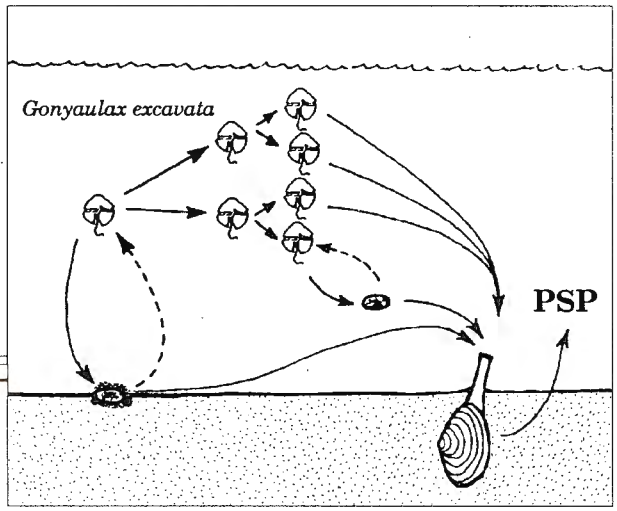
TOSSINE ALGALI



Il ripetersi di manifestazioni eutrofiche su vaste estensioni marine e la comparsa, anche in Italia, di alghe tossiche rendono di estrema attualità il tema delle tossine algali. Nell'intento di fornire ai lettori una rassegna sintetica sull'argomento, pubblichiamo il testo della lezione tenuta dalla prof.ssa Laura Volterra nell'ambito del corso "Eutrofizzazione delle acque marine costiere" svoltosi a Ferrara dal 10 al 15 ottobre 1988.

Considerata la vastità della letteratura esistente sull'argomento, rinviamo ad un prossimo numero la pubblicazione della bibliografia relativa. Non mancheremo di riportare annualmente un aggiornamento della bibliografia e delle nuove acquisizioni - in rapido sviluppo - sulla materia.

ALGHE PRODUTTRICI DI BIOTOSSINE

Laura Volterra(*)

I numerosi recenti dibattiti suscitati dalla frequente comparsa di maree colorate, particolarmente lungo le regioni costiere dell'Adriatico, hanno richiamato l'attenzione sui potenziali rischi per la salute pubblica, sulle conseguenze economiche e sulle implicazioni ecologiche dell'inquinamento.

I primi rapporti che documentano disturbi umani legati al consumo di frutti di mare contaminati da alghe tossiche risalgono al XVI-XVII secolo. Oggi c'è la consapevolezza crescente che questo fenomeno legato alla presenza di specie tossiche potrebbe praticamente presentarsi in tutte le regioni costiere del mondo. Esaurienti rapporti su questo argomento riguardano le aree cronicamente colpite come il Nord-Est e il Nord-Ovest dell'America del Nord, il Giappone, il Pacifico tropicale e il mare delle Antille.

Studi e osservazioni più recenti confermano la presenza di specie tossiche e il verificarsi di maree rosse nell'Atlantico, nel centro del Pacifico e nel Sud America, in Norvegia, Inghilterra, Italia, Francia, Spagna, Yugoslavia e Sud Africa. A seguito di una approfondita conoscenza del fenomeno e di una più esatta individuazione delle specie, le fioriture tossiche sono ormai riconosciute eventi globali.

Si noti che i termini "maree rosse" e "fioriture tossiche", pur essendo spesso usati come sinonimi, non sono reciprocamente scambie-

(*) Istituto Superiore di Sanità, Roma.

voli. Le "maree rosse" si riferiscono alla comparsa di una colorazione anomala dell'acqua marina o dolce per la presenza di elevate concentrazioni di microalghe (>10.000/ml). Questa anomalia non è limitata al colore rosso: spesso si osservano colori verde, marrone, giallo e loro intermedi. E' quindi più corretto parlare di "maree colorate". Le comunità fitoplanctoniche sono frequentemente dominate da una o più specie che possono produrre o meno tossine. Una marea colorata viene considerata tossica solo dopo che sono state identificate in essa specie tossiche e dopo che nelle acque o nei molluschi viene riscontrata la presenza di tossine.

D'altro canto la presenza di specie produttrici di tossine non necessariamente si accompagna al fenomeno delle maree colorate; più spesso, la presenza di specie produttrici di tossine è segnalata da molluschi tossici o da morie di pesci in aree ben localizzate.

La semplice presenza di alghe tossiche in aree costiere, tuttavia, non implica necessariamente un rischio per la salute pubblica.

Maree colorate possono anche essere prodotte da Protozoi. E' questo il caso del Ciliato *Mesodinium rubrum* che contiene nel citoplasma alghe simbionti dell'ordine delle Criptomonadali. La sua sovraccrescita si associa quindi, benchè organismo animale, ad elevati valori di clorofilla *a* e ad un'intensa produzione di ossigeno.

Alghe tossiche si ritrovano nei 5 phyla: Clorofite (alghe verdi), Cianofite (alghe blu o Cianobatteri), Crisofite (a cui appartengono tra l'altro le Diatomee), Pirrofite (Dinoflagellati), Rodofite (alghe rosse), ma le più note produttrici di biotossine sono certamente le alghe Dinoficee.

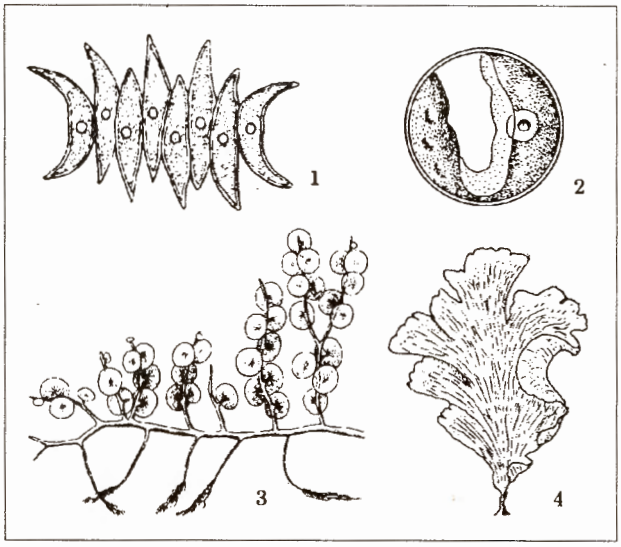
Gli effetti fisiologici delle biotossine algali vanno dalla tossicità acuta di *Gonyaulax excavata* - che può provocare la morte di animali a sangue caldo anche in tempo brevissimo - agli effetti cronici prodotti dall'alga rossa *Chondrus crispus*, la cui tossina produce cambiamenti oncogeni e ulcerativi nei tessuti, specie in quelli delle mucose intestinali, solo dopo prolungata esposizione.

ALGHE TOSSICHE

CLOROFITE

Tra le Clorofite, a parte *Chlorella* e *Scenedesmus* che sono state riportate come produttrici di tossine letali, la letteratura segnala *Caulerpa* spp., *Chaetomorpha minima* e *Ulva* spp.

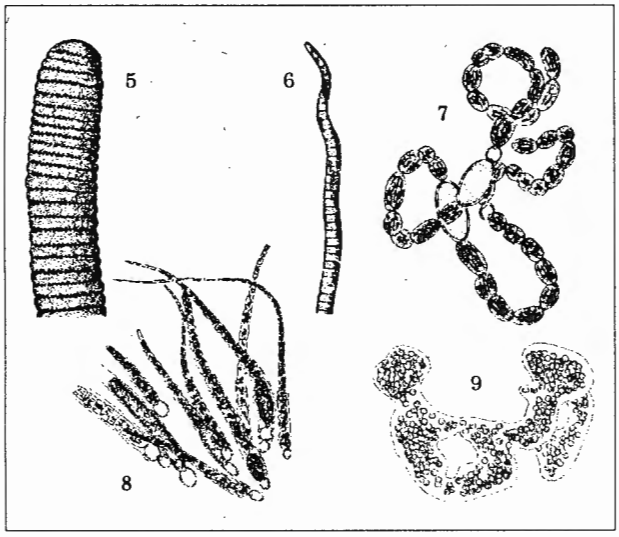
Caulerpa (*C. racemosa, C. sertularioides, C. lentillifera, C. lamourouxii*), sebbene nelle Filippine sia considerata alga commestibile, diviene tossica per l'uomo durante i mesi piovosi. La biotossina (caulerpina) è un composto eterociclico, derivato della pirazina, con effetto deprimente sulla respirazione. *Chaetomorpha minima* produce una sostanza tossica ad azione emolitica, costituita da acidi grassi, letale per il pesce *Oryzias latipes* alla concentrazione di 5 μg/ml dopo un periodo di esposizione di 120 minuti. Anche il veleno estraibile da *Ulva* ha una azione emolitica.



CLOROFITE - 1: *Scenedesmus falcatus*; 2: *Chlorella vulgaris*; 3: *Caulerpa macrodisca*; 4: *Ulva lactuca*.

CIANOFITE

Dei 50 generi appartenenti alle Cianoficee hanno manifestato caratteristiche tossiche: *Anabaena, Aphanizomenon, Coelosphaerium, Gloeotrichia, Lyngbya, Microcystis, Nodularia, Nostoc*. A parte gli effetti letali per gli animali che si abbeverano in bacini con fioriture tossiche, alcune alghe blu di acqua dolce, quali *Oscillatoria* e *Microcystis aeruginosa*, si possono ritrovare in rete nelle acque potabili, inducendo gastroenteriti nell'uomo. Attività cancerogene sono state messe in relazione con le esotossine prodotte da *Nostoc*. A Marakei - nelle isole Gilbert - *Schizothrix calcicola,* una Cianoficea marina, è stata ritenuta responsabile di episodi di tossicità per i pesci.



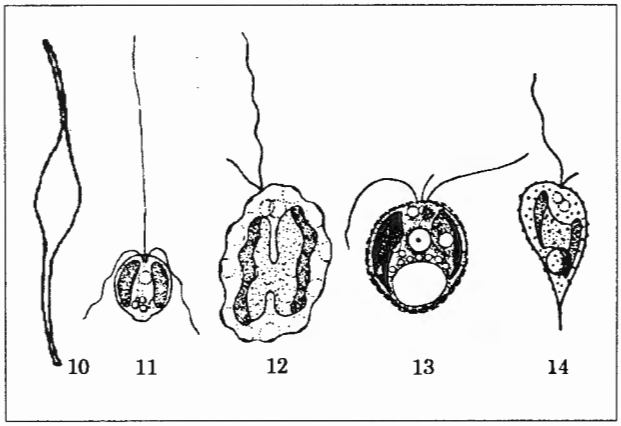
CIANOFITE - 5: *Oscillatoria margaritifera*; 6: *O. terebriformis*; 7: *Anabaena flos-aquae*; 8: *Gloeotrichia echinulata*; 9: *Microcystis aeruginosa.*

CRISOFITE

Alle Crisofite appartengono tre classi di alghe: Xantoficee, Crisoficee, Bacillarioficee. Enteriti granulomatose nel pesce *Catostomus commersonii* sono associate alla presenza di un gran numero di Diatomee nelle lesioni, lesioni simili a quelle della tubercolosi nei pesci, fatta eccezione per la presenza di cellule giganti. La formazione dei granulomi potrebbe essere dovuta ad una reazione dei tessuti intestinali allo scheletro siliceo o comunque al corpo estraneo delle Diatomee. E' stata anche ipotizzata la necessità della preesistenza di una lesione affinchè nella parete mucosa enterica possano penetrare le Diatomee.

Nell'inverno 1987, in Canada, sono stati registrati tre casi di morte associabili a consumo di molluschi - raccolti nella baia di Fundy - che avevano concentrato una Diatomea appartenente al genere *Nitzschia*. La specie, in via di classificazione, produrrebbe acido domoico. E' questa la prima segnalazione di una Diatomea che sarebbe implicata nella produzione di biotossine con effetti sull'uomo.

Alle Crisoficee appartiene *Prymnesium parvum*, alga associata da tempo a fenomeni acuti di ittiotossicità in Nord Europa e nel Medio Oriente. Alte concentrazioni di nutrienti, vitamina B12 e tiamina, unitamente ad una temperatura mite delle acque, scatenano la proliferazione dell'alga. La produzione della tossina è legata alla salinità, anche perchè *P. parvum* non si ritrova in acque che contengano meno di 0,12 % di NaCl. L'ambito ottimale per la sua crescita è compreso tra 0,3 % e 5 % di salinità, mentre la produzione massima di ittiotossina e di emolisina si ha intorno al 2%. Il gruppo di tossine estratto da *Prymnesium* è costituito da specie molecolari che estrinsecano 3 azioni: ittiotossica, emolitica, antispasmodica



CRISOFITE - 10: *Nitzschia closterium*; 11: *Chrysochromulina parva*; 12: *Ochromonas hovassei*; 13: *Prymnesium parvum*; 14: *Ochromonas viridis*.

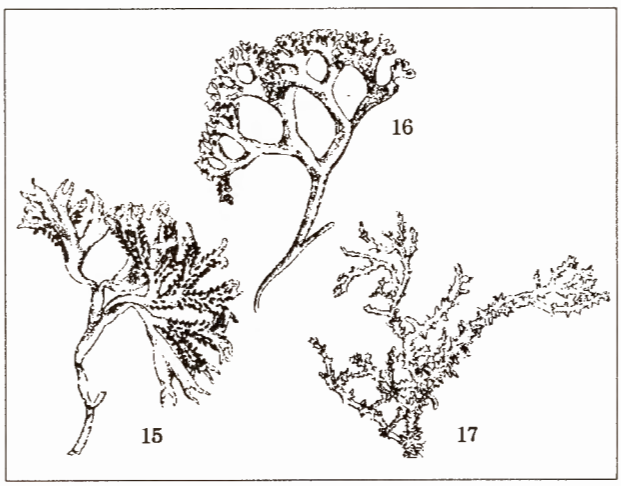
sulla muscolatura liscia. La tossicità di *Prymnesium* varia con la via di somministrazione.

Per via *i.p.* o *p.o.* sono richieste dosi maggiori di quelle necessarie per indurre la morte in un pesce immerso in acqua contenente le tossine. Vi è infatti un effetto sinergico tra ittiotossine e una varietà di cofattori (Ca^{++}, Mg^{++}, streptomicina, poliammine, neomicina, tensioattivi cationici) che riducono la quantità di veleno necessaria a provocare la morte. Si ipotizza che l'ittiotossina ed i cationi si leghino per formare un complesso più attivo. Tra le Crisoficee, anche da *Ochromonas* (*malhamensis, danica, minuta*) sono state isolate due frazioni biotossiche - Ts e Tm - di basso peso molecolare, solubili nei solventi polari (etanolo, metanolo, butanolo, acqua) ed entrambe dotate di attività ittiotossica, emolitica e antispasmodica. Al pari delle tossine derivate da *Prymnesium*, l'effetto è diverso in funzione della via di somministrazione (*i.p.* o immersione) poichè anche in questo caso entrano in gioco fattori di sinergismo.

Recentemente, nel maggio 1988, si è verificata una fioritura tossica nell'area Skagerrak-Kattegat che ha coinvolto Svezia, Norvegia e Danimarca. L'alga responsabile è stata individuata in *Chrysochromulina polylepis*, una Primnesioficea. L'evento, denunciato per primo da un allevatore di salmoni, ha avuto una grande risonanza per l'ampio spettro di organismi colpiti: dalle praterie sommerse di Rodoficee e Cloroficee a pesci, molluschi, organismi bentonici e uccelli. L'alga, i cui effetti tossici sono simili a quelli del *Prymnesium parvum*, causa danni alla membrana cellulare e cambiamenti nel bilancio ionico. Come regola generale, infatti, gli effetti ittiotossici, citotossici ed emolitici, implicano un meccanismo di alterazione della permeabilità della membrana cellulare. I danni all'ambiente sono stati più rimarchevoli nelle zone a bassa salinità (15%) e a profondità di 20 m. La concentrazione algale ha raggiunto anche valori di 10.000.000 di cellule/l. I pesci colpiti avevano gli epiteli delle branchie rigonfi e coperti di muco. I pesci cercavano di allontanarsi dall'area del disastro ecologico nuotando verso maggior profondità o verso acque dolci: così *Labrus bergylta* è stato catturato a profondità mai raggiunte prima (70-160 m). L'alga responsabile del bloom ha portato ad un impoverimento delle praterie di Rodoficee: queste divenivano prima fluorescenti, alcune sbiancavano e poi morivano, andando in decomposizione. Sul materiale animale e vegetale morto e nelle zone anossiche compariva *Beggiatoa*.

RODOFITE

I polisaccaridi estratti da Rodoficee (*Chondrus, Gigartina, Hypnea, Rhodymenia, Iridaea, Gracilaria, Furcellaria, Polydes, Eucheuma*) possono indurre una tossicità cronica. Assume, quindi, grande importanza l'esecuzione di saggi tossicologici con lunghi tempi di esposizione, tenuto anche conto del largo impiego di questi componenti chimici come additivi nell'industria alimentare. Alcuni ricercatori hanno messo in evidenza tumori colon rettali in ratti ai quali veniva somministrata quotidianamente farina algale *p.o.* La somministrazione, oltre a risultare epatotossica, provocherebbe coagulazioni intravascolari per la formazione di trombi.



RODOFITE - 15: *Gigartina mamillosa*; 16: *Chondrus crispus*; 17: *Eucheuma muricatum*.

PIRROFITE

Sebbene specie tossiche siano presenti - come si è visto - in vari phyla di alghe, sono indubbiamente le Pirrofite le principali produttrici di biotossine algali: quelle cioè note con il termine di PSP, NSP, DSP, ciguatera, VSP. Si tratta di veleni ad attività neurotropa, ad eccezione del DSP che è enterotropo e del VSP e della ciguatera che hanno azioni miste.

I Dinoflagellati, unicellulari e dotati di spiccata mobilità, misurano circa 50 μm. Per la maggior parte sono organismi fotosintetici che, spesso, nel ciclo di vita comprendono cisti resistenti che possono essere tossiche o meno.

I Dinoflagellati che producono tossine sono in gran parte marini. Hanno un tempo di raddoppiamento di 1-2 giorni (ad esempio per il *Gymnodinium breve* è di 3,3 giorni) con fioriture che si sviluppano, in condizioni ottimali, in 2-3 settimane dall'apparire delle prime cellule, sempre che le condizioni ambientali siano favorevoli. Le fioriture si verificano - nell'emisfero Nord - lungo le coste della California, della British Columbia, della Florida, del Messico, del Giappone, del Mare del Nord, della Manica e del Mare Baltico e - nell'emisfero Sud - in Sud Africa e in Nuova Zelanda. Le specie più implicate, ma non le uniche, sono riportate in Tabella 1. Alcune di esse sono tossiche per gli animali acquatici. Solo per alcune di esse sono stati identificati i principi tossici messi in evidenza dal saggio biologico (+). In alcuni casi la dimostrazione della tossicità è funzione dei metodi estrattivi eseguiti (+-). L'elenco non esaustivo riportato in Tabella 1 vuole mettere in rilievo la complessità e vastità dell'argomento.

Gonyaulax polyedra, sospettato di produrre saxitossina nel 1962, sembra privo di tossicità se l'estrazione è seguita da una purificazione su resina a scambio ionico; sembra invece capace di produrre i principi tossici sopra accennati se la purificazione è effettuata per cromatografia su carta. Non è possibile approfondire la questione poichè oggi si è persa traccia di

Tabella 1. Alghe Dinoflagellate riportate in letteratura come produttrici di biotossine.

PSP = Paralytic Shellfish Poisons; NSP = Neurotoxic Shellfish Poisons; VSP = Venerupin Shellfish Poisons; DSP = Diarrhoeic Shellfish Poisons; CTX = CiguaToXins; + = presenza di biotossine non identificate; +-? = presenza/assenza di biotossine in funzione dei metodi estrattivi eseguiti o delle fonti bibliografiche.

Specie	Tossina
Amphidinium carterii	CTX
Amphidinium klebsii	CTX
Amphidinium rhynocephalum	+
Ceratium furca	ittiotossine
Coolia monotis	+
Dinophysis acuminata	DSP
Dinophysis acuta	DSP
Dinohysis fortii	DSP
Dinophysis norvegica	DSP
Exuviaella mariaelebouriae	PSP, VSP
Gambierdiscus toxicus	CTX
Gessnerium mochimensis	PSP
Gonyaulax sp. (Giappone)	PSP
Gonyaulax acatenella	PSP
Gonyaulax catenella	PSP
Gonyaulax grindley	ittiotossine
Gonyaulax moniliata	ittiotossine
Gonyaulax polyedra	+-?
Gonyaulax tamarensis	PSP
Gymnodinium sp. (USA)	+
Gymnodinium breve	NSP
Gymnodinium catenatum	PSP
Gymnodinium splendens	+
Gymnodinium veneficum	ittiotossine
Gyrodinium aureulum	+
Noctiluca miliaris	ittiotossine
Noctiluca scintillans	ittiotossine
Ostreopsis ovata	+
Ostreopsis siamensis	+
Peridinium foliaceum	+-?
Peridinium polonicum	+
Prorocentrum concavum	CTX
Prorocentrum lima	DSP, CTX
Prorocentrum micans	PSP, VSP
Prorocentrum minimum	VSP
Prorocentrum rhathymum	CTX
Pyrodinium bahamense	PSP
Pyrodinium phoneus	PSP

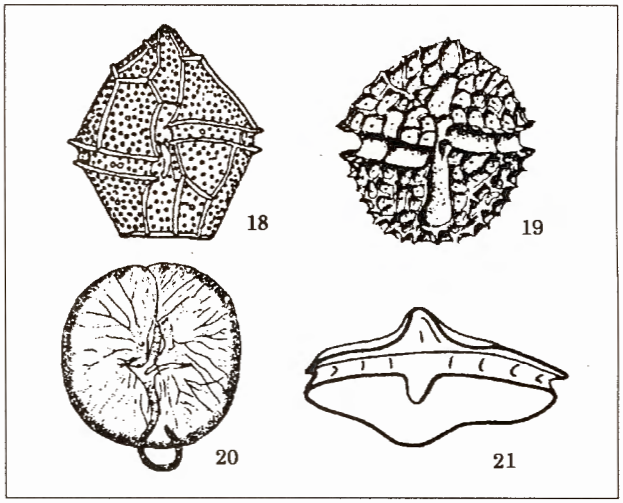
questo particolare stipite algale; non si può escludere tuttavia la sua esistenza visto che, per una stessa specie e anche in una stessa area, possono essere presenti ceppi tossici accanto a ceppi atossici.

Delle quasi 1000 specie di Dinoflagellati, solo il 20-25% sono considerate tossiche. Queste specie, quando generano fioriture - che possono svilupparsi sia in acqua marine costiere sia nei laghi - dominano con più dell'80% l'intera biomassa fitoplanctonica. Gli episodi di tossicità possono essere di breve durata o persistere per settimane o anche parecchi mesi. Possono essere continui, come accade in varie regioni del nord America e del Pacifico tropicale e dei Caraibi, o limitati a ben precisi periodi dell'anno, ma comunque non pronosticabili di anno in anno.

In 21 anni di osservazioni sulle "maree rosse" in Sud Africa, solo alcuni dei 13 episodi registrati erano sostenuti da organismi tossici. Quasi tutte le fioriture erano generate da specie pelagiche di organismi autotrofi, con le uniche eccezioni di *Noctiluca miliaris* - un eterotrofo comune anche lungo le coste dell'Adriatico - e di *Mesodinium rubrum*, un Ciliato con alghe endosimbionti. Alcune delle specie responsabili dei blooms, come *Prorocentrum micans* e *Dinophysis acuminata*, provenivano dall'intera colonna d'acqua o dal fondo, come specie bentiche associate alla sabbia o altri substrati. Steidinger, appunto, nel 1983 divide i dinoflagellati in specie pelagiche e bentiche e nota differenze nelle tossine associate a ciascun tipo.

In Sud Africa *Gonyaulax catenella* produce vasti areali di maree rosse con alta mortalità anche per i molluschi *Choromitylus meridionalis* e *Donax serra*. Si pensa che questa specie sia anche la responsabile della continua tossicità del mollusco dell'Alasca *Saxidomus giganteus*.

In Florida un ceppo di *Gonyaulax moniliata* causa ondate di maree rosse accompagnate da morie di pesci ed avvelenamenti umani da consumo di molluschi. Questa specie, come *G. catenella*, forma cisti che possono servire da sistema di sopravvivenza e di riproduzione quando le condizioni ambientali divengono sfavorevoli. Un'altra specie tossica comune ad entrambe le regioni menzionate è *Gonyaulax grindleyi*, un'alga bentonica che diede luogo a maree rosse in Sud Africa nel 1966, 1967 e 1974, con concentrazioni variabili tra 2 e 12 milioni di cellule/l. Durante queste fioriture morirono grandi quantità di molluschi, pesci e uccelli e si segnalarono sintomi di avvelenamento da molluschi nelle persone. E' interessante notare che questa specie, come *Pyrodinium bahamense* e *Protogonyaulax tamarensis*, è bioluminescente; la sua fioritura, pertanto, è visibile anche di notte.



PIRROFITE - 18: *Gonyaulax polyedra*; 19: *G. grindley*; 20: *Noctiluca scintillans*; 21: *Ptychodiscus* sp.

TOSSINE ALGALI

PSP

Il termine PSP significa Paralytic Shellfish Poisoning o Poisons. Si tratta di un gruppo di tossine prodotte per lo più da dinoflagellati unicellulari del genere *Gonyaulax* (*G. excavata, G. tamarensis, G. catenella, G. acatenella*), da *Prorocentrum micans, Exuviaella*

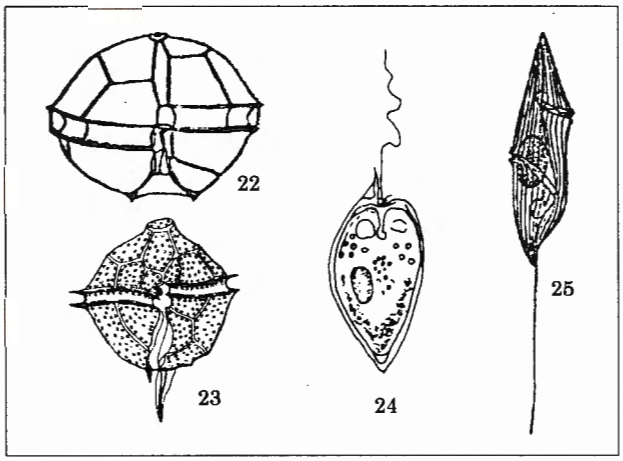
mariaelebouriae e *Pyrodinium* (*P. bahamense* e *P. phoneus*) e forse da una forma coloniale a catenella di *Gessnerium mochimensis*, e inoltre da una Cianoficea di acqua dolce, *Aphanizomenon flos-aquae*, e dalla Rodoficea macrofita marina *Jania* sp.

Il primo veleno del gruppo PSP, caratterizzato chimicamente come una tetraidropurina, fu la saxitossina, così detta perchè estratta ed isolata da *Saxidomus giganteus*, il mollusco dell'Alaska sempre tossico che, caso unico tra i molluschi, accumula la biotossina nei sifoni anzichè nell'epatopancreas. Oggi ne sono state identificate altre 12, alcune di tossicità paragonabile alla saxitossina (neosaxitossina, goniautossina I e III, decarbamilsaxitossina), altre meno tossiche. La saxitossina ha un ampio spettro di azione. In una stessa specie la tossicità acuta è influenzata dalla via di somministrazione. Così nel topo la DL_{50} per via parenterale è di 3-10 μg/Kg a seguito di una dose *per os*.

Non tutte le alghe produttrici di PSP ne producono agli stessi titoli. Nel genere *Gonyaulax* le specie *G. tamarensis* e *G. acatenella* sono le più tossiche. All'interno della stessa specie, ad esempio *G. tamarensis*, esistono, persino nella stessa località, ceppi tossici accanto a ceppi non tossici. Questa osservazione, sotto il profilo biochimico, potrebbe indicare che le tossine PSP sono metaboliti secondari, simili alle tossine prodotte da funghi microscopici (micotossine), ma si sa poco o nulla sulle loro vie biosintetiche.

I molluschi filtratori non concentrano le alghe in egual misura; non tutti, quindi, sono egualmente vettori di PSP. I maggiori accumulatori di queste biotossine sono membri delle famiglie dei Mactridae, Myacidae, Mytilidae, Veneridae. Raramente si trova veleno PSP in ostriche o *Pecten*.

In uno studio condotto lungo le coste nord-orientali dell'Inghilterra, in un'area soggetta a blooms tossici di *G. tamarensis* e popolata da specie diverse di molluschi, si è notato come



22: *Gonyaulax catenella*; 23: *Pyrodinium* sp.; 24: *Prorocentrum micans*; 25: *Gyrodinium spirale*.

queste accumulino tossine in modo differenziato. I *Cardium* e *Mya arenaria* contengono rispettivamente 1/6 e 1/13 del titolo raggiungibile nei mitili. Questi ultimi, se si trovano in fondali poco profondi, accumulano più tossine degli organismi della stessa specie che vivono a maggiori profondità. Tale fatto è verosimilmente attribuibile alla temperatura più elevata riscontrabile negli strati superficiali: questa, attivando il metabolismo dei lamellibranchi, indurrebbe un notevole incremento del volume di acqua filtrato, che si tradurrebbe in una maggior ingestione di microalghe.

Il tossico o i tossici vengono trasformati lungo la catena alimentare. Così *Placopecten magellanicus* ha uno spettro di tossine simile a quello delle cisti di *Gonyaulax*. *Saxidomus* è sempre tossico, a differenza di altri molluschi eduli lamellibranchi della stessa area, probabilmente perchè trasforma le goniautossine meno tossiche in saxitossina. Tale trasformazione è stata dimostrata in *Placopecten*, il cui omogenato di organi motori, addizionato con una miscela di goniautossine e neosaxitossina, genera saxitossina.

Nei molluschi eduli lamellibranchi i Dinoflagellati passano dalle branchie all'esofago e quindi nell'epatopancreas, dove apparentemente si legano a melanine. PSP si trova anche

negli altri tessuti dell'animale. Il veleno si distribuisce diversamente nelle varie parti del corpo non solo in funzione della specie ma anche delle stagioni. In estate il sito preferenziale è la ghiandola digestiva, seguita dalle branchie e dalle gonadi, quindi dalla massa muscolare e dai sifoni. Con il procedere delle stagioni, passando all'autunno e all'inverno, la ghiandola digestiva si riduce e perde conseguentemente veleno più rapidamente delle branchie. Come si è detto, la concentrazione del veleno varia nei diversi organi anche in funzione della specie. Sebbene i sifoni rappresentino un organo con scarsa capacità di concentrazione nei confronti delle tossine del PSP, in un caso specifico - quello del *Saxidomus giganteus* - sono proprio questi organi il luogo preferenziale di accumulo.

A parte i casi di PSP registrati in Sud Africa (*Choromytilus meridionalis* e *Donax serra* rimangono spesso paralizzati durante le fioriture di *Gonyaulax catenella*), in genere i molluschi non sembrano danneggiati dalla presenza di PSP, sebbene a volte sia stata osservata una diminuzione della loro capacità filtrante. Qui bisognerebbe distinguere l'effetto di intasamento meccanico delle branchie dovuto alle alte concentrazioni fitoplanctoniche da quello propriamente tossico. Nel caso di una fioritura di *Gyrodinium aureulum* la capacità filtrante di *Mytilus edulis* passava da 2,52 l/h a 0,18 l/h dopo 5 h di esposizione all'alga tossica. Tale riduzione non si verificava se il *Gyrodinium* era sostituito da una normale flagellata non tossica. Il mollusco reagiva all'alga tossica aprendo le valve e secernendo il bisso, mentre il sifone esalante si occludeva. Le cellule mobili di *Gyrodinium* si trovavano nelle branchie e nello stomaco indicando che l'alga era stata ingerita. Dopo 5 h di esposizione si osservava degenerazione delle cellule dell'apparato digerente, con una generalizzata vacuolizzazione e perdita degli eterofago-lisosomi: ciò dimostrerebbe che il Dinoflagellato produce una sostanza entro certi limiti citotossica per il mollusco. Tuttavia il mollusco si riprende se il bloom declina in un tempo sufficientemente breve. Queste osservazioni non sono generalizzabili a tutti i molluschi e a tutte le alghe tossiche perchè i molluschi si comportano diversamente per quanto riguarda la filtrazione di batteri e fitoplancton dall'ambiente. Così di 3 specie di molluschi - *Mytilus edulis, Geukensia demissa* e *Mya arenaria* - solo *Geukensia* ha una spiccata selettività per i batteri, dovuta a spazi interbranchiali più stretti e a un maggior numero di ciglia laterali filtranti che si sovrappongono. Non sembra quindi esistere una regola generale per ciò che attiene la capacità di concentrazione dei molluschi: essi, cioè, non concentrano indiscriminatamente tutto ciò che trovano nell'ambiente.

Da studi sull'effetto tossico della saxitossina sui nervi dei bivalvi risulta che le specie che accumulano PSP - come *Mytilus edulis, Mytilus californianus, Placopecten magellanicus, Saxidomus giganteus* e *Mya arenaria* - sono resistenti alla saxitossina, mentre altre specie sono 100 volte più sensibili di quelle resistenti.

Per indurre artificialmente la detossificazione dei molluschi sono stati avviati molti studi. Sembra che l'esposizione ad alte temperature e ad elevate salinità acceleri questo processo. Spesso, però, quando si mette il mollusco in acque più salate, si osserva inizialmente un aumento di tossicità, seguito dalla diminuzione: questa sembra essere una risposta caratteristica.

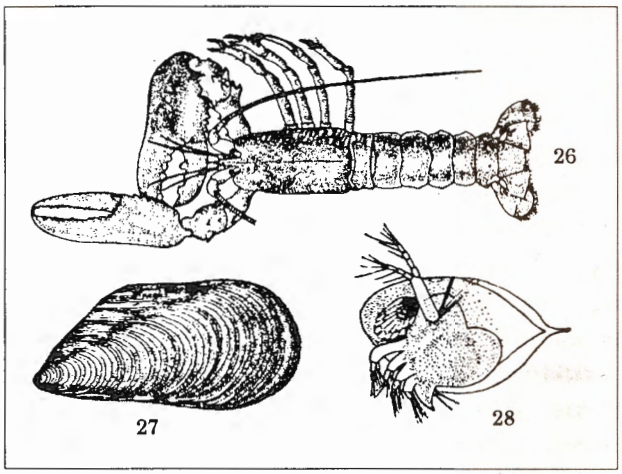
Dopo 20 minuti di cottura persiste il 60,5% delle tossine inizialmente presenti: il 28,5% nella carne e il 32% nel sugo. Un singolo mollusco di 6 g raccolto in un'area in cui si sia sviluppata una fioritura di *Gonyaulax tamarensis* può contenere una media di 1750 Unità Topo (UT o Mouse Unit = MU) di tossina, ma dopo una cottura di 20 minuti tale titolo scende a 500 unità, facendo riferimento alla sola carne. Il lavaggio in acqua corrente non riduce,

invece, il titolo della tossina nel mollusco.

PSP è stato anche trovato in gasteropodi carnivori, come *Buccinum undatum*, concentrato nella ghiandola digestiva. Anche nei visceri di alcune chiocciole di mare - *Turbo argyrostoma, Turbo marmorata, Toctus nilotica maxima* e *Toctus pyramis* - sono state trovate PSP. In questi casi, accanto a saxitossina e a neosaxitossina, è stata identificata una nuova tossina detta TST, prevalente sulle prime due. Poichè nell'intestino di questi animali sono stati rinvenuti frammenti della Rodoficea *Jania*, è stato presunto che questa fosse l'origine della tossina.

Tra i Crostacei, i granchi delle barriere coralline sono stati spesso implicati in episodi di avvelenamento per l'uomo; casi sono stati registrati nelle isole Fiji, in Giappone, nelle Filippine. In USA è stato osservato che l'astice *Homarus americanus* può essere vettore delle biotossine PSP. In quest'ultimo caso la tossina era limitata all'apparato digerente, non si trovava cioè diffusa nelle parti muscolari. Mentre per i granchi l'origine della tossicità poteva essere legata all'assunzione dell'alga *Jania*, per gli astici essa era probabilmente dovuta ad una alimentazione a base di molluschi filtratori che avevano concentrato Dinoflagellati.

Gli episodi di morie di pesci dimostrano come il PSP possa trasmettersi ad altri animali acquatici attraverso la catena alimentare. La perdita di enormi quantità di aringhe (*Clupea harengus*) e sogliole (*Ammodytes* sp.) registrata nel Mar del Nord e nella Baia di Fundy in Canada ne sono un esempio. Nello stomaco di questi pesci zooplanctofagi fu trovato lo pteropode *Limacina retroversa*, nel cui stomaco era presente *Gonyaulax excavata*. Lo zooplancton raccolto a 3 settimane dal picco della fioritura conteneva ancora l'alga, indicando la potenzialità di un bioaccumulo e di un lento rilascio della biotossina. In una moria di aringhe avvenuta nel 1980, nello stomaco dei pesci fu ritrovato un altro zooplanctonte,



26: *Homarus vulgaris*; 27: *Mytilus galloprovincialis*; 28: *Evadne* sp.

Evadne nordmanni, che in questo caso funzionava da vettore di *Gonyaulax excavata*; il Cladocero conteneva 18 μg di saxitossina equivalente/g di animale (peso umido). E' stato dimostrato che anche il copepode *Acartia clausii* e il nauplio del *Balanus* ingeriscono l'alga tossica raggiungendo il massimo di accumulo dopo 6 h senza nessun effetto negativo apparente. Per lo più il PSP nei pesci non è stato rinvenuto nel muscolo. A loro volta i pesci che abbiano accumulato la tossina PSP possono trasmetterla a uccelli marini che, quindi, possono morire. La morte in massa di uccelli nel Mare del Nord fu un evento registrato in 2 dei 3 casi di maree rosse da alghe tossiche verificatesi tra il 1968 e il 1976.

Le maree rosse sono essenzialmente un fenomeno costiero. Bisogna, però, tenere presente che una marea rossa di Dinoflagellati non necessariamente prelude ad una epidemia di PSP. E' stato ipotizzato che le acque meteoriche dilavanti siano il fattore di iniziazione, assieme alla presenza di sostanze chelanti e di metalli in tracce. *Gonyaulax tamarensis* è più sensibile di altre forme fitoplanctoniche agli ioni Cu^{++} e cresce bene solo quando la concentrazione di ioni rame diminuisce. Recenti dati suggeriscono che zone frontali o di discontinuità tra masse d'acqua siano i fattori che

probabilmente influenzano lo sviluppo delle maree rosse. Queste zone frontali possono essere il risultato di convergenze generate da maree o dal vento o anche da fenomeni di upwelling.

I massimi stagionali di *Gonyaulax tamarensis* si associano spesso a basse salinità e alte temperature. La temperatura certamente influenza l'abbondanza di *Gonyaulax tamarensis* sia in natura sia in laboratorio, ma vi sono evidenze che essa non rappresenti il fattore principale. Ad esempio, nella baia di Fundy, la maggior concentrazione di *Gonyaulax* si ha in settembre, cioè in condizioni di maggior limpidezza delle acque. Prakash e Medcof hanno mostrato che la tossicità nei molluschi è più correlata con le ore di illuminazione che con le alte temperature. Inoltre *Gonyaulax tamarensis* non necessita di N e P, ma di promotori organici come le vitamine: la B12, la tiamina e la biotina sono fattori essenziali per la sua crescita. Piccole quantità di acidi umici e fulvici ne stimolano la crescita. Lo stesso dilavamento dei suoli può quindi svolgere un ruolo sostanziale nelle abbondanze stagionali di *Gonyaulax tamarensis*. Nel fiordo di Oslo in Norvegia, le fioriture di *Gonyaulax tamarensis* sono associate all'arricchimento delle acque di mare con i reflui urbani. Nel fiordo di Trodheims esse si correlano con il dilavamento delle acque convogliate dal fiume che si getta nel fiordo. Come si vede non esiste omogeneità di vedute sulle cause che scatenano il fenomeno.

Una volta che una fioritura si sia formata si possono raggiungere concentrazioni di *Gonyaulax* di 10.000 - 1.000.000 di cellule/l. Fattori fisici e idrografici possono trasportarla in aree specifiche, mentre fattori biologici tipici dell'alga, quali la fototassi positiva, può aumentarne la concentrazione in superficie. Questa catena di concause favorenti l'accumulo di alghe in una specifica zona può essere interrotta da eventi meteorologici quali piogge e vento. Un fattore limitante nella abbondanza estiva di *Gonyaulax tamarensis* è il pascolo dello zooplancton. La comparsa simultanea di un Ciliato Tintinnide, *Favella enrhenbergii*, e di *Gonyaulax tamarensis* nella baia di Fundy limita la crescita di quest'ultimo. Anche *Favella panamensis* sembra essere predatore di *Gonyaulax tamarensis*. Il genere *Favella* inoltre limita la sua stagione di crescita a quella propria di *Gonyaulax tamarensis*. Anche endosimbionti come il Dinoflagellato *Amoebophrya caratii*, possibile simbionte di *Gonyaulax catenella*, può indurre un rapido declino della fioritura algale.

CIGUATERA

La ciguatera è una forma di intossicazione trasmessa da pesci delle aree subtropicali. Questo avvelenamento risulta da un accumulo di tossina attraverso vari livelli trofici. Gli erbivori ed i raschiatori di substrato si intossicano ingerendo *Gambierdiscus toxicus*, un Dinoflagellato che costituisce il perifiton che colonizza la superficie delle macroalghe e dei coralli della barriera corallina. Lungo la catena alimentare, passando dai carnivori primari ai secondari e all'uomo, la tossina si concentra, divenendo più pericolosa.

Casi di ciguatera avvengono nell'area caraibica dell'oceano Pacifico tra i 35 gradi di latitidune Nord e Sud. Anche in questo caso si tratta di una miscela di tossine note sotto il gruppo della ciguatera. La più nota è la ciguatossina, un lipide molto ossigenato con una massa stimata di 1111,7 (± 0,3) e possibile formula $C_{53}H_{77}NO_{24}$ o $C_{54}H_{78}O_{24}$. Accanto ad essa c'è la maitotossina idrosolubile e la scaritossina liposolubile.

Accanto a *Gambierdiscus toxicus* - isolato a Tahiti e nell'isola Gambier ed imputato come produttore di questo gruppo di tossine - si è accertato che anche *Prorocentrum lima, Prorocentrum concavum, Prorocentrum rhathymum* e *Amphidinium carterii* e *klebsii*, due altre specie di Dinoflagellati bentici, unitamente ad altri Dinoflagellati ritrovati nei visceri di pesci ciguaterici, di granchi e di gasteropodi raschia-

tori, producono ciguatossine.

La ciguatera si trasmette all'uomo attraverso il consumo di pesci e gasteropodi tropicali che si siano nutriti di questo materiale o che siano in grado, come i pesci pappagallo, di utilizzare la sostanza organica contenuta nei coralli.

L'ultimo rapporto (1982) di avvelenamento da ciguatera coinvolse i 22 membri italiani dell'equipaggio della nave cisterna Coraggio che mangiarono, dopo averli catturati, 12 Kg di barracuda vicino alle isole Bahama. Diciotto membri dell'equipaggio che soffrivano di avvelenamento da ciguatera dovettero essere dirottati a Miami, in Florida, per il trattamento ospedaliero.

Più di quattrocento pesci ossei che si cibano di alghe o del detrito della barriera corallina possono essere vettori di ciguatossine. La concentrazione maggiore si ritrova nell'apparato digerente, nel fegato, nella carne, ma massimamente nell' intestino degli animali ciguaterici, sebbene non in tutti i pesci di una popolazione allo stesso livello. Ciò infatti dipende dalle abitudini alimentari di ciascun soggetto.

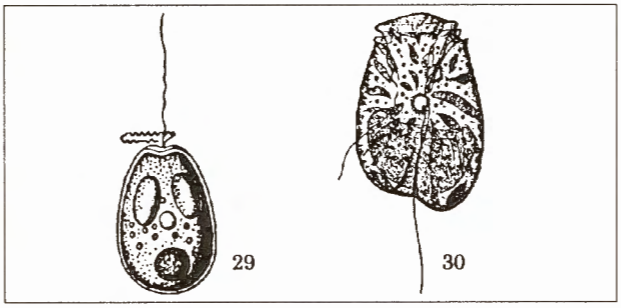
Per ciò che rigurda la ciguatera, Randall ipotizzò che i disturbi e le alterazioni della barriera corallina siano responsabili dello sviluppo delle macrofite sulle quali, in seguito, si insediano *Gambierdiscus* e le altre microalghe bentoniche. Esperienze raccolte da ricercatori nella Polinesia francese mostrano che gli uragani, le tempeste, le opere dell'uomo - come la distruzione di tratti di barriera per la costruzione di moli o di porti e il raschiamento dei fondali ad opera delle ancore - comportano un incremento dei pesci ciguatossici che può perdurare anche 10-15 anni dopo l'avvenuta alterazione.

La problematica della tossicità dei Dinoflagellati bentonici si complica se queste alghe vengono saggiate sistematicamente. Su 9 specie bentoniche saggiate sono stati osservati tre tipi di tossicità (vedi tabella a fondo pagina).

La capacità emolitica di *Amphidinium carterii* è simile a quella di *Prymnesium parvum* che produce la più potente emolisina finora conosciuta. *Prorocentrum concavum* produce una ittiotossina simile per potenza a quella di *Ptychodiscus brevis* (=*Gymnodinium breve*).

Ceppi di *Gambieridiscus toxicus* in laboratorio cessano di produrre le tossine liposolubili a favore della sola maitotossina. La maggior parte degli studi sulla ciguatera è stata condotta estraendo le tossine dal fegato del merluzzo.

Inoltre, coltivando specie algali bentoplanctoniche derivate da biotopi ciguaterici, è emerso come molte di esse in coltura non axenica producessero uno dei veleni del gruppo Ciguatera: la maitotossina. Oggi si sa che anche batteri marini producono maitotossina. Di qui l'importanza di eseguire colture axeniche per definire le biotossine prodotte dalle alghe.



29: *Prorocentrum lima*; 30: *Amphidinium* sp.

Tossicità su topi	Emolisi	Ittiotossicità
Gambierdiscus toxicus	*Amphidinium carterii*	*Prorocentrum concavum*
Prorocentrum lima	*Amphidinium klebsii*	*Amphidinium carterii*
Prorocentrum concavum	*Coolia monotis*	*Amphidinium klebsii*
Ostreopsis siamensis	*Prorocentrum rhathymum*	*Ostreopsis ovata*

NSP

Associate a fioriture di *Gymnodinium breve* (oggi *Ptychodiscus brevis*) lungo le coste della Florida sono state identificate due nuove sindromi: l' NSP (Neurotoxic Shellfish Poisoning o Poisons) legato al consumo di molluschi contenenti cellule o metaboliti tossici di *Gymnodinium breve* con sintomi prevalentemente neurotossici analoghi a quelli del PSP eccetto che per il fatto che non interviene paralisi; l'NSP caratterizzato da sintomi respiratori e connessi con l'esposizione ad aerosoli di *Gymnodinium breve.*

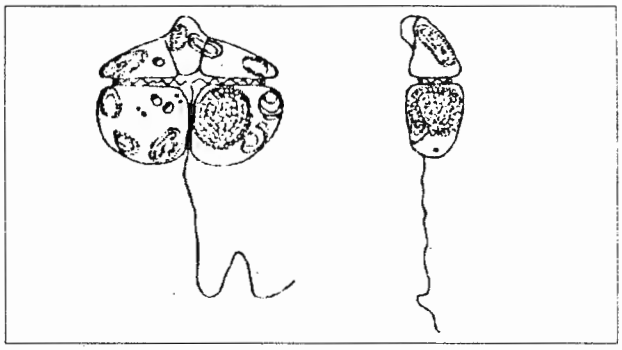
Sono stati isolati quattro componenti tossici; di 3 di essi - brevetossina B, brevetossina C e tossina GB-3 - è oggi nota la struttura chimica. Questa, simile nelle tre tossine, è costituita da un'unica catena di carbonio, chiusa in una struttura rigida a pioli costituita da 11 anelli eterei. I composti, solubili in solventi organici, sono instabili in cloroformio; ciò ha causato difficoltà nei primi tentativi di isolamento delle tossine.

Le fioriture di *Gymnodinium breve* si verificano ogni 3-4 anni e causano estese morie di pesci. Questo Dinoflagellato nudo forma fioriture al largo del golfo del Messico (18-74 Km); queste, sotto condizioni idrologiche e meteorologiche favorevoli, possono essere trasportate in regioni costiere dove si verificano morie di pesci e concentrazioni di tossine nei molluschi. Questa specie, che in fase di fioritura forma dense macchie colorate nell'acqua, non sembra produrre cisti.

Le cellule nude di *Gymnodinium* sono fragili e si rompono nel passaggio attraverso le branchie rilasciando la tossina che, tramite il sangue che irrora le branchie, conduce rapidamente a morte il pesce: questo perde l'equilibrio, boccheggia in superficie e quindi, trasportato verso il fondo, muore senza che sia riscontrabile alcuna lesione patologica.

Nel 1947 una marea rossa di *Gymnodinium breve* perdurò per 9 mesi con concentrazioni variabili tra 400.000 e 60.000.000 organismi/l. Numerose specie animali furono colpite dalla fioritura; morirono anche gli uccelli che si erano nutriti dei pesci colpiti dalle tossine.

Le maree di *Gymnodinium breve* si originano al largo in tarda estate e nell'autunno. Il contenuto di ferro nelle acque potrebbe essere predittivo: è stato infatti osservato - immediatamente prima dello sviluppo di un bloom algale - un massimo di concentrazione del ferro.



31: *Ptychodiscus brevis* (= *Gymnodinium breve*): visione dorsale e laterale

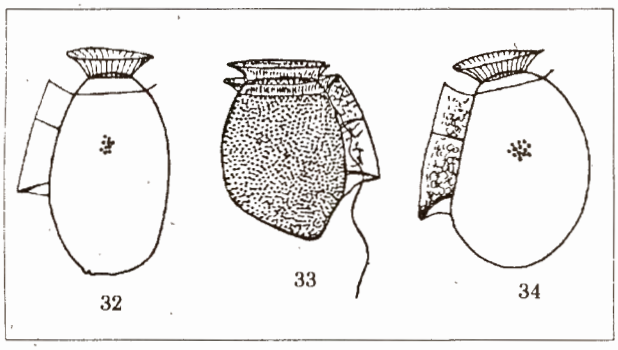
DSP

Una intossicazione caratterizzata da disturbi intestinali spesso associata a consumo di molluschi è denominata DSP (Diarrhoeic Shellfish Poisoning o Poisons). DSP si riscontra nei paesi orientali (Giappone e Tailandia), Europa (Francia, Irlanda, Olanda, Norvegia, Spagna, Svezia e oggi anche Italia), Sud Africa.

Dinophysis fortii (Giappone), *Dinophysis acuminata* (Olanda), *Dinophysis acuta* (Cile) e *Prorocentrum lima*, un Dinoflagellato bentonico, sono gli agenti causali di questa sindrome. Nei molluschi sono stati riconosciuti 9 composti tossici, 5 dei quali caratterizzati chimicamente. Queste tossine sono classificate in 2 gruppi: acido ocadaico e suoi derivati - detti dinofisitossine - e pectentossine.

Le specie di *Dinophysis* sono ampiamente distribuite, ma solo casualmente danno origine a fioriture. Si è osservato però che, già in presenza di una densità di *Dinophysis fortii* inferiore a 200 cellule/l, mitili e *Pecten* divengono

abbastanza tossici per l'uomo. Il periodo di infestazione in Giappone è compreso tra aprile e settembre.



32: *Dinophysis acuminata*; 33: *D. acuta*; 34: *D. fortii.*

VSP

Un ultimo tipo di biotossine prodotte da Dinoflagellati è il VSP (Venerupin Shellfish Poisoning o Poisons), attribuito all'alga *Prorocentrum minimum* var. *mariaelebouriae* (o *Exuviaella mariaelebouriae*) identificata in Giappone nel 1950. La sintomatologia è affine a quella del PSP, ma non è così grave e si associa a disturbi gastrointestinali.

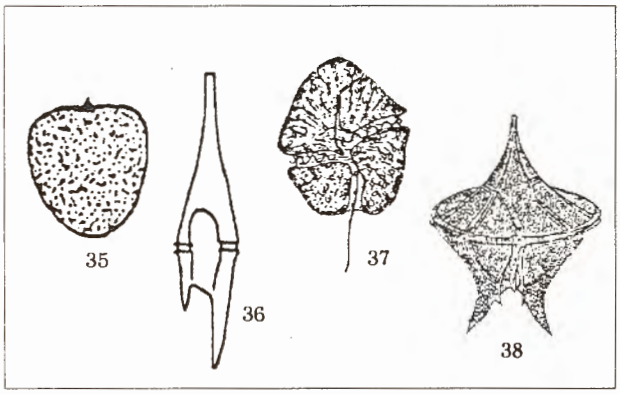
Nel 1942 la tossina, concentrata da *Tapes semidecussata*, diede luogo in Giappone a 324 casi di avvelenamento, 114 dei quali ebbero un esito mortale. La DL_{50} *i.p.* in topi è pari a 125 mg/Kg di peso corporeo. La venerupina ha anche azione epatotossica. Anche *Prorocentrum micans* produrrebbe una tossina di tipo venerupina.

Accanto alle biotossine prodotte da Dinoflagellati che interessano l'uomo attraverso la catena alimentare e che possono determinare ripercussioni sulla vita acquatica, ne esistono altre con attività squisitamente ittiotossica. Nel marzo 1982, ad esempio, morirono 200 t di sardine (*Centengraulis edentulus*) in Venezuela. Un estratto ottenuto dal pesce e saggiato su topi per via *i.p.* ne provocava la morte per paralisi flaccida. La tossina, simile a quella estraibile dalla spugna *Tedania ignis*, era probabilmente prodotta da *Ceratium furca*, che rappresentava il 54% della intera popolazione fitoplanctonica.

Peridinium polonicum è una specie ittiotossica di acqua dolce. Per immersione la dose minima letale per un pesce (*Orizyas latipes*) è di 0,132 μg/l. Tale concentrazione conduce a morte l'animale in 40 minuti. Anche il mezzo di coltura in cui si siano sviluppate circa 1.500.000 cellule/ml di *Amphidinium* spp. (*klebsii, rhynchocephalus, carterii*) esplica un effetto tossico per i pesci che vi siano immersi.

Si riporta che *Noctiluca miliaris*, responsabile di fioriture primaverili-estive, abbia determinato la morte di invertebrati e di pesci nel corso di un bloom avvenuto a Seto, un'isola del Giappone. Gli estratti acidi dell'alga hanno condotto a morte i pesci saggiati sia per immersione sia per somministrazione *i.p.*

Sono state riscontrate nell'ambiente anche alghe tossiche - la cui tossicità è stata accertata sperimentalmente in laboratorio - delle quali non sono mai state segnalate fioriture. E' il caso studiato a Plymouth (UK) del *Gymnodinium veneficum*, che produce una tossina idrosolubile estraibile a pH neutro, anzichè a pH acido come quelle del PSP. Essa agisce sul sistema nervoso depolarizzando le membrane. L'alga, del diametro di 12 μm, possiede una tossina potentissima che viene secreta nell'acqua. Un pesce gobide muore dopo una esposizione di 10 minuti nel liquido che abbia contenuto una coltura tossica.



35: *Exuviaella* (=*Prorocentrum*) *minimum*; 36: *Ceratium furca*; 37: *Gymnodinium* sp.; 38: *Peridinium divergens.*