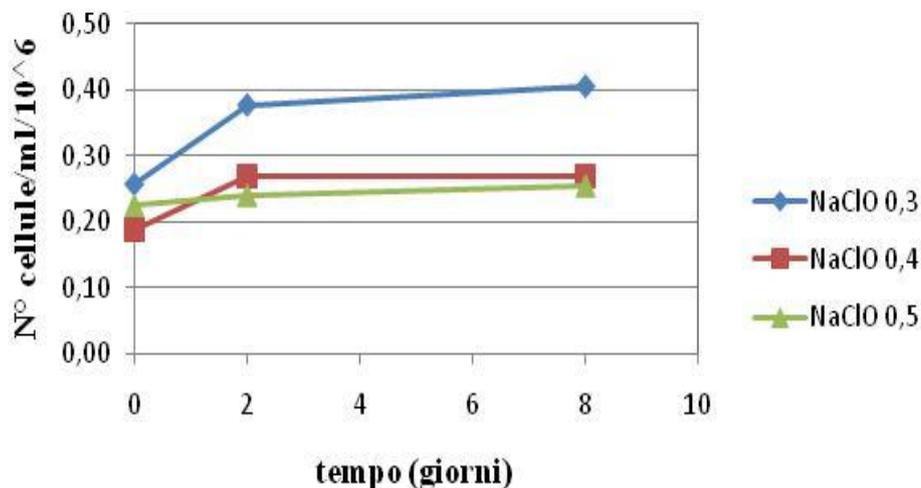
Figura 23. Valori di *yield* massimo (a,c) ed effettivo (b,d) espressi in percentuale rispetto al controllo, in relazione all'aumentare della concentrazione degli ossidanti.

Per poter verificare se la diminuzione dello *yield* massimo osservata nelle prove precedenti fosse dovuta ad un effettivo danno a carico dell'apparato fotosintetico delle cellule di *M. aeruginosa*, una parte dei campioni algali dopo il trattamento è stata impiegata come inoculo

per allestire nuove colture. Queste sono state seguite per un periodo complessivo di 8 giorni attraverso il monitoraggio della torbidità e dalla relazione precedentemente ricavata fra torbidità e numero di cellule è stato possibile ottenere la curva di crescita in termini di numero di cellule su ml (figure 24). Le colture ottenute da cellule trattate con entrambi gli ossidanti alla concentrazione corrispondente all'EC50 mostrano una crescita nel tempo (figura 24); è possibile ipotizzare che una parte delle cellule non sia stata danneggiata in maniera irreversibile e, se posta in condizioni favorevoli per la crescita, riesca a ricostituire la coltura nel tempo. Alle concentrazioni superiori invece si evidenziano due andamenti differenti fra gli ossidanti, in quanto le colture trattate con l'NaClO (figura 24.a) non mostrano nessun incremento della densità cellulare, che rimane invariata nel tempo, portandoci a pensare che il danno prodotto alle cellule sia più consistente. Mentre nelle colture trattate col ClO₂ (figura 24.b) si assiste ad una riduzione della torbidità nel tempo che ci porta a ritenere che si sia verificata una degradazione delle cellule. Queste prime considerazioni sui dati ottenuti, necessitano di analisi più approfondite sul diverso meccanismo d'azione dei due ossidanti e sul loro tempo di permanenza in soluzione acquosa: l'NaClO determina la morte cellulare, mentre apparentemente l'effetto prodotto dal ClO₂ sembra protrarsi maggiormente nel tempo, determinando la completa ossidazione della materia organica.

a

Crescita di *M. aeruginosa* dopo il trattamento con ClO₂



b

Crescita di *M. aeruginosa* dopo il trattamento con ClO₂

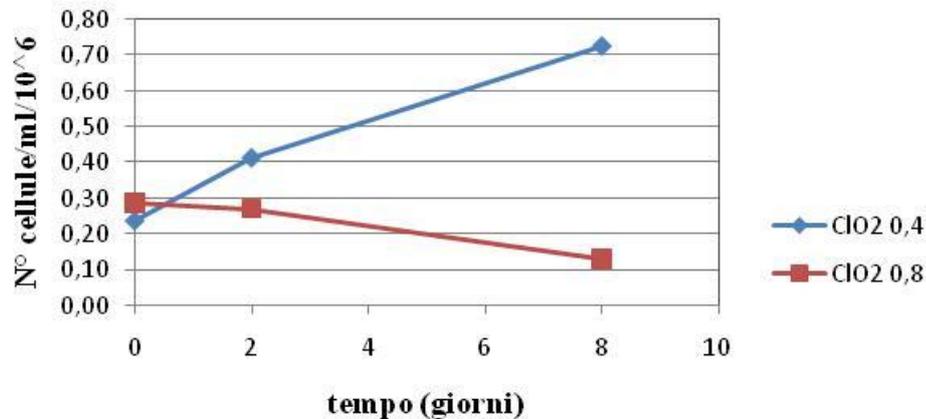


Figura 24. Crescita di *M. aeruginosa* dopo il trattamento con l'NaClO a) e dopo il trattamento con il ClO₂ b).

6.3 Valutazione dell'effetto degli ossidanti sulle tossine prodotte da *M. aeruginosa*

Dopo aver evidenziato il valore di EC50 che mostra l'effetto di inibizione dell'attività fotosintetica, prodotto sulle cellule di *M. aeruginosa* dai due ossidanti utilizzati (NaClO e ClO₂), è stata condotta un'ulteriore prova per determinare se tale esposizione comporti una variazione del contenuto delle tossine totali e di quelle rilasciate nel mezzo di coltura. A tale scopo sono state saggiate due concentrazioni per ciascun ossidante (0,5-2,0 mg/L) su cellule di in fase di crescita esponenziale. La concentrazione minore risulta essere nello stesso ordine di grandezza dei valori di EC50 ottenuti nella precedente prova, ed è stata scelta perché ha provocato solamente un danno parziale alle cellule senza degradarle. La concentrazione più alta da noi usata, rappresenta la concentrazione massima di ossidante normalmente impiegata nei sistemi di depurazione ed è stata scelta per verificare se quest'ultima sia in grado di degradare totalmente le tossine prodotte da *M. aeruginosa*.

6.3.1 Effetto degli ossidanti sulle microcistine totali ed extracellulari

In figura 25 è riportata la concentrazione delle microcistine totali ed extracellulari da colture di *M. aeruginosa* trattate con gli ossidanti. Le microcistine totali comprendono sia la frazione cellulare che quella solubile, mentre la frazione extracellulare è ricavata dopo la separazione per filtrazione delle cellule dal mezzo di coltura. Dall'istogramma si nota che nel controllo, ovvero nel campione non sottoposto a trattamenti con gli ossidanti è presente una

certa quantità di tossine extracellulari pari al 38% del totale, portandoci a pensare che *M. aeruginosa* riesca a liberare attivamente le tossine anche in fase di crescita esponenziale, al contrario di quanto osservato da altri autori che sostengono che il rilascio delle tossine avvenga prevalentemente in seguito a lisi cellulare o a invecchiamento della coltura (Park et al., 1998; Sorlini & Collivignarelli, 2011); il rilascio attivo delle tossine invece era già stato osservato in precedenza per il genere *Anabaena* nel lavoro di Rapala et al., (1997). Il trattamento con la concentrazione più bassa (0,5 mg/L) di NaClO comporta una riduzione significativa (ANOVA $p < 0,05$) del contenuto totale di microcistine, pari al 26% sul controllo, mentre la porzione di tossine extracellulari si riduce del 75% (ANOVA $p < 0,05$); questo dato mette in evidenza che il trattamento con l'NaClO a questa concentrazione permette una maggiore degradazione della frazione extracellulare rispetto a quella totale. La concentrazione maggiore (2,0 mg/L) invece, determina la degradazione completa delle tossine sia totali che extracellulari con una riduzione pari a circa il 90% sui rispettivi controlli (ANOVA $p < 0,05$). Il trattamento con il ClO₂ alla concentrazione più bassa (0,5 mg/L) non evidenzia nessuna riduzione significativa del contenuto di tossine totali (ANOVA $p > 0,05$, $p = 0,5802$), mentre determina un aumento significativo (ANOVA $p < 0,05$) del contenuto di microcistine extracellulari con un valore che risulta circa il doppio rispetto a quanto osservato nel controllo (figura 25). Contrariamente a quanto si verifica per l'NaClO, il ClO₂ alla concentrazione di 0,5 mg/L quindi non provoca la degradazione delle tossine ma ne aumenta il rilascio nel mezzo acquoso fino ad arrivare all'80% del totale. Nei trattamenti ad alta concentrazione (2,0 mg/L) si nota invece una riduzione significativa (ANOVA $p < 0,05$) del 60% delle tossine totali rispetto a quanto misurato nel controllo, mentre quelle che non vengono degradate sono rilasciate totalmente nel mezzo di coltura; questo dato è supportato dalla concentrazione praticamente invariata delle tossine extracellulari rispetto a quelle totali (ANOVA $p > 0,05$, $p = 0,5473$).

Un esperimento simile al nostro è stato condotto da Ding et al., (2010) in colture di *M. aeruginosa* trattate con ClO₂, gli autori osservano un costante rilascio delle tossine totali nel mezzo di coltura all'aumentare della concentrazione dell'ossidante e del tempo di esposizione, mentre non riportano alcun effetto di degradazione di uno standard chimico di microcistina in soluzione (20 µg/L). I dati riportati da Ding et al., (2010) sono espressi in termini di concentrazione-tempo (mg min/L) e rapportando pertanto i nostri valori nella stessa unità di misura possiamo osservare che il rilascio delle tossine si verifica a partire da concentrazioni inferiori (120 mg min/L) rispetto a quelle riportate dagli autori (250 mg min/L); questo potrebbe essere determinato dal differente numero di cellule impiegato nel

nostro esperimento pari a circa 1/3 rispetto a quello da loro utilizzato, oppure dal ceppo di cianobatterio. Contrariamente, per quanto riguarda la degradazione delle tossine, Ding *et al.* (2010) non osservano alcun effetto nemmeno a tempi di esposizione doppi rispetto ai nostri. Altri autori (Zhou *et al.*, 2014) riportano dati contrastanti, dove si evidenzia che il ClO₂ già a concentrazioni 0.5 mg/L determina una marcata lisi cellulare e una degradazione del 60% delle tossine (MC-LR) dopo soli 10 minuti dall'inizio del trattamento; tuttavia le condizioni sperimentali impiegate da questi autori sono molto diverse dalle nostre, in quanto nel loro lavoro i campioni di *M. aeruginosa* sono stati centrifugati e successivamente risospesi prima di effettuare il trattamento, tale metodica potrebbe determinare una condizione di stress iniziale per le cellule. Il trattamento effettuato con l'NaClO alle concentrazioni massime normalmente usate nei sistemi di depurazione ha determinato la degradazione completa delle microcistine, mentre la concentrazione quattro volte inferiore determina la degradazione quasi totale delle tossine libere ma non è in grado di degradare quelle contenute nelle cellule. Il trattamento con il ClO₂ non è efficace nel degradare le tossine e risulta quindi pericoloso in quanto ne determina la liberazione nell'acqua.

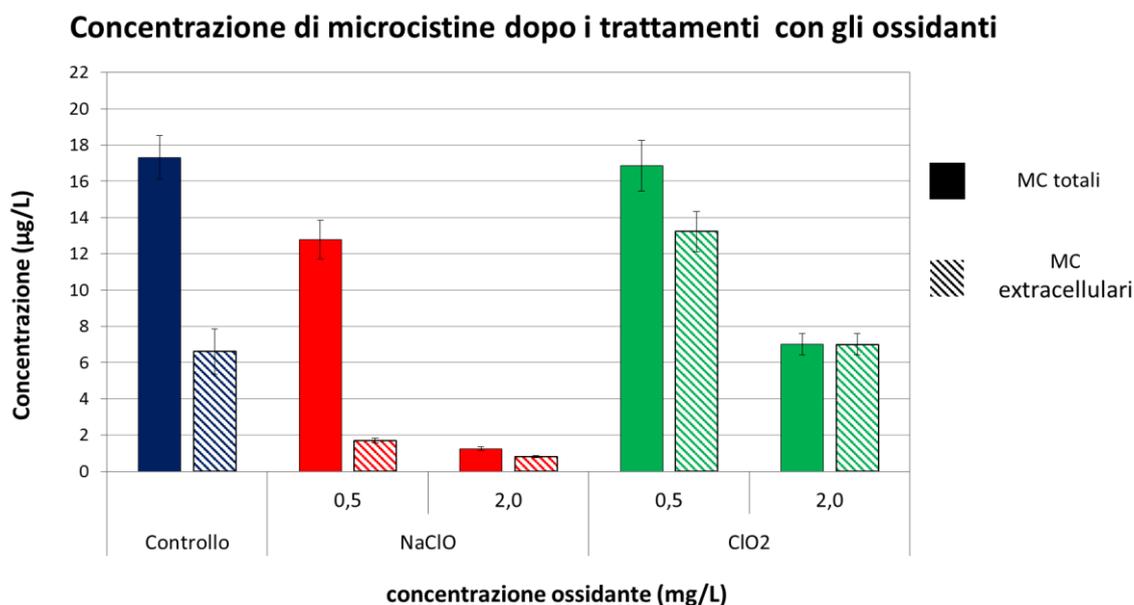
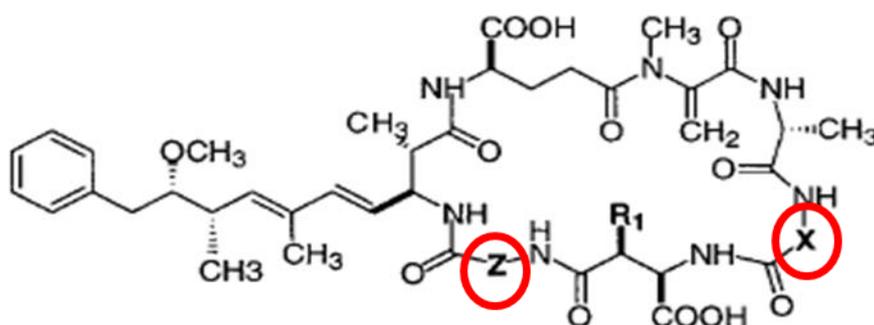


Figura 25. Microcistine totali ed extracellulari misurate nei campioni dopo i trattamenti con gli ossidanti.

6.3.2 Effetto degli ossidanti sui principali congeneri di microcistine

Nella figura 26 è mostrata la struttura chimica dei congeneri più noti, mentre in tabella 10 sono riportati i dati ottenuti dall'analisi svolta all'LC-MS sui campioni di *M. aeruginosa* trattati con gli ossidanti NaClO e ClO₂ a due diverse concentrazioni.



Microcistina	Amminoacido X		Amminoacido Z	
MC-LR	L	Leucina	R	Arginina
Dem-MC-LR	L	Leucina	R	Arginina
MC-LF	L	Leucina	F	Fenilalanina
MC-LW	L	Leucina	W	Triptofano
MC-LY	L	Leucina	Y	Tirosina
MC-YR	Y	Tirosina	R	Arginina

Figura 26. Composizione chimica dei diversi congeneri delle microcistine.

	MC-LR	Dem-MC-LR	MC-LF	MC-LW	MC-LY	MC-YR	MC Totali
MC TOTALI ($\mu\text{g/L}$)							
CONTROLLO	7,25 \pm 0,54	3,07 \pm 0,21	3,21 \pm 0,16	0,40 \pm 0,04	3,39 \pm 0,45	<LOQ	17,32 \pm 1,20
NaClO (0,5 mg/L)	5,07 \pm 0,67	2,79 \pm 0,14	2,34 \pm 0,06	<LOQ	2,58 \pm 0,28	<LOQ	12,78 \pm 1,07
NaClO (2,0 mg/L)	0,45 \pm 0,05	0,27 \pm 0,03	0,25 \pm 0,04	<LOQ	0,17 \pm 0,04	0,12 \pm 0,01	1,25 \pm 0,10
ClO2 (0,5 mg/L)	7,57 \pm 1,09	3,62 \pm 0,11	3,60 \pm 0,08	0,10 \pm 0,03	1,98 \pm 0,20	<LOQ	16,86 \pm 1,41
ClO2 (2,0 mg/L)	2,91 \pm 0,29	2,27 \pm 0,31	1,53 \pm 0,17	<LOQ	0,31 \pm 0,14	<LOQ	7,02 \pm 0,58
MC EXTRACELLULARI ($\mu\text{g/L}$)							
CONTROLLO	1,95 \pm 0,58	1,76 \pm 0,42	1,45 \pm 0,18	0,15 \pm 0,01	1,30 \pm 0,11	<LOQ	6,61 \pm 1,26
NaClO (0,5 mg/L)	0,47 \pm 0,09	0,75 \pm 0,16	0,28 \pm 0,09	<LOQ	0,20 \pm 0,05	<LOQ	1,70 \pm 0,14
NaClO (2,0 mg/L)	0,35 \pm 0,07	0,24 \pm 0,01	0,12 \pm 0,02	<LOQ	0,10 \pm 0,03	<LOQ	0,81 \pm 0,07
ClO2 (0,5 mg/L)	6,23 \pm 0,64	2,91 \pm 0,08	2,77 \pm 0,26	<LOQ	1,33 \pm 0,21	<LOQ	13,24 \pm 1,1
ClO2 (2,0 mg/L)	2,90 \pm 0,73	1,77 \pm 0,04	1,53 \pm 0,07	<LOQ	0,81 \pm 0,22	<LOQ	7,01 \pm 0,58

Tabella 10. Concentrazione di microcistine totali e suoi congeneri in relazione ai trattamenti applicati.

Nella figura 27 è riportato il profilo tossicologico espresso in percentuale sul contenuto totale di microcistine. Nel controllo si può osservare che la frazione più abbondante pari al 41% è rappresentata dalla MC-LR, la molecola con il maggior grado di tossicità fra i congeneri noti (Gupta *et al.*, 2003); seguono in percentuale compresa fra 17-20% i congeneri MC-LY, MC-LF e la forma demetilata del MC-LR. Il profilo da noi riscontrato risulta essere diverso da quanto descritto da Lee *et al.*, (2000), in cui la forma predominante risultava essere MC-RR, che al contrario nei nostri campioni non è mai stato ritrovata. I nostri risultati sono più simili a quelli mostrati in altri lavori con predominanza della forma MC-LR (Brittain *et al.*, 2000; Lawton *et al.*, 1995); inoltre nei nostri campioni si può osservare la presenza in traccia (2%) del congenere MC-LW. I dati ottenuti in seguito al trattamento con l'NaClO, mostrano alle basse concentrazioni una distribuzione degli analoghi simile a quanto osservato nel controllo, con la sola eccezione che MC-LW non viene più ritrovata; alle alte concentrazioni (2,0 mg/L), nella frazione residua di microcistine (8% del totale) la composizione risulta essere leggermente diversa, in quanto si osserva una riduzione di altri due componenti (MC-LR, MC-LY) e la comparsa del MC-YR come possibile prodotto di degradazione. Il trattamento con il ClO₂ alla concentrazione più bassa (0,5 mg/L) risulta inefficace dal punto di vista quantitativo nella rimozione delle tossine, inoltre determina un leggero incremento percentuale della MC-LR e una lieve riduzione del MC-LY. A concentrazioni maggiori (2,0 mg/L), si nota la riduzione in percentuale della MC-LY a favore della forma demetilata del MC-LR.

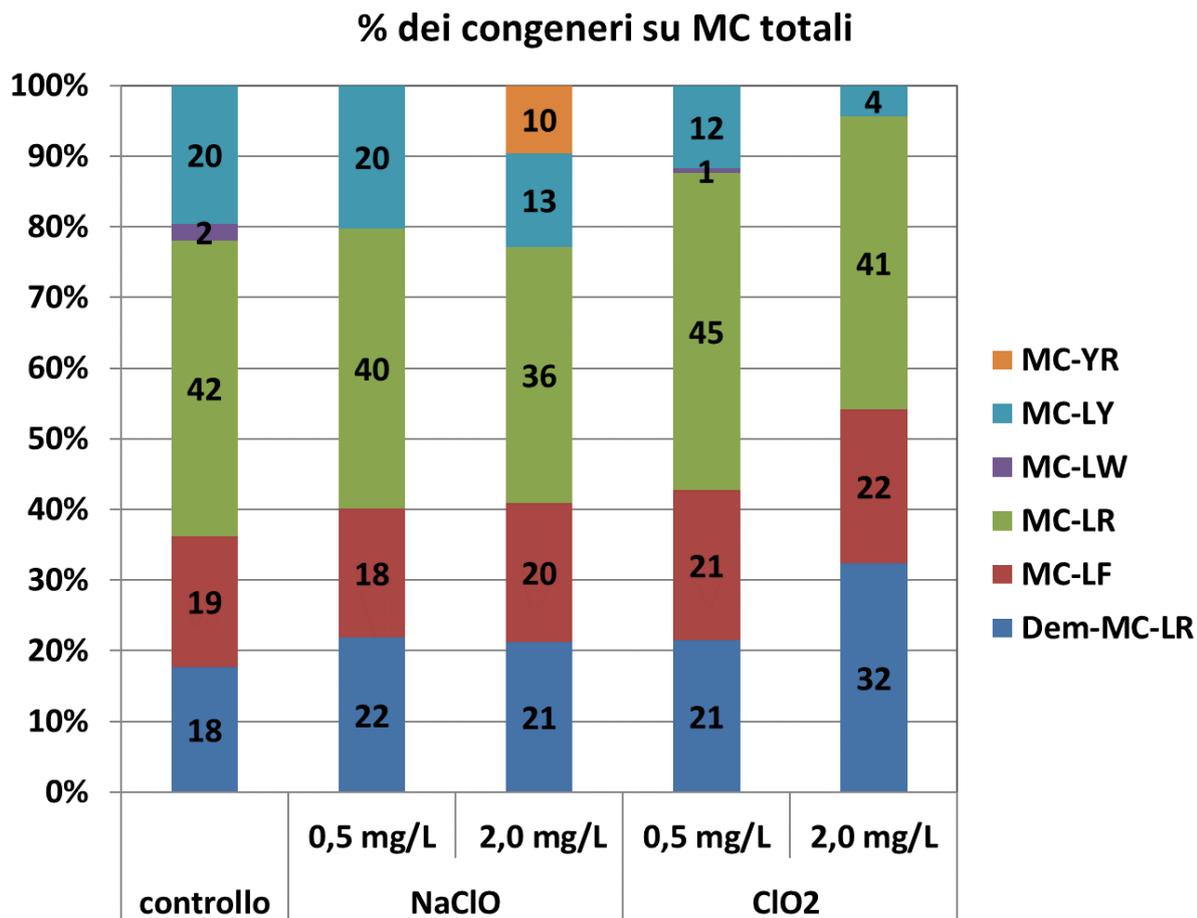


Figura 27. Confronto fra la distribuzione percentuale dei diversi congeneri delle microcistine dopo i trattamenti con gli ossidanti.

Il contenuto cellulare delle microcistine è stato ricavato sottraendo il valore delle tossine extracellulari alle totali, sia nelle condizioni di controllo che in seguito ai trattamenti; nel grafico riportato nella figura 28, i diversi congeneri sono espressi in percentuale rispetto ai cellulari. Per quanto riguarda il controllo il contenuto cellulare di MC-LR aumenta fino al 50%, mentre si osserva una riduzione della sua forma demetilata; per il resto non si notano differenze da quanto osservato nella composizione totale. I trattamenti alle basse concentrazioni (0,5 mg/L) come già illustrato nella figura 25 evidenziano una notevole differenza dal punto di vista quantitativo, in quanto il trattamento con NaClO, degrada quasi esclusivamente le tossine extracellulari, mentre il trattamento con il ClO₂ ne determina il rilascio dalle cellule; invece dal punto di vista qualitativo non si evidenziano variazioni significative nella distribuzione dei vari congeneri. Alle concentrazioni maggiori (2,0 mg/L) si osservano delle differenze sia dal punto di vista

quantitativo che qualitativo, in particolare il contenuto totale di tossine cellulari si riduce ad appena il 2% con l'NaClO mentre risulta essere pari a 0 con il ClO₂. Nel primo caso si può notare come vari anche la composizione qualitativa e compaia nuovamente il congenero MC-YR.

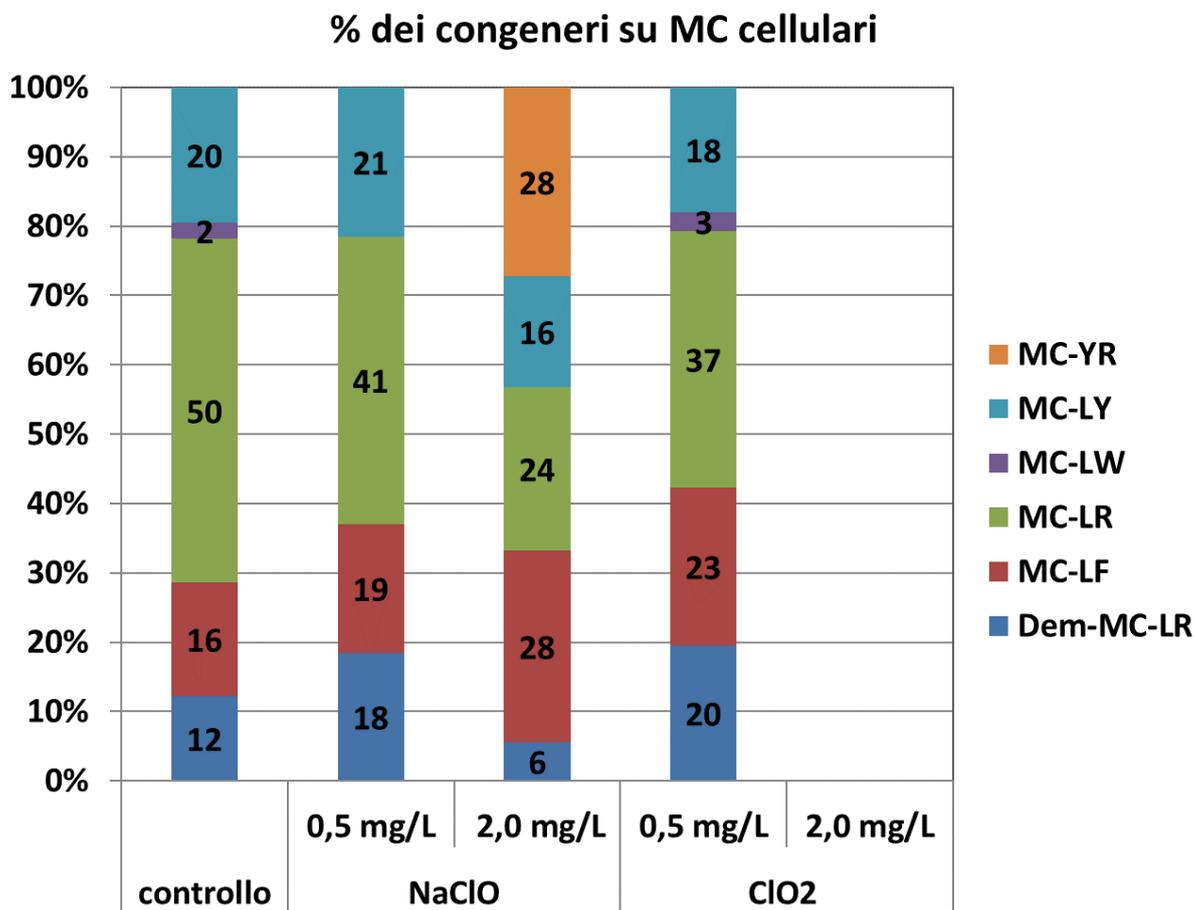


Figura 28. Confronto fra la distribuzione percentuale dei diversi congeneri delle microcistine cellulari dopo i trattamenti con gli ossidanti.

Il trattamento effettuato con l'NaClO ad entrambe le concentrazioni determina una marcata riduzione del contenuto di tossine extracellulari (figura 25); mentre dal punto di vista qualitativo si osservano variazioni percentuali dei principali congeneri: in particolare alla concentrazione più bassa (0,5 mg/L) aumenta la forma demetilata del MC-LR rispetto al controllo, mentre il trattamento ad alta concentrazione (2,0 mg/L) determina una distribuzione opposta, in quanto è maggiore la forma MC-LR. Il trattamento effettuato con il ClO₂, determina solo una parziale degradazione delle microcistine alla concentrazione più alta (2,0 mg/L) provocando però ad entrambe le concentrazioni il rilascio totale delle tossine (figura 25). Osservando il profilo

tossicologico inoltre si può notare che il congenere più abbondante dopo entrambi i trattamenti è l'MC-LR (42-47%) e non si notano variazioni rilevanti nella percentuale degli altri congeneri. Il trattamento con il ClO₂ determina un aumento della tossicità nel mezzo acquoso, perché favorisce il rilascio delle tossine senza degradarle e allo stesso tempo la percentuale maggiore delle tossine rilasciate è data dal congenere più tossico (MC-LR).

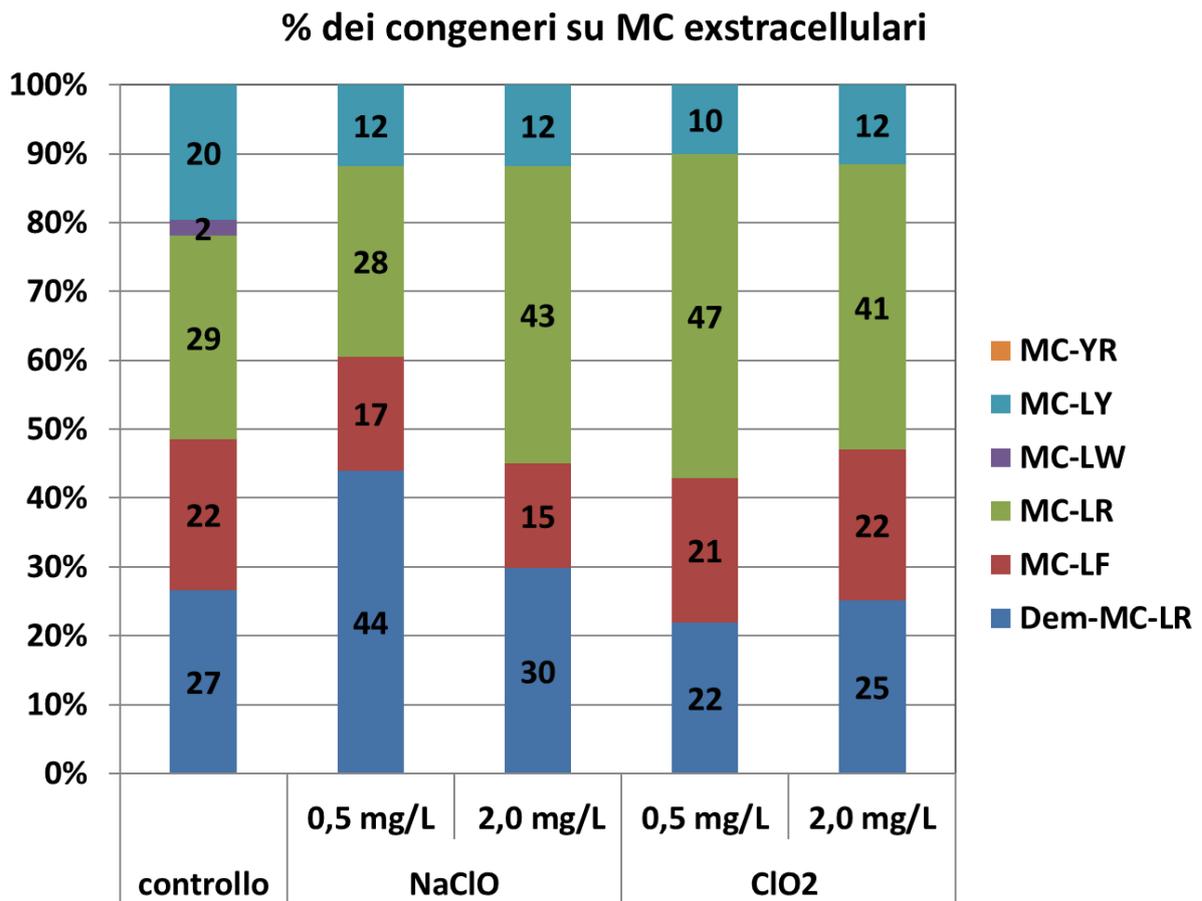


Figura 29. Confronto fra la distribuzione percentuale dei diversi congeneri delle microcistine extracellulari dopo i trattamenti.

In sintesi analizzando le variazioni del profilo tossicologico da noi ottenuto in seguito a entrambi i trattamenti, possiamo affermare che l'NaClO risulti più efficace rispetto al ClO₂ nella degradazione dei congeneri principali in particolare della forma più tossica MC-LR, che si riduce fino all'80% con la concentrazione più alta dell'ossidante (2,0 mg/L). Altri autori hanno riportato un'efficienza simile di ossidazione di uno standard di MC-LR ma a concentrazioni di NaClO più alte rispetto alle nostre (3,0 mg/L) e allo stesso modo efficienze inferiori per il ClO₂ (Sorlini & Collivignarelli, 2011).

7. CONCLUSIONI

Negli ultimi decenni, l'aumento dei fenomeni di eutrofizzazione degli ambienti acquatici ha portato ad un conseguente aumento delle fioriture di microalghe e cianobatteri spesso associate alla produzione di tossine. La maggiore frequenza di fioriture di cianobatteri tossici nei sistemi di approvvigionamento idrico può rappresentare un potenziale pericolo per la salute umana in quanto le tossine presenti nell'acqua non adeguatamente trattata possono arrivare all'uomo determinando eventi di intossicazioni. In Italia le problematiche determinate dai cianobatteri tossici sono spesso associate alla specie *Microcystis aeruginosa*, in grado di produrre e rilasciare potenti epatotossine denominate microcistine (MC). Fra i numerosi trattamenti impiegati per l'eliminazione delle microcistine in questo studio sono stati presi in considerazione due composti ossidanti ampiamente utilizzati, NaClO e ClO₂, a due diverse concentrazioni, valutandone l'effetto sia sulla vitalità delle cellule di *M. aeruginosa* che sulla degradazione delle microcistine.

La prima parte del lavoro ha permesso di osservare che questo ceppo di *M. aeruginosa* è in grado di mantenere costante la produzione di tossine per cellula nell'arco della crescita, sia in fase esponenziale che in fase rallentata al giorno 13. La composizione dei diversi congeneri ci ha permesso di evidenziare che la maggiore tossicità si osserva nella fase esponenziale di crescita in quanto è presente in concentrazione maggiore la forma MC-LR; assistiamo inoltre in questa fase di crescita al rilascio attivo del 38% di tossine nel mezzo acquoso.

Nella seconda parte dello studio è stato valutato l'effetto prodotto da due ossidanti (NaClO e ClO₂) sulle cellule di *M. aeruginosa*, attraverso l'utilizzo del fluorimetro PAM, misurando la variazione dell'efficienza fotosintetica. Questa metodica ha permesso di ottenere in maniera rapida una stima indiretta della vitalità della cellula, utile per calcolare i valori di EC50 per entrambi gli ossidanti. L'inibizione del 50% dell'efficienza fotosintetica per l'NaClO avviene ad una concentrazione che è quasi la metà, rispetto al ClO₂, fornendo una prima indicazione della diversa efficacia dei due ossidanti. Da prove effettuate per verificare la capacità di recupero si può osservare che le cellule trattate a queste concentrazioni, nel tempo sono in grado di ricostituire la coltura. A concentrazioni maggiori di ossidante il danno cellulare è irreversibile, inoltre nel caso del ClO₂ si osserva dopo un periodo di esposizione prolungato (8 giorni) la totale degradazione della materia organica.

Per quanto riguarda l'effetto degli ossidanti sulle tossine prodotte da *M. aeruginosa*, si osservano i seguenti andamenti: l' NaClO a concentrazioni di 0,5 mg/L ha determinato la degradazione quasi totale delle tossine extracellulari e solo in parte di quelle cellulari, mentre alle concentrazioni maggiori di 2,0 mg/L si osserva la completa degradazione di entrambe. Al contrario il ClO_2 alla concentrazione di 0,5 mg/L risulta avere un maggior effetto sull'integrità della parete cellulare, determinando il rilascio quasi totale delle tossine, che una volta liberate nell'acqua non sono degradate dal trattamento di 1 ora da noi effettuato. Il trattamento con 2,0 mg/L di ClO_2 determina il rilascio totale delle tossine e dopo 1 ora la loro degradazione solo per il 60%.

Il profilo tossicologico del ceppo da noi studiato, evidenzia che il congenero più abbondante è MC-LR presente per il 42% sul totale, che risulta essere anche la forma più tossica fra le microcistine note. Le percentuali dei diversi congeneri sul totale non subiscono variazioni significative fra i vari trattamenti effettuati, analizzando però nel dettaglio quelle osservate dopo i trattamenti con il ClO_2 , si evidenzia un aumento della frazione MC-LR nel mezzo acquoso rispetto alla quantità normalmente rilasciata dalla cellula. Il trattamento con il ClO_2 non solo non è risultato efficace nel degradare le tossine ma in particolare alle basse concentrazioni (0,5 mg/L) ha anche determinato un maggiore rilascio in acqua della componente più tossica MC-LR.

Questo studio preliminare che ha considerato solo due fra i vari ossidanti normalmente utilizzati, si inserisce in un contesto di ottimizzazione dei sistemi di depurazione di acque destinate al consumo umano. Le informazioni raccolte forniscono una base di partenza per affinare le tecniche normalmente impiegate per eliminare le cianotossine prodotte in natura; in particolare è emerso che occorre valutare la scelta dell'ossidante più idoneo, onde evitare le problematiche relative al maggiore rilascio delle tossine nell'acqua come quanto da noi osservato in seguito al trattamento col ClO_2 , soprattutto se sono le acque grezze non ancora filtrate ad essere trattate. Dai nostri dati emerge inoltre che l'impiego di NaClO alla concentrazione più bassa di 0,5 mg/L può essere sufficiente nell'eliminare le tossine extracellulari qualora questo trattamento venga affiancato ad un processo di filtrazione della componente cellulare; inoltre l'impiego di composti ossidanti clorurati a basse concentrazioni permetterebbe di ridurre la quantità di cloro residuo in acqua.

8. RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

Acero, J. L., Rodríguez, E., Majado, M. E., Sordo, A., & Meriluoto, J. 2008. Oxidation of microcystin-LR with chlorine and permanganate during drinking water treatment. *Journal of Water Supply: Research and Technology-AQUA*, 57(6), 371-380.

Anderson, D., Glibert, P., Burkholder, J., 2002. Harmful algal blooms and eutrophication: nutrient sources, composition, and consequences. *Estuaries* 25 (4), 704–726.

Azevedo, S.M., Carmichael, W.W., Jochimsen, E.M., Rinehart, K.L., Lau, S., Shaw, G.R., Eaglesham, G.K. 2002. Human intoxication by microcystins during renal dialysis treatment in Caruaru-Brazil. *Toxicology*;181-182:441-6.

Banker, P.D., Carmeli, S., Hadas, O., Teltsch, B., Porat, R., Sukenik, A. 1997. Identification of cylindrospermopsin in *Aphanizomenon ovalisporum* (Cyanophyceae) isolated from Lake Kinneret, Israel. *J Phycol*;33:613-6.

Bold, H.C., Wynne, M.J. 1985. *Introduction to the algae. Structure and reproduction.* ed. New Jersey: Prentice-Hall Inc. Eaglewood Cliffs NJ.

Brittain, M., Wang, J., Jackson, L.B., Carmichael, W., Rinehart, K.L., Culver, D.A., 2000; Isolation and Characterization of Microcystins, Cyclic Heptapeptide Hepatotoxins from a Lake Erie Strain of *Microcystis aeruginosa*. *Jgreat Lakes Res.* 26(3): 241-249.

Bruno, M., Scaradala, S., Funari, E. 2003. Cyanobacteria in drinking waters and related risks to human health. In: *Expert meeting on emerging risks to drinking water supplies: best practice for improved management and preparedness to protect public health*; Cuernavaca (Messico), 28-30 luglio 2003. OECD;

Carmichael, W.W., Beasley, V., Bunner, D.L., Eloff, J.N., Falconer, I., Gorham, P., Harada, K., Krishnamurthy, T., Yu, M.J., Moore, R.E., Reinhart, M., Runnegar, M., Skulberg, O.M., Watanabe, M. 1988. Naming of cyclic heptapeptide toxins of cyanobacteria (blue-green algae). *Toxicon*;26:971-3.

Carmichael, W.W., Mahmood, K.A. Toxins from Freshwater Cyanobacteria. *ACS Symposium Series* 1984;262:377-89.

Chorus, I., Bartram, J. (Ed.). 1999. *Toxic cyanobacteria in water: a guide to their public health consequences, monitoring and management.* London: E & FN Spon.

Chow, C. W. K., Drikas, M., House, J., Burch, M. D. & Velzeboer, R. M. A. 1999. The impact of conventional water treatment processes on cells of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. *Water Res.* 33, 3253–3262.

- Codd, G.A., Morrison, L.F., Metcalf, J.S. 2005. Cyanobacterial toxins: risk management for health protection. *Toxicology and Applied Pharmacology*;203(3):264-72.
- Cox, P.A., Banack, S.A., Murch, S.J., Rasmussen, U., Tien, G., Bidigare, R.R., et al. 2005. Diverse taxa of cyanobacteria produce beta-n-methylamino-l-alanine, a neurotoxic amino acid. *Proc Natl Acad Sci U S A*;102:5074–8
- Davis, T. W., Berry, D. L., Boyer, G. L., & Gobler, C. J. 2009. The effects of temperature and nutrients on the growth and dynamics of toxic and non-toxic strains of *Microcystis* during cyanobacteria blooms. *Harmful algae*, 8(5), 715-725.
- Devlin, J.P., Edwards, O.E., Gorham, P.R., Hunter, N.R., Pike, R.K., Stavric, B., 1977. Anatoxin-a, a toxic alkaloid from *Anabaena flos-aquae* NRC-44 h. *Can. J. Chem.* 55 (8), 1367–1371.
- Ding, J., Shi, H., Timmons, T., & Adams, C. (2009). Release and removal of microcystins from *Microcystis* during oxidative-, physical-, and UV-based disinfection. *Journal of Environmental Engineering*, 136(1), 2-11.
- Duy, T.N., Lam, P.K. a. S., Shaw, G.R., Connell, D.W. 2000. Toxicology and risk assessment of freshwater cyanobacterial (blue-green algal) toxins in water. *Rev Environ Contam Toxicol*;163:113-86.
- Froschio, S.M., Humpage, A.R., Burcham, P.C., Falconer, I.R., 2003. *Cylindrospermopsin*-induced protein synthesis inhibition and its dissociation from acute toxicity in mouse hepatocytes. *Environ. Toxicol.* 18 (4), 243–251.
- Gao, K., Yu, H., & Brown, M. T. 2007. Solar PAR and UV radiation affects the physiology and morphology of the cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC 7120. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 89(2-3), 117-124.
- Gehring, M. M., Adler, L., Roberts, A. A., Moffitt, M. C., Mihali, T. K., Mills, T. J., ... & Neilan, B. A. 2012. Nodularin, a cyanobacterial toxin, is synthesized in planta by symbiotic *Nostoc* sp. *The ISME journal*, 6(10), 1834.
- Giury, M.D., Giury, G.M. 2019. *AlgaeBase*. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. <http://www.algabase.org>.
- Gordon, G., & Rosenblatt, A. A. 2005. Chlorine dioxide: the current state of the art. *Ozone: science & engineering*, 27(3), 203-207.
- Gupta, N., Pant, S. C., Vijayaraghavan, R., & Rao, P. L. 2003. Comparative toxicity evaluation of cyanobacterial cyclic peptide toxin microcystin variants (LR, RR, YR) in mice. *Toxicology*, 188(2-3), 285-296.

- Hammer, O., Harper, D.A.T. a. T., Ryan, P.D., 2001. PAST: Paleontological Statistics Software Package foe Education and Data Analysis. *Palaeontol. Electron.* 4(1), 1-9. doi:10.1016/j.bcp.2008.05.025.
- Han, J., Jeon, B. S., & Park, H. D. 2012. Cyanobacteria cell damage and cyanotoxin release in response to alum treatment. *Water Science and Technology: Water Supply*, 12(5), 549-555.
- Hawkins, P.R., Runnegar, M.T., Jackson, A.B., Falconer, I.R. 1985. Severe hepatotoxicity caused by the tropical cyanobacterium (blue-green algae) *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska) Seenaya and Subba Raju isolated from a domestic water supply reservoir. *Appl Environ Microbiol*;50:1292-5.
- Hawser, S.P., Beattie, K.A., Lambert, J.J., Codd, G.A. 1990. Characterization of novel neurotoxicity in *Oscillatoria agardhii* and *Anabaena flos-aquae*. *Br Phyc J*;25:89-90.
- He, X., Liu, Y. L., Conklin, A., Westrick, J., Weavers, L. K., Dionysiou, D. D., ... & Walker, H. W. 2016. Toxic cyanobacteria and drinking water: impacts, detection, and treatment. *Harmful algae*, 54, 174-193.
- Henriksen, P. *Toxic cyanobacteria/blue-green algae in Danish freshwater*. [tesi di dottorato]. Copenhagen: Botanical Institute, University of Copenhagen; 1996.
- Ho, L., Lambling, P., Bustamante, H., Duker, P., & Newcombe, G. 2011. Application of powdered activated carbon for the adsorption of cylindrospermopsin and microcystin toxins from drinking water supplies. *Water Research*, 45(9), 2954-2964.
- Hua, G., & Reckhow, D. A. 2007. Comparison of disinfection byproduct formation from chlorine and alternative disinfectants. *Water Research*, 41(8), 1667-1678.
- Hudnell, H.K., 2008. Cyanobacterial harmful algal blooms: state of the science and research needs. In: Back, N. (Ed.), *Advances in Experimental Medicine and Biology*. Springer, New York, p. 949.
- Humpage, A.R., Rositano, J., Bretag, A.H., Brown, R., Baker, P.D., Nicholson, B.C., Steffensen, D.A. 1994. Paralytic shellfish poisons from Australian cyanobacterial blooms. *Aust J Mar Freshwater Res*;45:761-71.
- Ikehara, T., Imamura, S., Sano, T., Nakashima, J., Kuniyoshi, K., Oshiro, N., Yoshimoto, M., Yasumoto, T. 2009. The effect of structural variation in 21 microcystins on their inhibition of PP2A and the effect of replacing cys269 with glycine. *Toxicon*;54(4):539-44.
- Islam, M., & Beardall, J. 2017. Growth and photosynthetic characteristics of toxic and non-toxic strains of the cyanobacteria *Microcystis aeruginosa* and *Anabaena circinalis* in relation to light. *Microorganisms*, 5(3), 45.

ISO 20179. Water quality – Determination of Microcystins – Method using Solid Phase Extraction (SPE) and High Performance Liquid Chromatography (HPLC) with Ultraviolet (UV) detection. Geneva: International Organization for Standardization; 2005.

Istituto Superiore di Sanità, 2008. Cianobatteri potenzialmente tossici :aspetti ecologici, metodologici e valutazione del rischio; Rapporto ISTISAN 08-6.

Istituto Superiore di Sanità, 2011. Cianobatteri in acqua destinate a consumo umano. Stato della conoscenza per la valutazione del rischio. Volume 1; Rapporto ISTISAN 11/35 Pt 1.

Istituto Superiore di Sanità, 2011. Cianobatteri in acqua destinate a consumo umano. Stato della conoscenza per la valutazione del rischio. Volume 1; Rapporto ISTISAN 11/35 Pt 2

Jochimsen, E.M., Carmichael, W.W., An, J., Cardo, D.M., Cookson, S.T., Holmes, C.E. a. M., Antunes, M.B.D.e.C., De Filho, M.D.A., Lyra, T.M., Barreto, V.S. a. T., Azevedo, S.M.F.O., Jarvis, W.R. 1998. Liver failure and death after exposure to Microcystins at a hemodialysis center in Brazil. *N Engl J Med*;338:873-8.

Kao, C., Levinson, S., 1986. Tetrodotoxin, Saxitoxin, and the Molecular Biology of the Sodium Channel. Academy of Sciences, New York.

Kautsky, H., Hirsch, A., 1931. Neue Versuche zur Kohlensaureassimilation. *Naturwissenschaften* 19, 964. doi:10.1007/BF01516164

Keon-hee, K., Lim, B.-J., You, K.-A., Park, M.-H., Hwan Park, J., Kim, B.-H., Hwang, S.-J., 2014. Identification and Analysis of Geosmin Production Potential of *Anabaena* stain Isolated from North Han River using Genetic Methods. *Korean J. Ecol. Environ.* 47, 342–349.

Kull, T. P., Backlund, P. H., Karlsson, K. M., & Meriluoto, J. A. 2004. Oxidation of the cyanobacterial hepatotoxin microcystin-LR by chlorine dioxide: reaction kinetics, characterization, and toxicity of reaction products. *Environmental science & technology*, 38(22), 6025-6031.

Kurmayer, R., Dittman, E., Fastner, J., Chorus, I. 2002. Diversity of microcystin genes within a population of the toxic cyanobacterium *Microcystis* spp. in lake Wannsee (Berlin, Germany). *Microb Ecol*;43:107-18.

Kurmayer, R., & Christiansen, G. 2009. The genetic basis of toxin production in cyanobacteria. *Freshwater reviews*, 2(1), 31-51.

Lawton, L.A., Beattie, K.A., Hawser, S.P., Campbell, D.L., Codd, G.A. 1994. Evaluation of assay methods for the determination of cyanobacterial hepatotoxicity. In: Codd GA, Jeffries

TM, Keevil CW, Potter E (Ed.). Detection methods cyanobacterial toxins. vol. 149. Cambridge: The Royal Society of Chemistry; p. 111-6.

Lee, S. J., Jang, M. H., Kim, H. S., Yoon, B. D., & Oh, H. M. 2000. Variation of microcystin content of *Microcystis aeruginosa* relative to medium N: P ratio and growth stage. *Journal of Applied Microbiology*, 89(2), 323-329.

Lindholm, T., Eriksson, J.E., Reinikainen, M., Meriluoto, J.A.O. 1992. Ecological effects of hepatotoxic cyanobacteria. *Environ Toxicol Water Qual*;7:87-93.

Lopez, C.B., Jewett, E.B., Dortch, Q., Walton, B.T., Hudnell, H.K., 2008. Scientific assessment of freshwater harmful algal blooms, Interagency Working Group on Harmful Algal Blooms, Hypoxia, and Human Health of the Joint Subcommittee on Ocean Science and Technology, Washington, DC.

Maxwell, K., Johnson, G.N., 2000. Chlorophyll fluorescence—a practical guide. *J. Exp. Bot.* 51, 659–668. doi:10.1093/jxb/51.345.659.

Mazmouz, R., Chapuis-Hugon, F., Mann, S., Pichon, V., Méjean, A., & Ploux, O. 2010. Biosynthesis of cylindrospermopsin and 7-epicylindrospermopsin in *Oscillatoria* sp. strain PCC 6506: identification of the *cyr* gene cluster and toxin analysis. *Appl. Environ. Microbiol.*, 76(15), 4943-4949.

McElhiney, J., Lawton, L. 2005. Detection of the cyanobacteria hepatotoxin microcystin. *Toxicol Appl Pharmacol*;203:215-30.

Merel, S., Walker, D., Chicana, R., Snyder, S., Baurès, E., & Thomas, O. 2013. State of knowledge and concerns on cyanobacterial blooms and cyanotoxins. *Environment international*, 59, 303-327.

Mihali, T. K., R. Kellmann, J. Muenchhoff, K. D. Barrow, and B. A. Neilan. 2008. *Characterization of the gene cluster responsible for cylindrospermopsin biosynthesis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 74:716-722.

Moffitt, M.C., Neilan, B.A. 2004. Characterization of thenodularin synthetase gene cluster and proposed theory of the evolution of cyanobacterial hepatotoxins. *Appl Environ Microbiol* 70: 6353–6362.

Mullineaux, C. W., Mariscal, V., Nenner, A., Khanum, H., Herrero, A., Flores, E., & Adams, D. G. 2008. Mechanism of intercellular molecular exchange in heterocyst-forming cyanobacteria. *The EMBO journal*, 27(9), 1299-308.

Newcombe, G., & Nicholson, B. 2004. Water treatment options for dissolved cyanotoxins. *Journal of Water Supply: Research and Technology-AQUA*, 53(4), 227-239.

- Nicholson, B. C., Rositano, J., & Burch, M. D. 1994. *Destruction of cyanobacterial peptide hepatotoxins by chlorine and chloramine*. *Water Research*, 28(6), 1297-1303.
- Nogueira, I., Vasconcelos, V. 2001. Toxicity of two filamentous cyanobacteria species – *Planktothrix planctonica* and *P. perornata*. In: *5th Int. Conf. Toxic Cyanobacteria*, Noosa, Queensland, Australia, 15-20.
- Ohtani, I., Moore, R.E., Runnegar, M.T.C., 1992. *Cylindrospermopsin: a potent hepatotoxin from the blue-green alga Cylindrospermopsis raciborskii*. *J. Am. Chem. Soc.* 114 (20), 7941–7942.
- Oliver, R. L., Hamilton, D. P., Brookes, J. D., & Ganf, G. G. 2012. *Physiology, blooms and prediction of planktonic cyanobacteria*. In B.A. Whitton (Ed.), *Ecology of Cyanobacteria II: their Diversity in Space and Time*.(pp. 155-194). Netherlands: Springer-Verlag.
- Orr, P. T., & Jones, G. J. 1998. Relationship between microcystin production and cell division rates in nitrogen-limited *Microcystis aeruginosa* cultures. *Limnology and oceanography*, 43(7), 1604-1614.
- Park, H. D., Iwami, C., Watanabe, M. F., Harada, K. I., Okino, T., & Hayashi, H. 1998. Temporal variabilities of the concentrations of intra-and extracellular microcystin and toxic *Microcystis* species in a hypertrophic lake, Lake Suwa, Japan (1991–1994). *Environmental Toxicology and Water Quality: An International Journal*, 13(1), 61-72.
- Pichierri, S., Pezzolesi, L., Vanucci, S., Totti, C., Pistocchi, R., 2016. Inhibitory effect of polyunsaturated aldehydes (PUAs) on the growth of the toxic benthic dinoflagellate *Ostreopsis cf. ovata*. *Aquatic Toxicology* 179 (2016) 125-133.
- Prescott, G.W. *The algae: a review*. Boston: Houghton Mifflin Co.; 1986.
- Rapala, J., Erkoma, K., Kukkonen, J., Lahti, K. 2002. Detection of microcystins with protein phosphatase inhibition assay, high-performance liquid chromatography–UV detection and enzyme-linked immunosorbent assay, comparison of methods. *Analytica Chimica Acta*;466:213-31.
- Rapala, J., Sivonen, K., Luukkainen, R., Niemelä, S.I. 1993. Anatoxin-a concentration in *Anabaena* and *Aphanizomenon* at different environmental conditions and comparison of growth by toxic and nontoxic *Anabaena* strains - a laboratory study. *J Appl Phycology*;5:581-91.
- Rapala, J., Sivonen, K., Lyra, C., Niemela, S.I. 1997. Variation of microcystins, cyanobacterial hepatotoxin in *Anabaena* spp. as a function of growth stimuli. *Appl Environ Microbiol*;64:2206-12.

- Ressom, R., Soong, F.S., Fitzgerald, J., Turczyonowicz, L., El Saadi, O., Roder, D., Maynard, T., Falconer, I. 1994. Health Effects of Toxic Cyanobacteria (Blue-Green Algae). Canberra, Australia: National Health and Medical Research Council, Looking Glass Press.
- Reuter, J.G., Petersen, R.R. 1987. Micronutrient effects on cyanobacterial growth and physiology. *N Z J Mar Freshwater Res*;21:435-45.
- Reynolds, C.S. 1984. The ecology of freshwater phytoplankton. Cambridge: Cambridge University Press.
- Reynolds, C.S., 2006. The Ecology of Phytoplankton. University Press, Cambridge. Rippka.
- Rodríguez, E., Onstad, G. D., Kull, T. P., Metcalf, J. S., Acero, J. L., & von Gunten, U. 2007. Oxidative elimination of cyanotoxins: comparison of ozone, chlorine, chlorine dioxide and permanganate. *Water Research*, 41(15), 3381-3393.
- Runnegar, M.T., 1995. In vitro hepatotoxicity of the cyanobacterial alkaloid cylindrospermopsin in cultured rat hepatocytes. *Biochem. Pharmacol.* 49, 219–225.
- Runnegar, M.T., Kong, S.M., Zhong, Y.Z., Ge, J.L., Lu, S.C., 1994. The role of glutathione in the toxicity of a novel cyanobacterial alkaloid cylindrospermopsin in cultured rat hepatocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 201 (1), 235–241.
- Runnegar, M.T., Xie, C., Snider, B.B., Wallace, G.A., Weinreb, S.M., Kuhlenkamp, J., 2002. In vitro hepatotoxicity of the cyanobacterial alkaloid cylindrospermopsin and related synthetic analogues. *Toxicol. Sci.* 67 (1), 81–87.
- Schreiber, U., 2004. Pulse-Amplitude-Modulation (PAM) Fluorometry and Saturation Pulse Methode: An Overview, in: *Chlorophyll a Fluorescence*. pp. 279–319. doi:10.1007/978-1-4020-3218-9.
- Schuermans, R. M., van Alphen, P., Schuurmans, J. M., Matthijs, H. C., & Hellingwerf, K. J. 2015. Comparison of the photosynthetic yield of cyanobacteria and green algae: different methods give different answers. *PloS one*, 10(9), e0139061.
- Şengül, A. B., Ersan, G., & Tüfekçi, N. 2018. Removal of intra-and extracellular microcystin by submerged ultrafiltration (UF) membrane combined with coagulation/flocculation and powdered activated carbon (PAC) adsorption. *Journal of hazardous materials*, 343, 29-35.
- Sivonen, K., Jones, G. 1999. Cyanobacterial toxins. In: Chorus I, Bartram J (Ed.). *Toxic cyanobacteria in water: a guide to their public health consequences, monitoring and management*. London: E & FN Spon; p.41-111.
- Sivonen, K., Kononen, K., Carmichael, W.W., Dahlem, A.M., Rinehart, K.L., Kiviranta, J., Niemela, S.I. 1989. Occurrence of the hepatotoxic microcystin homologues from the

filamentous freshwater cyanobacterium *Nodularia spumigena* in the Baltic Sea and structure of the toxin. *App Env Microbiol* 55:1990-5.

Skulberg, O.M., Carmichael, W.W., Cood, G.A., Skulberg, R. 1993. Taxonomy of toxic Cyanophyceae (Cyanobacteria). In: Falconer IA (Ed.). *Algal toxin in seafood and drinking water*. London: Academic Press. p. 145-63.

Sorlini, S., & Collivignarelli, C. (2011). Microcystin-LR removal from drinking water supplies by chemical oxidation and activated carbon adsorption. *Journal of Water Supply: Research and Technology-AQUA*, 60(7), 403-411.

Su, Z., Sheets, M., Ishida, H., Li, F., Barry, W.H., 2004. Saxitoxin blocks L-type ICa. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 308 (1), 324–329.

Terao, K., Ohmori, S., Igarashi, K., Ohtani, I., Watanabe, M.F., Harada, K.I., Ito, E., Watanabe, M., 1994. Electron microscopic studies on experimental poisoning in mice induced by cylindrospermopsin isolated from blue-green alga *Umezakia natans*. *Toxicon* 32 (7), 833–843.

Van Apeldoorn, M.E., van Egmond, H.P., Speijers, J.A., Bakker, G.J.I. 2007. Review. Toxins of cyanobacteria. *Mol Nutr Food Res*;51:7-60.

van der Westhuizen, A.J., Eloff, J.N., 1985. Effect of temperature and light on the toxicity and growth of the blue-green alga *Microcystis aeruginosa* (UV-006). *Planta* 163, 55–59.

Wacklin, P., Hoffmann, L. & Komárek, J. 2009. Nomenclatural validation of the genetically revised cyanobacterial genus *Dolichospermum* (Ralfs ex Bornet et Flahault) comb. nova. *Fottea* 9(1): 59-64.

Wang, J., Salata, J.J., Bennett, P.B., 2003. Saxitoxin is a gating modifier of hERG K(+) channels. *J. Gen. Physiol.* 121 (6), 583–598.

Watanabe, M.F., Oishi, S., 1985. Effects of environmental factors on toxicity of a cyanobacterium (*Microcystis aeruginosa*) under culture conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* 49, 1342–1344.

WHO *Guidelines for drinking-water quality*. 3rd Edition, Volume 1. Recommendations. Geneva: World Health Organization; 2004.

Wiegand, C., Pflugmacher, S., 2005. Ecotoxicological effects of selected cyanobacterial secondary metabolites a short review. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 203 (3), 201–218.

Yosef, Y.B., Sukenik, A., Hadas, O., Yehudit, V.M., Aaron, K. 2010. "Enslavement in the Water Body by Toxic *Aphanizomenon ovalisporum*, Inducing Alkaline Phosphatase in Phytoplanktons". *Current Biology.* 20 (17): 1557–1561.

Yoshizawa, S., Matsushima, R., Watanabe, M.F., Harada, K.I., Ichihara, A., Carmichael, W.W., Fujiki, H. 1990. Inhibition of protein phosphatases by microcystin and nodularin associated with hepatotoxicity. *J Cancer Res Clin Oncol*;116:609-15.

Young, E. B., & Beardall, J. 2003. Photosynthetic function in *Dunaliella tertiolecta* (Chlorophyta) during a nitrogen starvation and recovery cycle. *Journal of phycology*, 39(5), 897-905.

Zhou, S., Shao, Y., Gao, N., Li, L., Deng, J., Zhu, M., Zhu, S., 2014. Effect of chlorine dioxide on cyanobacterial cell integrity, toxin degradation and disinfection by-product formation. *Science of the Total Environment* 482-483; 208-213.

Zohary, T., Yacobi, Y., Alster, A., Fishbein, T., Lippman, S., Tibor, G., 2014. Phytoplankton, in: *Lake Kinneret, Ecology and Management*, pp. 161–190. *Aquatic Ecology Series 6*, DOI 10.1007/978-94-017-8944-8_10.