

biologia ambientale

3

maggio
giugno
1997

BOLLETTINO C.I.S.B.A.

Spediz. in abbon. post, art. 2, comma 20/c, L. 662/96, filiale Reggio Emilia. Tassa pagata - Taxe perçue

Bimestrale, anno XI, n.3/1997.



SOMMARIO

| | |
|---|--------------------------------------|
| EDITORIALE | 1 |
| IGIENE AMBIENTALE | 3 |
| Alghe ed acqua potabile | di L. Volterra |
| GESTIONE AMBIENTALE | 24 |
| Ruolo di <i>Gambusia holbrooki</i> nel contenimento dei culicidi e suo impatto sulle biocenosi acquatiche | di R. Veronesi, R. Bellini, G. Celli |
| DEPURAZIONE | 41 |
| Non-filamentous bulking nel trattamento dei reflui di rendering mediante sistemi biologici SBR (Sequen- cing Batch Reactor) | di E. Lichtenberger |
| PREMI | 47 |
| APPUNTAMENTI | 48 |



biologia ambientale

Bollettino C.I.S.B.A. n. 3/1997

**Autorizzazione del Tribunale di
Reggio Emilia n. 837 del 14 maggio 1993**

proprietario

Paola Manzini

(Presidente del Centro Italiano Studi di Biologia Ambientale)

direttore responsabile

Rossella Azzoni

REDAZIONE

| | |
|--------------------------|----------------------------|
| Rossella Azzoni | responsabile di redazione |
| Giuseppe Sansoni | responsabile grafico |
| Roberto Spaggiari | responsabile di segreteria |

Hanno collaborato a questo numero:

Romeo Bellini
Giorgio Celli
Sergio Facchini
Piergiacomo Sarra
Rodolfo Veronesi
Laura Volterra

Numero chiuso in redazione il 1/9/1997

Il **C.I.S.B.A.** - Centro Italiano Studi di Biologia Ambientale
si propone di:

- divenire un punto di riferimento nazionale per la formazione e l'informazione sui temi di biologia ambientale, fornendo agli operatori pubblici uno strumento di documentazione, di aggiornamento e di collegamento con interlocutori qualificati
- favorire il collegamento fra il mondo della ricerca e quello applicativo, promuovendo i rapporti tecnico-scientifici con i Ministeri, il CNR, l'Università ed altri organismi pubblici e privati interessati allo studio ed alla gestione dell'ambiente
- orientare le linee di ricerca degli Istituti Scientifici del Paese e la didattica universitaria, facendo della biologia ambientale un tema di interesse nazionale
- favorire il recepimento dei principi e dei metodi della sorveglianza ecologica nelle normative regionali e nazionale concernenti la tutela ambientale.

Per iscriversi al **C.I.S.B.A.** o per informazioni scrivere al:

*Centro Italiano Studi di Biologia Ambientale,
via Amendola 2, 42100 Reggio Emilia*
o telefonare al Segretario: *Roberto Spaggiari*
tel. 0522/295460 - 0338/6252618; fax 0522/330546

Quote annuali di iscrizione al Centro Italiano Studi di Biologia Ambientale: socio ordinario: £ 70.000; socio collaboratore £ 50.000; socio sostenitore £ 600.000.
conto corrente postale n. 10833424 intestato a: CISBA, RE

I soci ricevono il bollettino **Biologia Ambientale** e vengono tempestivamente informati sui corsi di formazione e sulle altre iniziative del **C.I.S.B.A.**

Gli articoli originali e altri contributi vanno inviati alla Redazione:
Rossella Azzoni Gastaldi, via Cola di Rienzo, 26 - 20144 Milano.

I dattiloscritti, compreso il materiale illustrativo, saranno sottoposti a revisori per l'approvazione e non verranno restituiti, salvo specifica richiesta dell'Autore all'atto dell'invio del materiale.

Le opinioni espresse dagli Autori negli articoli firmati non rispecchiano necessariamente le posizioni del **C.I.S.B.A.**



EDITORIALE



n Italia abbiamo troppe leggi.

Il cittadino italiano continua ad essere schiacciato da nuove, mastodontiche –e spesso incomprensibili– norme legislative.

Anche le più alte cariche dello Stato rilevano spesso questo fatto e dichiarano che è necessario provvedere ad una loro drastica riduzione per avvicinarsi ai livelli europei.

Ma, come accade frequentemente, alle affermazioni di principio seguono comportamenti e decisioni concrete in senso opposto.

Basti un recente caso emblematico: una delle leggi collegate all'ultima "finanziaria", la n. 662/1996, è una piccola legge composta solamente da tre articoli; ma la furbizia parlamentare è giunta al punto di dividere in tre articoli un testo legislativo composto da 708 commi!

Come si fa ad orientarsi in una simile selva di norme, posta l'una dopo l'altra senza alcun titolo o raggruppamento, e assai diverse tra loro?

Ad esempio, nell'art. 1 della legge si possono trovare norme sull'uso dei beni mobili degli ospedali psichiatrici dismessi (comma 21), sui casi in cui l'insegnamento dell'educazione fisica può essere impartito a maschi e femmine insieme (comma 26), sulla sanatoria di alcune affissioni abusive di manifesti (comma 174), sull'accesso agli agricoltori alle agevolazioni fiscali sul carburante (comma 177), sui familiari coadiutori preposti ai punti vendita (comma 204) e così via.

Nella continua e confusa produzione legislativa, è poi normale registrare ripensamenti e correzioni, che si traducono in un labirinto di rinvii e di successive modificazioni.

Il comma 76 dell'art. 2 della già citata legge recita: «le disposizioni di cui al comma 8 dell'art. 3 della legge 17 febbraio 1992, n. 179, come modificate dall'art. 7 del decreto-legge 5 ottobre 1993, n. 398, convertito, con modificazioni, dalla legge 4 dicembre 1993, n. 493, sono da intendersi modificative di quanto previsto dal primo comma n. 6 dell'art. 9 della legge 5 agosto 1978, n. 457».

Fortunatamente, in tempi recenti, la Corte Costituzionale ed alcuni indirizzi normativi in materia tributaria hanno iniziato ad individuare la possibilità di scusare in alcune ipotesi l'ignoranza della legge.

Un altro grave fenomeno che determina incertezza del diritto –poiché pone il cittadino nella condizione di non saper qual è la norma “veramente” vigente– è la produzione di leggi o di atti normativi generali che pongono vincoli o divieti di eccessiva severità.

Ciò si verifica frequentemente nel settore della tutela del territorio e dei beni culturali: il disorientamento dei cittadini è accresciuto dalla sovrapposizione sul medesimo territorio di divieti e vincoli non compatibili fra loro.

Esistono vaste zone del territorio nazionale che –soggette, come tutte, alla disciplina urbanistica– rientrano contemporaneamente tra le aree dei parchi naturali (nazionali o regionali) nonché di interesse paesistico oppure storico-artistico-archeologico.

In tal caso, anche per aprire una nuova finestra, il proprietario di un fabbricato dovrebbe ottenere quattro diverse autorizzazioni (concessione edilizia, nullaosta dell'Ente Parco, autorizzazione paesistica regionale e autorizzazione della Sovrintendenza ai beni architettonici e archeologici).

Verso quale direzione dovremo invertire la rotta?

Bisognerebbe unificare gli strumenti di pianificazione e di disciplina degli interventi sul territorio ed introdurre norme ragionevoli, e non restrizioni sempre maggiori e sempre più generalizzate ma diffusamente impunte.

Corso di Formazione *Criteri e metodologie per lo studio ed il controllo delle alghe in acque destinate alla potabilizzazione*.
AGAC - Reggio Emilia, 2-5 giugno 1997.

ALGHE ED ACQUA POTABILE

Laura Volterra¹

INTRODUZIONE

La crescente richiesta di acqua potabile conseguente all'aumento della popolazione e al miglioramento del suo stile di vita, conduce a crescenti attingimenti idrici da riserve superficiali. Gli operatori turistici sono sempre più consapevoli che la loro attività è condizionata dalla disponibilità di risorse idriche superficiali e dal loro grado di amenità.

D'altronde le acque superficiali vanno spesso incontro a fenomeni di arricchimento in inquinanti organici ed inorganici. Tale contaminazione nei sistemi stagnanti o comunque soggetti a basso idrodinamismo determina il fenomeno della eutrofizzazione, la cui risposta biologica è l'incremento della biomassa algale: ridondanti coperture di macrofite e macroalghe rivestono i fondali, mentre il fitoplancton si sviluppa nella zona eufotica. Si parla di fioriture quando la massa di alghe microscopiche diviene tale da rendersi visibile ad occhio nudo. Infatti un corpo idrico affetto da fioritura presenta un colore atipico: è come se in acqua fosse stata versata vernice. Se la fioritura è dovuta a cianofite l'acqua può apparire rosso-viola (*Oscillatoria*) o di color verde scuro o verde erba (specie di *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Microcystis*, *Nodularia*, *Nostoc*, *Oscillatoria*). Le cellule, che tendono ad aggregarsi a seguito della produzione di mucopolisaccaridi, formano cuscinetti galleggianti che vengono spiaggiati dal vento a riva dove, invecchiando ed essiccandosi sulla superficie esposta all'aria, danno luogo a macchie bluturchesi (da cui il nome di alghe blu).

I cianobatteri sono produttori di una ampia varietà di

metaboliti, molti dei quali non rientrano nelle esigenze del metabolismo primario (divisione cellulare e metabolismo di base) (SCOTT, 1991; SKULBERG *et al.*, 1992b). I cianobatteri (Nostocales e Stigonematales) costituiscono, dopo gli attinomiceti, il maggiore serbatoio di produttori naturali di sostanze ad attività chemioterapica (CARMICHAEL, 1992); di particolare interesse sono gli antibiotici e gli anticancerogeni. Sulla complessità biologica dei cianobatteri basti pensare che una varietà di *Lyngbya majuscula* sintetizza una molecola che, a seconda che contenga Br o meno, ha attività promotrice tumorale o proprietà anti-neoplastiche (MYNDERSE *et al.*, 1977). Le tossine, contenute all'interno delle cellule viventi, vengono rilasciate in acqua solo in fase di senescenza o alla morte cellulare: così l'acqua che conteneva alghe tossiche diviene contaminata dalle loro tossine libere che possono venire in contatto con l'uomo o con gli animali che frequentano o che bevono l'acqua.

Spesso alcuni cianobatteri, oltre alle biotossine, producono citotossine –cosiddette per gli effetti evidenziabili in colture cellulari– dotate di un ampio spettro di bioattività che si estende dalle alghe ai batteri, ai miceti, alle linee cellulari di mammiferi.

Le citotossine sono secrete/escrete con continuità, mentre le biotossine sono prodotte in modo intermittente e imprevedibile nel corso di una fioritura, anche inizialmente non tossica. Secondo monitoraggi eseguiti nel Wisconsin (USA) (REPAVICH *et al.*, 1990), nella penisola scandinava (SKULBERG *et al.*, 1984; PEARSON, 1990) e nel Regno Unito (CODD, 1992), si può stimare che –a seconda degli anni presi in considerazione– il 25-95% delle fioriture di cianofite sia tossica (RAPALA *et al.*, 1997). Una stessa fioritura dovuta a una medesima alga può sintetizzare più specie tossiche (peptidi ciclici, alcaloidi tossici,

¹ Istituto Superiore di Sanità, Viale Regina Elena 199, Roma.

similguanidine, etc.) contemporaneamente o variandone le proporzioni nel corso della fioritura. Durante la estesa fioritura di cianoficee che colpì il fiume Darling in Australia, inizialmente *Anabaena circinalis* produsse alcaloidi neurotossici, ma dopo un mese sintetizzò ciclopeptidi epatotossici (SWODOBA e DOW, 1993).

STORIA

La paleolimnologia, attraverso l'analisi dei sedimenti, indica che già in passato l'uomo aveva consapevolezza della esistenza di fioriture di cianoficee e ne conosceva gli effetti.

Una rilettura delle 10 calamità bibliche che colpirono il popolo del faraone, può far ritenere che almeno 6 di esse (l'acqua mutata in sangue, le rane, le zanzare, i tafani, la mortalità del bestiame, le ulcere) possono ascrivere direttamente o indirettamente al verificarsi di un anomalo "bloom".

Prima della costruzione della diga di Assuan, durante la piena annuale del Nilo le acque del fiume nel Basso Egitto, divenivano dapprima verdi e poi rosse; oltre al limo trasportato ciò era imputabile a fioriture di cianoficee. La bibbia riferisce che quando l'acqua "si mutò in sangue" i pesci morirono, confermando l'idea che le grandi biomasse algali avessero generato anossie e sviluppo di metaboliti odorosi, che imprimevano all'acqua un appetante odore. Infatti, «... gli Egiziani scavarono nei pressi del Nilo per cercare acqua da bere, perché non potevano bere l'acqua del fiume.....» (Esodo 7,24) (VOLTERRA, 1995).

È una straordinaria similitudine il fatto che, in un continente lontano come l'Australia, costituito da un vero e proprio paleosuolo, dove i fiumi scorrono tanto lentamente da essere infestati da fioriture di cianoficee per centinaia di chilometri gli aborigeni, nonostante la rarità dell'acqua disponibile nel grande deserto che caratterizza l'interno di questo continente, usassero sempre bere non direttamente dai fiumi, ma da fosse scavate lateralmente ad essi.

Tornando all'Egitto dell'epoca dei faraoni e del primo libro della Bibbia, il venir meno dei pesci carnivori che usualmente regolavano la dimensione della popolazione delle rane, nutrendosi delle loro uova e dei girini, fece sì che «... il Nilo brulicò di rane.....» (Esodo 7,28). Gli Egiziani allora cercarono di eliminare il flagello, ma non poterono più mantenere sotto controllo le larve di insetti.

L'ipersviluppo di cianoficee è, infatti, accompagnato da formazioni di cuscini algali flottanti che la corrente del fiume e il vento tendono ad accumulare lungo le sponde, nelle zone di canneto, dove gli insetti trovano un luogo ideale per la deposizione di uova e per lo sviluppo delle

larve. La parte di questi ammassi di cianoficee esposta alla radiazione solare, intensa in Paesi come l'Egitto, muore e sviluppa un odore che è molto appetibile per gli animali.

È ipotizzabile che la fioritura, inizialmente solo indesiderabile per i suoi effetti collaterali, si sia trasformata in tossica, come frequentemente accade. I più colpiti sono gli animali che, abbeverandosi (una mucca beve più di 40 L di acqua/giorno), ingeriscono con l'acqua anche lo "scum" galleggiante che è un vero e proprio concentrato di tossine, specie se essiccato. La mortalità di mammiferi e uccelli può dunque essere una spia dello sviluppo di fioriture tossiche. Inoltre il contatto con le cianoficee fotosensibilizza le parti toccate con la formazione di eritemi e pustole: questo evento colpisce tutti, uomini ed animali. Anche la inalazione di frammenti algali determina reazioni anafilattiche che, per alcuni soggetti, possono essere mortali. Nei sopravvissuti i fenomeni possono essere talmente gravi da lasciare cicatrici. «.. Prendete della cenere di fornace. Essa diventerà polvere finissima che coprirà tutto l'Egitto e sugli uomini e sugli animali di tutto l'Egitto produrrà delle ulcere che si trasformeranno in pustole...» (Esodo 9,8/9,9) (VOLTERRA, 1995b).

Tra gli eventi storici di fioriture di cianoficee vale la pena di ricordare quello che determinò la morte di 6 capi di bestiame (mucche) tra il novembre e il dicembre 1994 a Souleat Loch, un lago eutrofico della Scozia sudoccidentale. In questo stesso specchio di acqua nel maggio successivo morirono altri 2 capi. In tutti i casi gli animali deceduti presentavano epatomegalie, nell'acqua c'era in atto una fioritura di *Oscillatoria agardhii* e nel ruminare degli animali si potevano rintracciare pezzetti di tricomi della stessa alga. L'allevatore dichiarò che, nell'arco dei 50 anni della sua vita, tale evento si era manifestato già altre volte. Il fenomeno eutrofico doveva essere noto già nel XII secolo quando, sulla lingua di terra che aggetta nel lago, fu fondato un monastero da Fergus, Lord di Galloway, noto come Monasterium Viridis Stagni a significare il colore delle acque del lago (CODD, 1996).

UTILIZZAZIONE DELLE ACQUE IN RELAZIONE ALLO STATO TROFICO

BERNHARDT e CLASEN (1982) hanno proposto un profilo di utilizzo di acque in funzione dello stato trofico (Tabella I).

Le acque oligotrofe sono le uniche pluriuso e, comunque, le più adatte per produrre acque potabili. Le mesotrofe possono ancora consentire il mantenimento di forme ittiche più esigenti come i salmonidi.

Indipendentemente dalla tossicità, gli effetti negativi per gli organismi acquatici sono conseguenti alla ridondante attività fotosintetica che comporta il consumo di

Tab. I. Possibili usi di acque con diverso grado trofico

| Opzione | Possibili usi | livello trofico |
|-----------|----------------------------|-----------------|
| Multiple | Potabile | Oligotrofo |
| | Balneazione | |
| | Vita acquatica salmonicola | Mesotrofo |
| Ristretto | Acque di processo | |
| | Ricreativo secondario | |
| | Raffreddamento | |
| | Idroelettrico | Eutrofo |
| | Vita acquatica ciprinicola | |
| Limitato | Acquacoltura | |
| | Scarico liquami | |
| | Irrigazione | Ipereutrofo |
| | Trasporto | |

CO₂, l'innalzamento dei valori di pH fino ad oltrepassare il valore di 9 (se le acque sono poco dure) e, a partire dagli strati di acqua più profondi, il depauperamento dell'ossigeno disciolto, fino all'anossia.

Una torbidità eccessiva dovuta ad alghe costituirebbe, indipendentemente da problemi di tossicità, un pericolo per le attività ricreative (si pensi ai problemi connessi con operazioni di salvataggio e di recupero di persone annegate) (BERNHARDT e CLASEN, 1982). Acque soggette a fioriture algali e a ridondanza di macrofite non sono auspicabili neanche per lo svolgimento di sport acquatici (vela, voga, etc.).

Acque "eutrofe" possono essere impiegate per irrigare i campi, ma acque solo leggermente eutrofe sono usabili senza trattamento in certi cicli di processo, come il raffreddamento. In particolare, indipendentemente da presenza di componenti tossiche, l'acqua in cui si sia avuto sviluppo dei cianobatteri è inidonea a molte attività industriali (per esempio, causa torbidità in bibite). Ne consegue che gli usi di un'acqua vengono limitati dall'eutrofizzazione.

Oltre ad intasare i filtri, a rendere meno efficienti i trattamenti di potabilizzazione e ad aumentare la produzione di organoalogenati a seguito della clorazione, la presenza di alcune microfite crea problemi organolettici nelle acque da potabilizzare. *Oscillatoria*, *Microcystis*, *Aphanizomenon flos-aquae* ed altre cianofee producono b-ciclocitrali, eptadecano, camfene, cineolo, geosmina (CHORUS *et al.*, 1992). Le diatomee secernono prodotti oleosi con odore di pesce (*Asterionella*, *Fragilaria*, *Melosira*, *Tabellaria*, *Synedra*) o piacevolmente aromatici (di geranio: *Asterionella* e *Tabellaria*). Le Clorofee impar-tiscono odori di erba (*Volvox* e *Staurastrum*). Le Crisofi-

cee producono odori pungenti, di pesce fradicio (*Uroglenopsis*) o di cetriolo (*Synura*) (CHORUS *et al.*, 1992).

INTERAZIONI SULLA SALUTE DI

ACQUE AFFETTE DA FIORITURE TOSSICHE

La prima segnalazione scritta di una epidemia diarroica dovuta alla assunzione di acqua potabilizzata a partire da acque grezze eutrofiche risale al 1931: riguardò 5000-8000 persone che bevevano l'acqua dei fiumi Ohio e Potomac (VOGLER, 1967; SCHWIMMER e SCHWIMMER, 1968). La stagnazione delle acque in regime di magra aveva fatto accumulare lungo le rive del fiume acqua immota in cui si erano sviluppate fioriture algali. Quando vennero le piogge e questa acqua "morta" fu trasportata nel fiume si ebbero i problemi gastroenterici (TISDALE, 1931; VELDEE, 1931).

Nel 1942 e nel 1968 a Sewickley, sempre in USA, furono segnalate gastroenteriti ad etiologia non batterica e non trasmissibili per contatto oro-fecale. L'epidemia fu attribuita alla presenza nell'acqua grezza di *Schizothrix calcicola* (LIPPY e ERB, 1976).

In genere queste patologie sono caratterizzate da una breve incubazione (di 2-12 h) seguita da una fase epatica acuta di due giorni e da una fase letargica di 1-2 giorni, dovuta allo scompenso elettrolitico conseguente ai sintomi gastrointestinali, i quali possono durare anche 5 giorni (MOORE, 1984). Superata la fase critica, le transaminasi si mantengono a lungo elevate, indicando che l'organo bersaglio è il fegato e che, accanto ai più visibili effetti acuti, l'intossicazione potrebbe avere effetti a medio e lungo termine (PALMER, 1962).

Uno studio retrospettivo condotto in Australia sugli effetti delle ricorrenti fioriture algali di *Microcystis* ha messo in luce un incremento statisticamente significativo della γ -glutamilttransferasi (γ GT), indicativo di danni epatici tra la popolazione alimentata con acqua potabile derivata da bacini soggetti a fioriture (FALCONER *et al.*, 1983). Una epidemia acuta di epatoenterite che ha richiesto la ospedalizzazione di più di 140 persone fu attribuita, sempre in Australia, a fioriture di cianofee tossiche. In quel caso i maggiori problemi riguardarono i bambini, per i quali si fece ricorso anche a trasfusioni e dialisi per due settimane. La cianofea coinvolta era *Cylindrospermopsis raciborskii*, una specie tropicale localizzata in un'isola del Queensland, che produce apparentemente un nuovo alcaloide con una unità ciclica guanidinica (OHTANI *et al.*, 1992) avente una DL₅₀ di 64 mg p.s./Kg p.c. dopo somministrazione i.p. in topi e tempi di morte compresi tra 15 e 60 min. L'analisi istopatologica ha messo in rilievo necrosi degli epatociti oltre a tessuti necrotizzati a livello polmonare, renale, intestinale e delle ghiandole surrenali

(HAWKINS *et al.*, 1985; BOURKE *et al.*, 1983).

Una gastroenterite stagionale è frequente tra i bambini a Salisbury in Rhodesia (ora Zimbabwe). È dovuta all'invecchiamento delle cellule algali con conseguente lisi e liberazione in acqua della tossina (ZILBERG, 1966).

Non solo la presenza di epatotossine, ma anche alte concentrazioni di lipopolisaccaridi possono causare gastroenteriti, mal di testa, crampi, nausea (CODD, 1989) o sindromatologie cardiovascolari (NATIONAL RIVER AUTHORITY, 1990) e febbri tra persone che vengano in contatto con le acque soggette a fioriture tossiche (MUTTARI *et al.*, 1980 a, b).

In Nord America mal di testa, crampi allo stomaco, nausea e diarrea (BILLINGS, 1981) con dolori (DILLENBERG e DEHNEL, 1960), irritazioni oculari, delle orecchie e della gola (CARMICHAEL, 1985) sono stati associati ad attività ricreative svolte in specchi di acqua colpiti da fioriture di *Microcystis*. Molti casi possono essere confusi, per somiglianza dei sintomi, con i colpi di sole. Febbre da fieno, asma, irritazione oculare sono abbastanza comuni per contatto con *Oscillatoria* (HEISE, 1949; HEISE 1951). Dermatiti sono state indotte dal contatto con specie di *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Nodularia*, *Oscillatoria* e *Gloeotrichia* (GRAUER e ARNOLD, 1961; GORHAM e CARMICHAEL, 1988; SOONG *et al.*, 1992) in acqua dolce e di *Lyngbya majuscula*, *Schizothrix calcicola*, *Oscillatoria negroviridis* in ambiente salmastro e marino (MOORE, 1984).

Esotossine prodotte da cianofitiche costituiscono problemi sanitari per il tratto respiratorio (*Trichodesmium erythraeum*) o cutaneo (*Lyngbya majuscula*).

La malattia tipica della baia di Recife (Brasile), definita localmente Tingui o "febbre di Tamarandè" dal nome della baia, è dovuta ad aerosol di mare contenente frammenti di *Trichodesmium erythraeum*, una cianofitica responsabile della comparsa delle acque rosse che periodicamente affliggono tale zona. Tale patologia, considerata dal 1946 tipica della sola baia di Tamarandè, appare occasionalmente anche in altre parti della costa brasiliana. È caratterizzata da sintomi respiratori accompagnati da asma, elevazione termica, dolori articolari e periorbitali, a volte eruzioni cutanee sul torace e sulle braccia. La durata della sintomatologia è, in genere, di 3 giorni (CARMICHAEL e FALCONER, 1993).

Un recente rapporto indica che probabilmente l'inhalazione di tossine di *Microcystis* da parte di canoisti è un altro rischio connesso con fioriture di cianofitiche in ambienti ricreativi (TURNER *et al.*, 1990). Per il loro elevato contenuto proteico vegetale (anche di biotossine, quindi), i frammenti algali presenti con alta frequenza negli aerosol aerotrasportati possono essere allergeni per pazienti con sensibilità inalatorie (MCELHENNY *et al.*, 1962). Applican-

do estratti di 4 differenti specie algali in test intracutanei a 20 bambini non allergici e a 120 bambini con allergie respiratorie, non si ebbe alcuna risposta nel primo gruppo, mentre 98 dei 120 pazienti allergici diedero una risposta significativa ad almeno uno dei ceppi saggiati. Anche MITTAL *et al.* (1979) condussero uno studio simile in India su 4000 pazienti mostrando che il 25% di individui che soffrivano di allergie respiratorie erano positivi alle alghe. Questi studi non furono però limitati alle cianofitiche, ma inclusero anche clorofitiche e criptofitiche dimostrando che i composti allergenici non sono esclusivi delle alghe blu. Le criptofitiche posseggono, per esempio, potenti allergeni. Dopo il bagno nello Schlachtensee nel giugno 1989 durante uno sviluppo massiccio di *Uroglena* parecchie persone lamentarono prurito e bolle per parecchi giorni (CHORUS e SCHLAG, 1993). Oltre alle proteine, anche parecchie altre sostanze non proteiche a basso peso molecolare (aldeidi, terpeni) normalmente prodotte dalle alghe possono espletare potere antigenico.

Oltre a specifiche tossine, il "prurito del bagnante" potrebbe essere causato anche dai lipopolisaccaridi abbondanti nelle cellule procariotiche dei cianobatteri. Le irritazioni da contatto ingenerate da *Lyngbya majuscula* sono dovute a citotossine promotrici tumorali: lingbiatossina A (FUJIKI *et al.*, 1984) e aplisiatossine (FUJIKI *et al.*, 1985).

Eritemi cutanei sono frequenti non solo dopo l'immersione o la pratica di sport acquatici, ma anche dopo docce fatte con acqua erogata da riserve idriche infestate da cianofitiche (RICHARD *et al.*, 1983). Per questi motivi è opportuno fissare criteri addizionali per l'acqua da bere e per quella ad uso ricreativo che prevedano limiti concernenti la presenza di alghe blu.

Le reazioni allergiche possono distinguersi dagli effetti citotossici in base al numero delle persone coinvolte: mentre solo pochi individui reagiranno allergicamente alle alghe presenti nell'acqua di balneazione, i meccanismi di citotossicità coinvolgono un più ampio gruppo di frequentatori.

Più il contatto con le alghe e le tossine è intimo, più le risposte sono acute ed estreme. "Epidemie" da shock endotossico si sono verificate in unità di dialisi a Washington (USA) (HUNTER, 1993) e nello stato di Pernabuco (Brasile) (CARMICHAEL, 1996). Nel centro di emodialisi di Caruaru (Pernabuco, Brasile) l'84% di 131 pazienti che si sottoponevano usualmente al trattamento di dialisi lamentarono disturbi visivi, nausea e vomito a seguito di una seduta eseguita nello stesso periodo di tempo (nell'arco di 4 giorni). Un paziente morì subito dopo la emodialisi, altri a distanza di tempo (da 2 settimane a 4 mesi). Tutti presentavano sindromi epatiche. Nel caso specifico (mar-

zo 1996) l'acqua prelevata dal lago artificiale Taboca, dagli anni '90 afflitto da fioriture di cianofitee (*Microcystis*, *Anabaena*, *Anabaenopsis*), ospitava una sovraccrescita di *Aphanizomenon* associata a copresenza di due specie di *Oscillatoria*. Gli estratti algali analizzati misero in luce la presenza di microcistina-LR (leucina, arginina), che era anche rintracciabile nel siero e nel fegato dei pazienti (CARMICHAEL, 1996).

Il centro di emodialisi trattava l'acqua in modo automatico con un sistema di filtrazione su sabbia e carbone e resine a scambio ionico seguito da un microfiltro, attingendo direttamente dalla riserva per evitare i rischi connessi ai residui di cloro presenti nell'acqua potabilizzata. Gli elevati contenuti di microcistine non erano però rimossi dal trattamento (CARMICHAEL, 1996). Da questo caso esemplare le analisi eseguite sui sopravvissuti e sui riesumati potrebbero fornire interessanti informazioni sui livelli dose/effetto per definire il livello di rischio delle microcistine per l'uomo. Inoltre l'osservazione clinica dei sopravvissuti potrebbe mostrare se esistono effetti a lungo termine, aiutando a risolvere il dilemma se in vivo e per le dosi assumibili p.o. dall'uomo le microcistine siano potenti promotori tumorali epatici.

EFFETTI SANITARI DELLE BIOTOSSINE CIANOBATTERICHE

Intossicazioni umane

Le intossicazioni umane, quasi mai mortali, sono prevalentemente imputabili ad epatotossine. Le specie responsabili appartengono ai generi *Anabaena*, *Anabaenopsis*, *Aphanizomenon*, *Coelosphaerium*, *Cylindrospermum*, *Cylindrospermopsis*, *Fisherella*, *Gloeotrichia*, *Gomphosphaeria*, *Hapalosyphon*, *Hydrocoryne*, *Hormothamnion*, *Lyngbya*, *Microcystis*, *Microcoleus*, *Nodularia*, *Nostoc*, *Oscillatoria*, *Phormidium*, *Planktothrix*, *Pseudoanabaena*, *Schizothrix*, *Scytonema*, *Symploca*, *Synechocystis*, *Synechococcus*, *Tolypothrix* (FALCONER, 1994). Il veicolo è l'acqua contenente le specie tossiche e le biotossine disciolte; il rischio esiste in tutti i paesi che abbiano corpi idrici eutrofici con sviluppo di cianofitee. Le sintomatologie sono varie e riguardando più apparati.

Sintomatologie gastrointestinali

Sintomi: diarrea che compare entro le 2-12 h dall'assunzione; i sintomi scompaiono dopo pochi giorni se non c'è più contatto con i cianobatteri tossigeni. L'intossicazione non è mai mortale per l'uomo. Al passare della fase acuta il danno epatico è ricordato da alterati livelli di transaminasi. Altri sintomi quali nausea, vomito, dolori gastrici e addominali, febbre e vertigini possono accompagnare o precedere lo stato diarroico.

Sintomatologie respiratorie (inalazione e contatto accidentale con l'acqua)

Sintomi: mal di testa, prurito, fastidi alle mucose nasali e della bocca e della gola, rinorrea, bronchite e raffreddore asmatici, febbre da fieno.

Dermatiti (contatto)

Sintomi: bruciori e irritazione della pelle, dermatite eritematosa papulovesicolare, orticaria, congiuntivite, febbre da fieno, fotosensibilizzazione della pelle.

Sindrome di Haff (alimenti ittici)

Sintomi: Dolori muscolari, debolezza soprattutto delle estremità inferiori, tachicardia, diaforesi, ipertensione, caduta termica, urina di colore scuro, acidosi renale, leucocitosi, mioglobinuria, elevati livelli serici di creatinichinasi, lattato-deidrogenasi, aspartato-transferasi, alaninamino-transferasi. Il quadro clinico si completa, nei casi più gravi, con una neurodistrofia che determina necrosi dei neuroni motori del cervello e delle cellule del corno anteriore del midollo spinale, necrosi coagulativa nei muscoli, nefrosi mioglobinurica, distrofia miocardica e ispessimento delle fibre periferiche neuromuscolari.

Si tratta di una miopatia osservata e descritta per la prima volta nel 1924 con una epidemia che si sviluppò lungo le coste della baia di Konisburg Haff sul Mar Baltico, nella Prussia orientale. A distanza di 60 anni, in Russia, se ne erano verificate 10, di cui una nel 1934 era accaduta intorno al lago Onega e l'ultima, nel 1984, tra la popolazione che si nutre di pesci catturati nel lago Ubin. Nel 1942 se ne è registrata una vicino a Mariestad in Svezia (lago Yinsen). Secondo una recente ipotesi, ne sarebbero responsabili i veleni di cianofitee veicolati all'uomo da carpe e altri pesci, anche marini. Infatti, si è riusciti a riprodurre la patologia in gatti cui erano state date da mangiare carpe raccolte dagli specchi d'acqua che sembravano essere correlati allo sviluppo della malattia (LESCHCHENKO *et al.*, 1965). I pesci, non essendo contaminati da batteri, si ritenne fossero vettori accumulatori di una tossina liposolubile prodotta da cianobatteri (SOLOMON, 1990).

È l'unico caso in cui, per il momento, sembra esserci una limitazione spaziale. Le aree colpite da epidemie di sindromi di Haff sono le coste del Mar Baltico e le acque interne della zona transuralica (con i laghi Onega e Ubin, Russia) e scandinava (lago Yinsen, Svezia).

Intossicazioni del bestiame

Le intossicazioni cui soggiacciono gli animali sono dovute sia a neurotossine sia ad epatotossine. Mammiferi e uccelli, domestici e selvatici, sono colpiti da questi tipi

di intossicazione. Si segnalano anche casi di scimmie e rinoceronti affetti da varie delle forme descritte di intossicazione. È probabile che tutti gli animali superiori possano esserne colpiti.

A) neurotossine: *alcaloidi (anatossine=antx) e tetraidropurine (saxitossine =stx).*

Le specie produttrici sono *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Oscillatoria*, *Gomphosphaeria*, *Trychodesmium*. I veicoli sono l'acqua di abbeveramento del bestiame, lo "scum" (che è appetibile per gli animali), eventualmente molluschi bioaccumulatori (ingeriti da lontre ed altri mammiferi acquatici e dall'avifauna) e altre forme di vita acquatica. Le intossicazioni si possono verificare in tutti i paesi che hanno acque interne eutrofiche, con sviluppo di peculiari specie di cianofite e selezione di stipiti tossici.

I sintomi, in caso di morte rapida (entro 4-10 min), sono tremori muscolari, torpore, collasso, eccessiva sensibilità al tatto, convulsioni, testa buttata all'indietro. All'analisi necroscopica nessun danno è visibile negli organi interni.

In caso di morte tra 15 e 30 giorni si osserva scoordinamento, collasso, contrazioni muscolari, respirazione affannosa, bava, rinorrea, affanno, stato di soffocamento, convulsioni, testa buttata all'indietro, temperatura anormale ed infine coma. All'analisi necroscopica si osserva congestione del cervello e del midollo spinale, sangue nei polmoni e nella cavità toracica, polmoni pieni di liquido e bronchi zeppi di muco.

B) tossine polipeptidiche ad interessamento epatico e gastrointestinale

Le specie responsabili appartengono ai generi *Anabaena*, *Anabaenopsis*, *Aphanizomenon*, *Coelosphaerium*, *Cylindrospermium*, *Cylindrospermopsis*, *Fisherella*, *Gloeotrichia*, *Gomphosphaeria*, *Hapalosiphon*, *Hydrocoryne*, *Hormothamnion*, *Lyngbya*, *Microcystis*, *Microcoleus*, *Nodularia*, *Nostoc*, *Oscillatoria*, *Phormidium*, *Planktothrix*, *Pseudoanabaena*, *Schizothrix*, *Scytonema*, *Symploca*, *Synechocystis*, *Synechococcus*, *Tolypothrix* (FALCONER, 1994). I veicoli sono gli stessi citati per le neurotossine. Le intossicazioni si possono verificare in tutti i paesi che hanno acque interne eutrofiche con sviluppo di cianofite.

I sintomi dell'avvelenamento comportano morte tra 30 min e 24 h, con sintomi diversificati a livello degli organi interni:

- gastrointestinali e renali: debolezza, vomito, deglutizione continua, salivazione, occhi acquosi, sete spinta, escrezioni improvvise, feci con sangue, diarrea, eruzioni di peli, letargia, addome gonfio, infiammazione e sangue nel tratto digestivo, bocca sanguinante, necrosi del tessuto renale.
- epatici: ingiallimento della pelle, stato di shock, fred-

do alle estremità, anemia, pallore, dolori addominali, fegato ingrossato e scuro a macchie. Nei casi in cui non si ha la morte immediata il fegato diviene cirrotico.

- polmonari: trombosi multifocali polmonari; i trombi sono resistenti all'effetto degli anticoagulanti.
- cardiaci: pulsazioni rapide e lente, congestione cardiaca; il cuore è dilatato, ripieno di sangue e flaccido.

C) fotosensibilizzazione

Possono essere responsabili di fotosensibilizzazione tutte le cianofite. Il veicolo della patologia è l'acqua con cui parti del corpo vengano in contatto. Tali eventi, spesso trascurati, si verificano in tutti i paesi che hanno acque eutrofiche.

La morte interviene dopo molti giorni. Gli animali colpiti (ovini, bovini, cavalli, tra gli animali allevati) presentano papule sulla pelle delle orecchie, del naso e della coda nelle parti del corpo che sono venute in contatto con le alghe (CARMICHAEL e SCHWARTZ, 1984). A volte gli effetti della fotosensibilizzazione portano i vitelli al rifiuto di alimentarsi alle fattrici (STOWE *et al.*, 1981).

CARATTERISTICHE DELLE CIANOGINOSINE

Il termine cianoginosine sta ad indicare genericamente le tossine prodotte dai cianobatteri: esse possono avere come organo bersaglio il tessuto nervoso e la trasmissione neuromuscolare (neurotossine) o il fegato (epatotossine).

Neurotossine

La neurotossicità è prodotta da alghe quali *Anabaena flos-aquae*, *Anabaena spiroides*, *Anabaena circinalis*, *Aphanizomenon flos-aquae*, *Oscillatoria* (CARMICHAEL, 1988; SIVONEN *et al.*, 1989), *Trichodesmium* (HAWSER *et al.*, 1991). Tali alghe possono produrre contemporaneamente o in successione anche epatotossine. Le neurotossine sono più veloci nell'azione e quindi dominano il quadro clinico.

Nell'ambito delle neurotossine quelle studiate chimicamente sono quattro.

1) *Anatossina-a* (antx-a) è una ammina secondaria (2-acetil-9-azabicyclo(4.2.1)non-2-ene) (PM 165 D), potente agonista nicotinico colinergico postsinaptico che causa un blocco depolarizzante neuromuscolare (HUBER, 1972). La DL₅₀ i.p. in topi è di circa 200 mg/Kg p.c. con tempo di sopravvivenza di pochi minuti. È un potente bloccante della depolarizzazione neuromuscolare (CARMICHAEL *et al.*, 1979). Causa la morte in pochi minuti in funzione della specie animale, della sua dimensione, della quantità di tossina e di cibo ingeriti. I segni clinici dell'avvelenamento sono in progressione: fascicolazioni muscolari, rallentamento dei movimenti, respiro addominale, ciano-

si, convulsione e morte. In aggiunta, negli uccelli è osservabile l'opistotono (collo irrigidito a S).

2) *Anatossina-a(s)* (antx-a(s)) è un estere guanidilico metilfosfatato molto tossico, inibitore irreversibile della colinesterasi (MAHMOOD e CARMICHAEL, 1987); strutturalmente è un N-idrossiguanidina metil estere fosfato, (PM 252 D). La DL₅₀ i.p. in topi è di circa 20 µg/Kg p.c. con un tempo di morte di circa 10 min. È instabile: viene inattivato a temperature > 40 °C e in condizioni alcaline. I segni clinici dell'intossicazione includono la ipersalivazione, lo scarico di muco dal naso, tremori, fascicolazioni, atassia e diarrea, l'opistotono nei volatili (COOK *et al.*, 1989).

3) Accanto alle antx-a e antx-a(s) è stata riconosciuta anche la *homoanatossina* (Homo ant-x) che ha tossicità e sintomi di avvelenamento simili a quelli dell'ant-a (EDWARDS *et al.*, 1993).

4) *Aphanizomenon flos-aquae* produce saxitossine (stxs) (saxitossina e neosaxitossina) (DL₅₀ i.p. pari a circa 10 mg/Kg p.c.), tossine che inibiscono la conduzione nervosa bloccando i canali del Na⁺ senza colpire la permeabilità al potassio, il potenziale transmembrana di riposo o la resistenza di membrana (ADELMAN *et al.*, 1982).

Epatotossine

Le epatotossine sono peptidi ciclici tossici contenenti un nuovo aminoacido idrofobico (il cui nome abbreviato è convenzionalmente ADDA = 2S,3S,8S,9S-3-amino-9-metossi-2,6,8-trimetil-10-fenildeca-4,6-acido dienoico), legato con un legame β-peptidico ad un anello di 4 o 6 D- e L- aminoacidi (penta- ed epta-peptidi, rispettivamente nodularine e microcistine).

Le tossine epatotossiche (GREGSON e LOHR, 1993) colpiscono gli epatociti dei vertebrati. A livello biochimico inibiscono, come l'OA (acido ocaidico), le fosfatasi di tipo 1 e 2A attivando la fosforilasi-a (RUNNEGAR *et al.*,

1987) e per questo esercitando un ampio specchio di azione sugli organismi viventi (KELETI *et al.*, 1979; KIRPENKO *et al.*, 1982). L'aumento della fosforilazione è dovuto alla inibizione delle fosfatasi.

Epatotossine sono prodotte dai generi *Microcystis*, *Anabaena*, *Nodularia*, *Oscillatoria*, *Nostoc*, ma anche da *Cylindrospermopsis*, *Aphanizomenon*, *Gloetrichia*, *Coelelosphaerium*, ecc. (Tab. II).

DIFFUSIONE GEOGRAFICA

Si può ipotizzare che non esistano aree geografiche esenti dal problema delle fioriture di cianofite e di quelle tossiche in particolare. Ne sono affette le zone lacustri, ma anche le coste marine e i tratti di fiume a lento scorrimento (Tabella III).

Quasi certamente il fenomeno è più esteso di quanto si conosca perché l'aumento della richiesta idrica ha portato alla costruzione, a partire dalla prima diga di Assuan (1933), un po' ovunque di bacini artificiali (Tabella IV) che naturalmente vanno incontro a rapidi processi di invecchiamento i quali comportano lo sviluppo eccessivo di alghe e di cianofite con il rischio che, prima o poi, diventino tossiche (HUNTER *et al.*, 1994).

I "bloom" di cianofite sono stati particolarmente ben studiati dalle "River Authorities" in UK a partire dal 1989. Si è rilevata tossicità nel 68% dei corpi idrici esaminati (78 in tutto). Le specie più comuni erano *Microcystis aeruginosa*, *Aphanizomenon flos-aquae*, *Anabaena* e *Oscillatoria* (OWEN, 1993). Anche laghi di importanti riserve naturali (Loch Inch, Loch Morlich), pur essendo giudicati oligotrofi o, al più, debolmente mesotrofi, negli ultimi anni (a partire dal 1990) hanno mostrato significative produzioni di *Oscillatoria* bentoniche neurotossiche ed epatotossiche che hanno indotto la morte di cani che le ingerivano (OWEN, 1993). Dall'esperienza

Tab. II. Indicazione dei pesi molecolari e della tossicità di alcune delle microcistine (MCYST).

| Sigla della epatotossina | aminoacidi peculiari | Peso Molecolare | DL50 µg/Kg |
|--------------------------|----------------------|-----------------|------------|
| MCYST-LA | Leucina Alanina | 909 | <100 |
| MCYST-AR | Alanina Arginina | 952 | 200-400 |
| MCYST-YA | Tirosina Alanina | 959 | ? |
| MCYST-LR | Leucina Arginina | 994 | <100 |
| dismetil 3 MCYST-LR | Leucina Arginina | 980 | <100 |
| MCYST-LY | Leucina Lisina | 1001 | ? |
| MCYST-YM | Tirosina Metionina | 1018 | <100 |
| MCYST-RR | Arginina Arginina | 1037 | 400-800 |
| dismetil 3 MCYST-RR | Arginina Arginina | 1023 | 100-200 |
| dismetil 3,7 MCYST-RR | Arginina Arginina | 1009 | ? |
| MCYST-YR | Tirosina Arginina | 1044 | 100-200 |

maturata in UK si é potuto constatare che “blooms” non tossici possono, senza alcuna apparente motivazione, divenire improvvisamente tossici.

Il fenomeno delle alghe tossiche si estende ai Paesi dell'Europa meridionale: il Portogallo ne é afflitto da nord a sud, includendo sia stagni (regione di Mira) (VA-

SCONCELOS, 1992) che fiumi e laghi le cui acque sono utilizzate anche a scopo potabile (OLIVEIRA, 1983; OLIVEIRA, 1985). Da un monitoraggio eseguito tra il 1989 e il 1992 su 36 laghi usati per produrre acqua potabile, si é potuto verificare che il 60% dei campioni analizzati presentava biotossine prodotte da *Microcystis aeruginosa*, *Aphanizomenon flos-aquae* e *Anabaena flos-aquae*, (VA-SCONCELOS, 1993).

Tab. III. Paesi in cui é stata riconosciuta la presenza di cianofite tossiche. (In corsivo si riportano i casi che riguardano anche aree marine costiere).

Argentina, Australia (anche Fiume Darling), Bangladesh, Belgio, Bermuda, Brasile, Canada (Alberta, Manitoba, Ontario, Saskatchewan), Cecoslovacchia, Cile, Cina, Corea, Danimarca, Egitto, Filippine, Finlandia, Francia, Germania, Giappone, Gran Bretagna, Grecia, India, Irlanda, Israele, Italia, Kenia, Marocco, Norvegia, Nuova Zelanda, Olanda, Polonia, Portogallo (anche Fiume Guadiano), Rhodesia, Russia (anche Fiume Dniepr), Scozia, Sud Africa, Svezia, Svizzera (morie di mucche in montagna), Tailandia, Tanzania, Ucraina, Ungheria, Uruguay, USA (California, Colorado, Florida, Hawaii, Idaho, Illinois, Indiana, Iowa, Michigan, Minnesota, Montana, Nevada, New Hampshire, New Mexico, New York, North Dakota, Ohio, Oklahoma, Oregon, Pennsylvania, South Dakota, Texas, Washington, Wisconsin), Venezuela, Zimbabwe

Negli anni recenti si verificano morie di bovini nelle Alpi orientali svizzere. Tali eventi avvengono in agosto e settembre ad alta quota (1900-2500 m) in apparente assenza di fioriture algali, ma in presenza di alghe verdi e blu, tra cui membri dei generi *Merismopedia*, *Ammatoida*, *Scytonema*, *Syrechoccus*, *Lyngbya*, *Oscillatoria* e *Stigonema* (MEZ *et al.*, 1993). Le mucche muoiono da pochi minuti a qualche ora dopo aver mostrato spossatezza, tremori, spasmi, barcollamento. L'esame istologico dei loro fegati mostra necrosi emorragiche centrolobulari. Si sta facendo largo l'ipotesi che la morte dei bovini sia causata da epatotossine di cianobatteri.

Cianofite tossiche sono state ritrovate in Norvegia, Svezia e Finlandia (KONONEN *et al.*, 1993). In quest'ultimo paese –dove il caso più antico di avvelenamento di animali risale al 1928 (citato da PERSSON *et al.*, 1984)– cianobatteri tossici costituiscono, a seconda degli anni, il 13-45% dei campioni raccolti durante le fioriture. Le epatotossine, più frequenti delle neurotossine, sono prodotte da *Microcystis aeruginosa*, *Oscillatoria agardhii* e *Anabaena* (SIVONEN *et al.*, 1990). Le neurotossine sono

Tab. IV. Sbarramenti artificiali pluriuso costruiti in varie parti del mondo.

(Tra parentesi, il numero di invasi con altezza superiore a 10 m) (HUNTER *et al.*, 1994).

| Continente | Paesi |
|-------------------|---|
| Africa | Algeria (43), Angola (15), Benin (2), Botswana (3), Burkina Faso (2), Cameroun (9), Congo (2), Costa d'Avorio (22), Egitto (5), Etiopia (8), Gabon (1), Ghana (5), Guinea (2), Libia (12), Kenia (14), Lesotho (3), Liberia (1), Madagascar (10), Malawi (3), Mali (2), Marocco (62), Mauritius (6), Mozambico (8), Nigeria (45), Uganda (1), Tanzania (2), Senegal (2), Sierra Leone (1), Sudan (4), Swaziland (6), Togo (2), Zaire (15), Zambia (4), Zimbabwe (101) |
| America latina | Argentina (100), Bolivia (6), Brasile 533, Cile (79), Colombia (41), Costa Rica (4), Cuba (49), El Salvador (5), Guatemala (5), Ecuador (11), Haiti (8), Giamaica (2), Messico (475), Nicaragua (4), Panama (6), Paraguay (3), Perù (68), repubblica Dominicana (12), Suriname (1), Trinità e Tobago (4), Uruguay (6), Venezuela (82) |
| Asia (- Giappone) | Afganistan (2), Arabia Saudita (38), Bangladesh (1), Cambogia (2), Cina (1423), Cipro (48), India (581), Indonesia (52), Iran (28), Iraq (13), Giordania (5), Libano (5), Malesia (38), Myanmar (4), Nepal (3), Pakistan (38), Filippine (13), Siria (12), Repubblica di Corea (765), Repubblica Popolare Democratica di Corea (70), Laos (1), Singapore (3), Sri Lanka (79), Tailandia (109), Turchia (169), Vietnam (1) |

correlate ad *Anabaena*. Altri generi coinvolti in casi di intossicazione sono *Aphanizomenon*, *Nodularia* e, di recente *Nostoc* (SIVONEN *et al.*, 1990) e riguardano anche le acque costiere (EKMAN EKEBON *et al.*, 1992).

Fioriture di *Microcystis aeruginosa* produttrice di microcistina si sono verificate in Russia, negli sbarramenti creati artificialmente lungo i grandi fiumi (ad esempio, il Dniepr) (CARMICHAEL *et al.*, 1993).

Dal 1985 fioriture di cianofitiche tossiche (*Microcystis aeruginosa*, *Anabaena* spp., *Oscillatoria* spp.) interessano grandi invasi sardi costruiti per produrre acqua potabile (LOIZZO *et al.*, 1988; BRUNO *et al.*, 1992). Il fenomeno riguarda anche altre regioni (Lombardia, Emilia Romagna, Lazio, Molise) ed è probabilmente sottostimato (VOLTERRA e MANCINI, 1992).

L'Australia è stata quasi certamente afflitta dall'iper-sviluppo delle cianofitiche fin da prima della colonizzazione europea, come dimostra indirettamente l'abitudine degli aborigeni di bere l'acqua di gronda laterale dei pochi e lenti corpi idrici che caratterizzano il continente più piatto del mondo. Nel fiume Darling, nella prima parte dell'estate 1991, un tratto di 1.000 Km fu soggetto ad una pesante fioritura di *Anabaena circinalis*. Circa 1.600 pecore e 40 bovini rimasero avvelenati, esibendo sintomi neurotossici e/o epatotossici, dopo essersi abbeverati di quest'acqua. Tuttavia il primo caso di avvelenamento di animali citato su una rivista scientifica (Nature) risale al 1878 e fu prodotto da *Nodularia*. La maggior parte dei "blooms" tossici sono ancora ascrivibili a questa alga, ma anche a *Microcystis*, accanto ad una minore prevalenza di fioriture di *Anabaena*. Fioriture di *Nodularia spumigena* sono ricorrenti in alcuni estuari australiani o in tratti di fascia costiera. Tra dicembre 1992 e marzo 1993 questo fenomeno comparve anche in Tasmania (laguna di Orielton) e l'analisi all'HPLC mise in evidenza 200-3500 µg di nodularina/g p.s. di concentrato algale (BLACKBURN e JONES, 1993). HAWKINS *et al.* (1985) isolarono *Cylindrospermopsis raciborskii* (= *Anabaena raciborskii*) produttore una epatotossina nella diga Salomon, una riserva artificiale costruita per avere acqua dolce in un'isola del Queensland australiano. La tossina prodotta da *Oscillatoria erythraea*, alga della grande barriera corallina australiana, è correlata con le epatotossine (SWODOBA e DOW, 1993).

Cianofitiche tossiche (*Anabaena circinalis*, *Oscillatoria* e *Microcystis aeruginosa*) sono state ritrovate in molti corpi idrici cinesi da quando, nel 1984, è stata avviata una appropriata sorveglianza. Ma nell'area asiatica è il Giappone il paese in cui vi è la più approfondita conoscenza sulle cianofitiche produttrici di tossine. *Microcystis aeruginosa*, *M. weissenbergii*, *M. viridis* sono state, in questa area geografica, riconosciute produttrici di epatotossine,

accanto a *Aphanizomenon flos-aquae* sintetizzante neurotossine. I laghi più studiati sotto questo profilo sono il lago Kasumigaura (il secondo lago più grande del Giappone) (SHIRAI *et al.*, 1986), il lago Surwa, e il lago Barato (PREMAZZI e VOLTERRA, 1993).

STANDARD DI BALNEABILITÀ E DI POTABILITÀ

Le misure da prendere in acque di balneazione eutrofiche potenzialmente soggette a fioriture algali, anche di cianofitiche produttrici di tossine, sono oggetto della legislazione tedesca che, in tal senso, integra la normativa comunitaria con i seguenti criteri:

- 1) per trasparenza al disco Secchi > 2 m, pH compreso nell'ambito 6-9 e ossigeno disciolto tra 80 e 120% di saturazione, non vi è rischio di sviluppo di alghe (quindi anche di alghe blu);
- 2) se uno dei sopracitati parametri, anche temporaneamente, supera i limiti definiti, si debbono misurare le concentrazioni di P e N. Sono però improbabili sviluppi algali massicci con concentrazioni di fosforo totale ≤ 20-40 µg/L;
- 3) al di sopra di questi valori le acque sono eutrofe e, come tali, possono far sviluppare ricche popolazioni algali, anche monospecifiche. Perciò sarà bene sottoporle al monitoraggio della clorofilla-*a* e del numero e specie di alghe presenti in un campione di acqua. A concentrazioni di clorofilla-*a* > 20 µg/L, associata a dominanza di alghe potenzialmente allergizzanti, si deve darne informazione soprattutto alle persone che soffrono di allergie. Inoltre si deve ricordare che il 50% delle fioriture di cianofitiche è tossico.

Un simile approccio, avanzato in precedenza dalla repubblica democratica tedesca, suggeriva come limiti 100 µg di clorofilla-*a*/L e una trasparenza minima di 0,5 m per il disco Secchi (KALBE, 1986).

Le sopracitate misure non sono in ogni caso sufficienti a proteggere i bagnanti dallo "scum" che affiora in superficie e che si accumula sulle sponde.

Per un'acqua di balneazione in Australia si stima che un contenuto di cellule < 20.000/ml, misurato nella parte alta della colonna idrica potrebbe essere un livello di sicurezza sufficiente (FALCONER, 1993).

In Australia è stato fissato il limite di 1 mg di tossina /L di acqua da bere (linea guida australiana) che si basa su calcoli di tossicità desunti da dosaggi su animali. La somministrazione p.o. a topi di 0,5 mg di tossina di *Microcystis*/g di p.c. al giorno per 1 anno non causa danni evidenti (FALCONER *et al.*, 1988). Applicando un fattore di sicurezza di 10⁻⁴ per una persona di 60 Kg che beva 2 L di acqua al giorno si è definita una concentrazione di tossina di 1,5 mg/L. Un simile calcolo basato su esperienze di

tossicità subcronica p.o. eseguite su maiali, determina un limite più restrittivo pari a 0,84 mg di microcistina /L di acqua potabile (FALCONER *et al.*, 1994). Il punto di incontro tra i due standard porta al limite di 1 mg di tossina/L.

Sulla base di misure del peso cellulare secco medio delle alghe e stimando in media una tossicità per fioritura (DL_{100}) pari a 25 mg p.s./Kg topo (i.p.), la concentrazione di 5.000 cellule/mL può essere vista come valore soglia di accettabilità per fioriture di cianofitiche presumibilmente produttrici di epatotossine. In base a questi calcoli le CMA per le acque potabili sono, quindi, 1 mg di epatotossine/L o di 5.000 cellule/mL. Questi valori che si basano sulla tossicità epatica acuta e cronica sono suscettibili di ulteriori revisioni se verrà confermata l'attività promotrice tumorale delle microcistine (FALCONER, 1994).

CIANOBATTERI COME CIBO

Recentemente per l'alimentazione animale in allevamenti intensivi ci si è sforzati di trovare alimenti che fossero ricchi di proteine (cianobatteri, lieviti, miceti) da usare come supplementi nella dieta.

Sebbene il consumo di *Spirulina*, esteso anche alla alimentazione umana, non abbia determinato effetti negativi per la salute (CONTRERAS *et al.*, 1979), tuttavia un uso sproporzionato di alimenti monocellulari è sconsigliabile sia per l'elevato contenuto in acidi nucleici che deve essere metabolizzato dal corpo con produzione di acidi urici, agenti causali della gotta (SCRIMSHAW, 1975), sia per il fatto che i cianobatteri sono, dopo gli attinomiceti, i maggiori produttori di metaboliti secondari a effetto non sempre noto, incluse le biotossine. Non si può trascurare che l'esperienza dimostra che alghe non tossiche possono divenire improvvisamente tossiche e che tale mutamento, le cui ragioni sfuggono alla conoscenza scientifica, non può essere regolato. Al momento si sa che l'assunzione in pillola di *Spirulina* prima dei pasti riduce l'appetito (SWITZER, 1982) e ciò ha spinto verso l'inclusione dell'alga nelle diete dimagranti. Tale pratica, però, non sembra priva di rischi: l'uso di *Spirulina* come integratore proteico al 5% della dieta di volatili allevati in batteria ritarda la crescita dei polli (CLEMENT, 1975).

I cianobatteri comunque raccolti in natura nel corso di fioriture algali, nonostante la loro appetibilità per gli animali, sono da sconsigliare per qualsiasi applicazione alimentare perché non si può mai escludere la presenza di stipiti tossici.

SORVEGLIANZA E CONTROLLO DELLE ALGHE POTENZIALMENTE TOSSICHE

In Australia, a seguito dell'evento che nel 1990 portò a una fioritura di *Anabaena* per 1000 Km del fiume

Darling, sono stati definiti tre livelli di allerta ed è stato avviato un controllo regolare con campionamenti settimanali delle acque, conta delle cellule algali ed ispezione aerea dei corpi idrici per la comparsa di colorazioni atipiche e di scum galleggianti.

- 1) Quando le cellule algali raggiungono valori compresi tra 500 e 2000 cellule/mL e/o compaiono odori e sapori sgradevoli scatta il primo livello di allerta. Questo comprende un piano di monitoraggio con prelievi bisettimanali, controllo aereo e sorveglianza organolettica.
- 2) Se le cellule algali superano le 2.000/mL scatta il secondo livello di allerta che prevede 2-3 prelievi/settimana rivolti in particolare a controllare che non compaiano cianofitiche tradizionalmente tossiche per l'Australia (*M. aeruginosa*, *An. circinalis*, *N. spumigena*, *Cylindrospermopsis raciborskii*); si vigila sempre sulla comparsa di "scum" e sulle caratteristiche organolettiche nelle acque. Questo monitoraggio viene mantenuto finché le cianofitiche restano comprese tra 2.000 e 15.000 cellule/mL
- 3) Se si supera la soglia di 15.000 cellule di *M. aeruginosa*/mL (un po' di più per *An. circinalis* e *N. spumigena*) si iniziano a fare test di tossicità ad intervalli di 7-14 giorni e comunque si attiva la introduzione, nella filiera di potabilizzazione, del trattamento a carboni attivi accanto alla rimozione meccanica degli "scum", all'erogazione di acque da profondità o all'emungimento di fonti alternative, al trattamento con algicidi (previsto solo nei laghi), alla informazione dei cittadini e delle autorità sanitarie (FALCONER *et al.*, 1994).

TEST ANALITICI PER IL RILEVAMENTO DI BIOTOSSINE ALGALI

Come test analitici sono stati proposti test basati su saggi biologici, chimici, enzimatici e immunologici.

Biosaggi

Data la molteplicità e la variabilità dei prodotti tossici sintetizzabili da una stessa specie algale vengono prevalentemente usati i biosaggi con topolini anche se si riconosce che la sensibilità di tale tipo di saggio è bassa: circa 3 mg di tossina di cianobatteri uccide un topo del peso di 30 g. Ben più alte sensibilità sarebbero necessarie per sorvegliare la presenza di tossine algali in acque brute o potabilizzate. Per proteggere la salute pubblica occorrerebbe una sensibilità inferiore a 1 mg di tossina/L, equivalente a 1 ng di tossina/mL che, nel caso delle tossine peptidiche, è pari a 1nM. Altri problemi sono dovuti a sottostime analitiche delle concentrazioni, legate alla fase di preparazione degli estratti, nonché a considerazioni etiche sull'uso di animali superiori per il test (PREMAZZI e VOLTERRA, 1993). Il grande pregio del biosaggio, però, è

quello di riuscire ad individuare l'effetto anche di tossine ignote o di miscele tossiche in cui i singoli costituenti possono interagire sinergicamente.

Nei test di routine si usano topi Albino Swiss del peso tra 25 e 30 g, in genere maschi perché più sensibili delle femmine (FALCONER *et al.*, 1988). La tossicità è saggiata per iniezione i.p. di 0,1-1,0 mL di materiale seguita da una osservazione di 24 h. Dopo 24 h in ogni caso gli animali sono sacrificati e se ne esegue l'esame autoptico.

I campioni di acqua devono essere concentrati (ad esempio, per liofilizzazione) e risospesi in soluzione fisiologica semplice o tamponata (0,05 M; pH 7,5) in ragione di 200 mg/10mL. Per la maggior parte delle cianoginosine, la concentrazione può essere eseguita più semplicemente per ebollizione: le tossine di *Microcystis* e *Nodularia* sono termoresistenti così come la antx-a di *Anabaena* e la saxitossina; solo l'antx-a(s) è termolabile e può essere distrutta dalla bollitura (MAHMOOD e CARMICHAEL, 1986). In alternativa possono essere concentrate per passaggio dell'acqua su cartucce di acetonitrile o C-18 a fase inversa, seguita da eluizione in metanolo, essiccamento e risolubilizzazione in soluzione fisiologica. L'adsorbimento sulle cartucce C-18 è però soggetto a perdite per la eccessiva affinità al substrato di certe molecole lipofile, come il β -carotene e le stesse tossine.

Quando nel campione sono presenti solo alghe vive o, al più, una piccola percentuale di alghe morte, la concentrazione può essere ottenuta per centrifugazione. Il pellet è risospeso in soluzione fisiologica (1g in 10 mL) e sottoposto ad ultrasuoni per rompere le cellule. *Microcystis* può essere molto resistente alla sonicazione per cui può essere utile ricorrere al congelamento-scongelo associato alla sonicazione.

Per escludere qualsiasi contaminazione dovuta a batteri trasmessi con l'estratto, questo deve essere filtrato attraverso una MF che ritenga i batteri (maglie da 0,22 μ m) o mantenuto a temperatura di ebollizione per 10 min.

I sintomi della tossicità di *Microcystis* e *Nodularia* in topi sono identici. Gli animali divengono progressivamente pallidi per la perdita di sangue dal sistema circolatorio e muoiono in genere tra 15 min e 4 h dall'iniezione; il loro fegato è rigonfio ed appesantito dal sangue con distruzione delle vene sinusoidali e infiltrazioni di eritrociti nelle aree dove si riscontra la disorganizzazione degli epatociti. Certe microcistine –come la microcistina-LR, una delle più comuni varianti di microcistine– determinano una necrosi inizialmente centrilobulare; altre microcistine –come la microcistina-YM (tirosina, metionina)– inducono necrosi perilobulare (FALCONER *et al.*, 1981; MEREISH *et al.*, 1991).

Le cianofeece neurotossiche determinano effetti molto

simili tra loro. Una iniezione letale i.p. in topi di estratto di *Anabaena* sonicata contenente antx-a causa sintomi neuromuscolari entro 5 min e morte in 15 min. Prima di questa morte improvvisa, il topo mostra respiro mozzo e improvvisi movimenti saltellanti (CARMICHAEL *et al.*, 1990). Gli animali intossicati da antx-a(s) mostrano eccessiva lacrimazione e salivazione prima di morire (CARMICHAEL *et al.*, 1990). L'analisi necroscopica dei topi morti per neurotossine non mostra alcun danno visibile a tessuti ed organi.

Esistono nuove tossine prodotte da cianofeece, ignote chimicamente, ma il cui effetto può essere verificato con la necroscopia dei soggetti trattati, che è obbligatoria in tali tipi di saggi. L'alga *Cylindrospermopsis*, isolata frequentemente in aree tropicali, produce un alcaloide tossico che, iniettato in topi, attacca una serie di tessuti causando la progressiva necrosi degli organi. La morte interviene per danno renale ed epatico a 2-7 giorni dal trattamento (HAWKINS *et al.*, 1985).

Sono stati predisposti anche metodi di misura delle tossine di cianofeece per prodotti alimentari derivati da ambienti acquatici. Infatti tossine prodotte da *Nodularia* sono state trovate in molluschi eduli raccolti alle foci di fiumi (FALCONER *et al.*, 1992). In tal caso basta ricorrere alla consueta tecnica della omogeneizzazione. È ipotizzabile anche di dover misurare le tossine nei pesci e nella carne per assicurare che il consumo di questi prodotti sia sicuro una volta che pesci ed animali siano stati esposti ad alghe tossiche.

Per verificare la tossicità associata a tessuti in pesci e carni, potendosi le tossine legare alle proteine cellulari, si deve procedere alla digestione con enzimi proteolitici dell'omogenato di tessuto congelato. Le tossine sono resistenti alla tripsina e alla chimotripsina (FALCONER *et al.*, 1992).

Le epatotossine colpiscono il metabolismo di tutti gli eucarioti, piante ed animali (MACKINTOSH *et al.*, 1990). L'azione tossica esercitata su enzimi regolativi altamente conservativi (CODD, 1993) fa ritenere che molte forme viventi della scala evolutiva potrebbero essere impiegate in questi saggi tossicologici. Infatti il bersaglio delle tossine sono le fosfatasi, uno dei sistemi enzimatici più diffusi nel mondo animale e vegetale, tra gli eucarioti e i procarioti. Le tossine delle cianofeece possono influenzare il metabolismo, la crescita, la locomozione, la nutrizione degli organismi superiori, la copertura immunitaria e la sensibilità a contrarre infezioni secondarie, nonché la sopravvivenza. Esempi della loro azione sono l'inibizione della alimentazione e della respirazione in *Paramecium*, la promozione di risposte a shock in *Euglena*, la tossicità acuta delle microcistine sul platelminto *Turbellaria* e

sull'artropode *Artemia*. Anche *Daphnia* è molto sensibile alle tossine peptidiche delle cianofitiche (KIRIVANTA *et al.*, 1991). La tossicità acuta di neurotossine ed epatotossine può essere saggiata su adulti di *Culex pipiens* o su larve di *Aedes aegypti* (KIRIVANTA *et al.*, 1993). Il Microtox è sensibile nei confronti delle epatotossine (VOLTERRA *et al.*, 1995). Biosaggi con batteri diversi da *Vibrio fischeri* non sono adatti; in un test che usa *Pseudomonas putida*, per esempio, le cianoginosine promuovono la crescita invece di inibirla (LAHTI *et al.*, 1993). Questo effetto paradossale può essere legato all'induzione di uno stato anomalo di stress.

La difficoltà principale dei biosaggi è la standardizzazione. Questo è invece il vantaggio del Microtox, il cui svantaggio è la possibilità di generare risultati falsi positivi dovuti alla tossicità di antimetaboliti o inibitori procariotici spesso frequenti in estratti algali. Sono anche probabili falsi negativi in presenza di neurotossine di tipo alcaloide e organofosforico.

L'azione delle cianoginosine nei confronti dei pesci non è univoca. Se l'iniezione intraperitoneale determina in trote la morte con danni epatici, questa non si verifica sempre a seguito di immersione in acque ricche di alghe cianofitiche tossiche. Le morie ittiche, più che l'effetto diretto della esposizione alle bio-, cito- o endo-tossine, sono più probabilmente la conseguenza indiretta degli scompensi fisico-chimici che si determinano in acque con alti contenuti organici anche viventi (fitoplancton). Esistono, comunque, carpe che possono assumere alghe tossiche senza danni apparenti.

In considerazione delle marcate e rapide alterazioni morfologiche prodotte da microcistine e nodularine sul citoscheletro di epatociti, questi possono essere utilmente impiegati in saggi per rilevare la presenza delle epatotossine algali. Poiché gli epatociti dei mammiferi sono più difficili da preparare di quelli dei pesci, questi ultimi potrebbero essere più utilmente impiegati. La citometria a flusso può aiutare a distinguere le modificazioni morfologiche delle cellule (TOIVOLA *et al.*, 1993). Gli epatociti in coltura si arrotondano e si coprono di villi ma, se esposti alle microcistine, perdono i microvilli e formano gruppi di grandi bolle che protrudono dalla membrana cellulare.

Saggi chimici

In alternativa esistono tecniche HPLC (High Performance Liquid Chromatography) che misurano l'assorbimento agli UV di microcistine-nodularine a 240 nm. La loro sensibilità consente di poter misurare 0,5-2,0 mg di microcistina (FLETT e NICHOLSON, 1991).

Per procedere all'analisi con HPLC il materiale (concentrato di alghe) deve essere sottoposto ad estrazione. Il

solvente usato è una miscela di butanolo/metanolo/acqua (5:20:75) (BROOKS e CODD, 1986), ma anche una soluzione acquosa in acido acetico 5% è egualmente efficace (HARADA *et al.*, 1988a, b). L'estratto è essiccato e ridisciolto in tampone fosfato (0,05 M; pH 8,5) per caricare una cartuccia C-18 precedentemente lavata con acetonitrile ed acqua. L'eluizione differenziale con metanolo al 40% prima della eluizione della tossina eseguita con il 100% di metanolo, porta ad un estratto semipurificato.

Tra i solventi per l'HPLC sono stati usati anche acetonitrile al 26% (BROOKS e CODD, 1986), oppure un gradiente di acetonitrile 15-25% in tampone acetato di ammonio 0,007 M (RUNNEGAR *et al.*, 1986).

Per usare la tecnica HPLC sull'acqua occorre concentrare un volume di acqua per ebollizione o su una colonna C-18 a fase inversa. L'efficienza dell'adsorbimento/deadsorbimento deve essere valutata preventivamente per apportare le dovute correzioni alle concentrazioni misurate.

Saggi biochimici

Per certe tossine sono stati approntati saggi enzimatici, ad esempio valutando l'attività anticolinesterasica dell'antx-a o le fosfatasi proteiche inibite dalle epatotossine (MACKINTOSH *et al.*, 1993).

Antisieri monoclonali e policlonali sono stati preparati contro le microcistine. La sensibilità in tali tipi di test può essere molto spinta (fino a 1 ng/mL), ma esiste il rischio di reazioni crociate con tossine diverse da quelle contro cui si sono costruiti gli anticorpi (KFIR *et al.*, 1986). Questo inconveniente è effettivo, se si considera la molteplicità dei principi tossici e dei loro isomeri.

METABOLISMO E TOSSICOCINESI

Le microcistine, dopo 30 minuti dalla somministrazione in ratti, si ritrovano nel fegato. L'entrata della tossina negli epatociti è mediata dagli acidi biliari (RUNNEGAR *et al.*, 1981, 1991), i quali hanno una ampia specificità di trasporto transmembrana degli anioni. Una protezione contro la tossicità rilevata sugli epatociti dopo somministrazioni i.p. di microcistina si ottiene con dosi preventive di inibitori del trasporto dell'acido biliare (HERMANSKY *et al.*, 1991) quali rifampicina (RUNNEGAR *et al.*, 1981; THOMPSON *et al.*, 1988), ciclosporina (HERMANSKY *et al.*, 1991), ed altri composti ad azione analoga (ZIEGLER e FRIMMER, 1986).

Nei mammiferi è probabile una ricircolazione della tossina simile a quella degli acidi biliari: dall'intestino al fegato e, attraverso la bile, di nuovo verso l'intestino. La tossina si ritrova così di ritorno nel tubo digerente e nei reni. L'escrezione urinaria e fecale rimuove la tossina o i suoi prodotti di degradazione dal plasma (FALCONER, 1993).

Come nel caso di altre biotossine algali (FUJIKI *et al.*, 1988), la diarrea è probabilmente stimolata dalla fosforilazione che controlla la secrezione intestinale del sodio come nella malattia del colera causata dalla tossina secreta da *Vibrio cholerae*, anche se con altro meccanismo (JOHNSON, 1982).

Dosi elevate di tossine epatiche iniettate i.p. determinano estese emorragie nel fegato e necrosi degli epatociti (FALCONER *et al.*, 1981). La causa della mortalità è lo shock conseguente alla perdita di sangue con un incremento del peso del fegato, dove si accumula il 60% del sangue. Incrementi della attività epatica sono registrabili nel sangue attraverso i livelli della aspartato-amino-trasferasi e della lattato-deidrogenasi, che indicano l'avvenuta lisi degli epatociti. Il danno agli epatociti è accompagnato dalla perdita della integrità delle cellule endoteliali (FALCONER *et al.*, 1991).

Su topi trattati p.o. con microcistina per un anno si notano effetti tossici cronici, soprattutto nei maschi che mostrano danni epatici cronici e innalzamento del tasso di alaninotrasferasi nel plasma (FALCONER *et al.*, 1988). Anche la mortalità è maggiore tra i maschi che tra le femmine di pari età sottoposte allo stesso trattamento (FALCONER *et al.*, 1988).

Anche su animali più grandi dei topi, ad esempio le pecore, l'organo bersaglio è sempre il fegato pur se compaiono estese petecchie ed ecchimosi sottocutanee emorragiche anche nelle mucose dello stomaco, dell'intestino tenue e crasso. Alla necropsia gli animali mostrano epatomegalia (con peso del fegato 2-3 volte superiore al normale) e, spesso, emorragie intraepatiche (JACKSON *et al.*, 1984).

Ultrastrutturalmente, almeno nei modelli di topi e ratti, le cellule epatiche intatte mantengono i loro nuclei e mitocondri, sebbene questi organuli appaiano rigonfi. Il reticolo endoplasmatico diviene vescicolato e privo dei granuli (parziale o totale perdita dei ribosomi dalle vescicole) (DABHOLKAR e CARMICHAEL, 1987).

Le cellule epatiche deformate conservano integro il trasporto ionico e il pH intracellulare e continuano a respirare e a sintetizzare ATP, proteine e DNA (FALCONER e RUNNEGAR, 1987). All'interno delle cellule, però, l'inibizione delle fosfatasi proteiche 1 e 2A causa drammatici innalzamenti nella quantità di proteine fosforilate (YOSHIZAWA *et al.*, 1990). L'azione inibente nei confronti della fosfatasi non si limita alle cellule dei mammiferi, ma si estende anche alle fosfatasi delle piante (MACKINTOSH *et al.*, 1990).

La iperfosforilazione delle proteine cellulari include, tra le altre, la iperfosforilazione delle proteine associate con il citoscheletro (FALCONER e YEUNG, 1992). Negli

epatociti deformi compaiono microfilamenti di actina (ERIKSSON *et al.*, 1989) e, all'interno della cellula intossicata, si presenta un citoscheletro simile a quello osservato nel corso della mitosi (CHOU *et al.*, 1989), dove i filamenti del fuso mitotico sono costituiti da proteine fosforilate presenti nel citoplasma e i gruppi fosforilati formano i costituenti labili di tali proteine (FALCONER e YEUNG, 1992).

La intossicazione da epatotossine comporta quindi, apparentemente, una transizione della cellula verso lo stato mitotico (FALCONER e YEUNG, 1992). È logica la conseguente probabile promozione tumorale poiché l'aumento della mitosi è essenziale per accelerare la crescita cellulare, meccanismo fondamentale nella carcinogenesi. Parecchi oncogeni, nei tumori indotti da virus, operano allo stesso modo intervenendo sulla regolazione della fosforilazione nelle cellule infette. Ciò dimostra lo stretto legame che esisterebbe tra cancro e fosfoproteine intracellulari (LAND *et al.*, 1983).

Effetti cancerogeni, teratogeni, promotori tumorali in studi in laboratorio e implicazioni a lungo termine sull'uomo

La somministrazione p.o. di estratti di *Microcystis* diluiti a basse concentrazioni nell'acqua da bere aumenta la mortalità di topi (specie maschi) per danni epatici. Molto spesso le morti sono dovute però a broncopneumopatie indicando un'azione delle tossine anche sui meccanismi di resistenza alle malattie (presumibilmente inducendo uno stato di stress). Pochi, invece, sono i tumori (non focalizzati ad uno specifico organo) anche dopo un anno di trattamento p.o. con alte dosi di *Microcystis* tossigene (FALCONER *et al.*, 1988). Tale riscontro contrasta con la tesi che le epatotossine promuovano tumori epatici (NISHIWAKI-MATSUSHIMA *et al.*, 1992).

Uno studio eseguito per vagliare la promozione tumorale epiteliale in topi trattati p.o. con estratti di cianofeece cui era stato precedentemente applicato sulla pelle un attivatore tumorale (dimetilbenzoantracene) indicano, invece, un significativo incremento di papillomi della pelle nei topi trattati con *Microcystis* (produttori di epatotossine), ma non in quelli che avevano bevuto estratti di *Anabaena* (non produttore epatotossine) (FALCONER e BUCKLEY, 1989).

L'attivazione della fosforilasi A e l'inibizione delle fosfatasi proteiche tipo 1 (PP1) e tipo 2A (PP2A) da parte di microcistine e nodularine spiega come questi veleni possano essere promotori tumorali in sistemi bistadio (in cui c'è un attivatore) (FUJIKI *et al.*, 1981).

Attività teratogene per somministrazione croniche orali di estratti di *Microcystis* sono state dimostrate in topi di entrambi i sessi abbeverati con acqua contenente gli estratti

di *Microcystis* per 17 settimane prima dell'accoppiamento, durante la gravidanza e fino a 5 giorni di allattamento. Il 10% dei topi, apparentemente normali, mostrava una grande differenza tra lo sviluppo del cervello (più piccolo) e dello scheletro. I danni neuronali erano prevalentemente concentrati nella regione dell'ippocampo (FALCONER *et al.*, 1988).

CONSEGUENZE ECOLOGICHE

In genere in riserve idriche ripetutamente soggette a fioriture di cianobatteri la vita acquatica è ridotta fino a divenire inesistente (FRANCIS, 1987). Indipendentemente dalla tossicità, sono le condizioni ambientali che non favoriscono il mantenimento di equilibrate biocenosi.

La depressione delle altre forme fitoplanctoniche potrebbe dipendere dalla schermatura della luce determinata dall'eccesso di materiale flottante, ma potrebbe anche essere la conseguenza dell'inibizione delle fosfatasi, enzimi presenti in ogni forma vivente, incluse quelle vegetali (SIEGL *et al.*, 1990).

Alla fioritura di cianofitee fa riscontro il declino dei grandi cladoceri e di altri zooplantoni (VASCONCELOS, 1990) per i quali le cianofitee possono essere tossiche e/o indigeribili (NIZAN *et al.*, 1986). In ogni caso, anche quando vengono consumate, le alghe blu tossiche riducono il ritmo riproduttivo dei rotiferi.

Anche i molluschi filtratori –come *Anodonta cygnea*– che sembrano accumulare peptidi tossici senza conseguenze negative macroscopiche (pur trasferendo questo carico di veleni a forme biologiche superiori più sensibili), sottoposti ad esperimenti in acquario con alghe tossiche hanno evidenziato anomalie dell'epatopancreas e riduzione dei ritmi respiratori e del volume di acqua filtrata (PREMAZZI e VOLTERRA, 1993).

Il crostaceo *Astacus astacus* può sopravvivere nei laghi infestati da cianofitee tossiche, ma assume caratteri organolettici sgraditi che limitano il consumo delle sue carni.

Le cianofitee tossiche causano morie di fauna ittica e avicola ittiovora (ZHANG *et al.*, 1991). La presenza di alghe agglomerate e filamentose interferisce negativamente sul meccanismo di assunzione di ossigeno attraverso le branchie, ostruendole meccanicamente. I pesci onnivori possono assumere tossine accumulate in zooplantoni. È dibattuto l'effetto letale sui pesci per assunzione delle tossine con l'alimento (DEEM e THORP, 1939; ERIKSSON *et al.*, 1986). È probabile vi siano differenti effetti per neurotossine e epatotossine. Alcune specie di carpe potrebbero cibarsi dello "scum" delle cianofitee e potrebbero essere impiegate come "grazers" a patto di non consumarne, come norma igienica preventiva, le carni (VOLTERRA,

1994).

Le tossine esercitano effetti negativi sugli uccelli acquatici attraverso l'assunzione di acqua, di alimenti contaminati e di benton in cui le tossine possono essere concentrate (anche perché accumulate sui sedimenti una volta rilasciate dalle alghe produttrici). Infatti si ritiene che le epatotossine siano molto stabili negli ambienti naturali (FALCONER *et al.*, 1983), anche se studi specifici condotti sulla microcistina-LR in laboratorio assegnano a questa biotossina una emivita di 3 giorni (JAMES *et al.*, 1993). Si ritiene che possano, non biodegradate, raggiungere per percolamento acque di falda poste a 40 m di profondità (GERBA e GOYAL, 1985).

MISURE DI EMERGENZA PER IL

CONTROLLO DELLE FIORITURE ALGALI

L'uso del solfato di rame come algicida è consigliabile solo in fase di formazione di bloom perché il rilascio del contenuto cellulare, incluse le tossine, aumenta la pericolosità dell'acqua da bere. In ogni caso, dopo il trattamento, l'acqua deve essere interdetta all'assunzione umana ed animale per 5-7 giorni per consentire la riduzione della concentrazione di rame disciolto e dei caratteri organolettici dovuti alle cianofitee.

Il trattamento è sconsigliabile in fiumi perché ha un impatto ecologico pericoloso (HENRY *et al.*, 1992).

Gli effetti a breve termine del trattamento comprendono:

- 1) l'eliminazione temporanea delle alghe;
- 2) la ingenerazione di uno stato di anossia conseguente alla decomposizione algale;
- 3) l'accelerazione del riciclo di fosforo e la conseguente rapida ricomparsa delle alghe;
- 4) la scomparsa di macrofite utili per catturare i macronutrienti e importanti luoghi di "nursery" per la vita acquatica;
- 5) la riduzione degli invertebrati macrobentonici (HANSON e STEFAN, 1984), ma anche dei pesci;
- 6) la possibilità di un'"escalation" nel trattamento. In uno stesso specchio di acqua in Australia si passò da un primo intervento con l'uso di 27 t di solfato di rame per eliminare, nel 1984, in 5 giorni, una eccezionale fioritura di cianobatteri, all'impiego di 250 t due anni dopo e di 400 t nel 1990, quando ormai la cianofitea *Oscillatoria* era stata sostituita da forme resistenti al rame, quale *Phormidium* (GUPTA *et al.*, 1985).

Quando si usa solfato di rame ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) le concentrazioni impiegate sono comprese tra 0,2-0,4 mg/L con il limite superiore di 1 mg/L, che corrisponde al valore in cui in un'acqua da bere si sviluppano caratteri organolettici sgraditi all'utenza (GUPTA, 1986; GUPTA,

1989).

In aggiunta si può raccogliere e allontanare il materiale flottante, con panne galleggianti nei primi 4 cm di acqua, e mantenere libera dallo scum una parte dello specchio di acqua destinato all'abbeveramento.

Per i suoi effetti negativi sull'uomo e sugli animali il trattamento con solfato di rame va comunicato al pubblico. In proposito vi fu un incidente in Australia che coinvolse 149 persone dopo un trattamento con solfato di rame che aveva determinato la lisi cellulare con conseguente rilascio delle biotossine. Un episodio analogo è accaduto in California dove, a seguito del decadimento di *Oscillatoria* successivo all'uso dell'alghicida, si svilupparono anche caratteri organolettici sgraditi dovuti al rilascio di MIB (metilisoborneolo).

Recentemente si è trovato che il contenuto di potassio può ridurre lo sviluppo di alcune cianofite, come *Microcystis*. Poiché il potassio non è tossico per le forme di vita superiore, questa forma di controllo potrebbe essere attuata in alternativa al più tradizionale impiego del rame (PARKER *et al.*, 1997).

MISURE PREVENTIVE PER IL CONTROLLO DELLE FIORITURE ALGALI

I cianobatteri rappresentano la risposta biologica all'eutrofizzazione. A parte altre considerazioni idrodinamiche e meteorologiche, peraltro non controllabili, essi hanno bisogno particolarmente di fosforo; infatti molte specie di questo gruppo fissano l'azoto dall'atmosfera, ma dipendono per il fosforo dalla sua disponibilità nella matrice idrica. Per prevenire l'eutrofizzazione delle acque, condizione necessaria allo sviluppo di bloom di cianofite, occorre interferire sulla concentrazione di fosforo limitandone l'uso come fertilizzante e la presenza nei liquami grezzi e in uscita dagli impianti di trattamento. In questi ultimi, una efficace rimozione del fosforo può essere attuata con tecniche di flocculazione-precipitazione-filtrazione.

Recentemente è stato dimostrato il ruolo dei nutrienti, dell'illuminazione solare e della temperatura sulla stimolazione alla produzione di epatotossine (microcistine) concludendo che, forse, la riduzione dei carichi di fosforo nei corpi idrici -oltre a far diminuire le fioriture algali- può incidere sul contenuto tossico delle cianofite (RAPALA *et al.*, 1997).

Le fioriture di cianofite accadono frequentemente in corpi idrici stratificati dove il freddo o strati anaerobici di fondo mobilizzano il fosforo dai sedimenti rendendolo disponibile per le cianofite. Un metodo per prevenire le fioriture nei laghi è l'aerazione dell'acqua con conseguente destratificazione e mancata mobilitazione del fo-

sforo. Questo sistema crea, però, altri problemi ecologici.

LA POTABILIZZAZIONE DI ACQUE RICCHE DI FITOPLANKTON

Indipendentemente dalla loro tossicità, le alghe interferiscono sulla qualità dell'acqua potabile (VOLTERRA, 1995). Negli impianti tradizionali (preclorazione, precipitazione, filtrazione rapida e postclorazione) le difficoltà di rimozione delle alghe crescono passando dalle diatomee alle clorofite e alle cianofite, soprattutto se filamentose.

I possibili inconvenienti riscontrabili dopo il trattamento di potabilizzazione di un'acqua ricca di fitoplancton sono (VOLTERRA, 1992; VOLTERRA 1993a; 1993b):

1. presenza di sostanze in sospensione, incluse le alghe che possono superare la barriera dei filtri;
2. contenuto di sostanza organica nell'acqua potabile. Polimeri acidi con gruppi idrossilici e carbossilici prodotti dalle microfite influenzano negativamente la flocculazione con idrossidi di metalli trivalenti (Al, Fe). A concentrazioni >1 mg/L di DOC (Dissolved Organic Carbon) si ha la destabilizzazione e la disaggregazione dei fiocchi. In presenza di bloom algali (specie di cianofite), all'aumento del flocculante non corrisponde la eliminazione/riduzione della torbidità. L'eccesso di additivo può essere rilasciato in rete con seri pericoli per i soggetti dializzati e, sembra, altri effetti sulle sindromi di pazzia senile (limitatamente ai sali di alluminio) (WHO, 1994);
3. inefficienza della disinfezione e formazione di un eccesso di triometani (THM) e, più in generale, di organoalogenati conseguenti all'eccesso di cloro usato e all'alto contenuto di sostanza organica. Ciò può determinare la ricrescita di microrganismi in rete (GRAY, 1996) e il possibile innesco di fenomeni di corrosione e/o incrostazione e l'accumulo di sedimenti nei punti morti della rete;
4. sostegno allo sviluppo di protozoi e metazoi in rete con rilascio di ammoniaca, fosfati e silicati dai sedimenti e dalla popolazione microbica, algale e animale che si trova nell'acquedotto;
5. ricrescita di alghe nei serbatoi;
6. introduzione di caratteri organolettici sgraditi all'utenza, prodotti da alghe o da attinomiceti, funghi e da specie di *Pseudomonas* insediatisi nella rete (WHO, 1994);
7. nel caso di cianofite, elevati contenuti di endotossine e anche di biotossine e/o citotossine (SYKORA e KELETI, 1985), se in presenza di stipiti tossici.

Le alghe e i metaboliti rilasciati interferiscono con i sistemi di potabilizzazione incidendo fortemente sui costi di trattamento e sulla loro efficacia. Già l'allungamento

dei tempi di potabilizzazione comporta la necessità di adeguamenti impiantistici (es. vasche di maggior capacità). Inoltre gli interventi vanno modulati in funzione della variabilità quali-quantitativa della popolazione algale; occorre effettuare le rigenerazioni e i lavaggi al momento opportuno e calibrare accuratamente gli additivi tenendo conto del fatto che la concentrazione richiesta può variare con il ciclo nictemerale delle alghe nell'acqua grezza.

La difficoltà di rimozione delle microalghe, in particolare delle cianofite, è di diversi ordini:

1. meccanico (i filamenti e le colonie si frammentano e superano così più facilmente gli sbarramenti costituiti dalle varie sezioni dell'impianto);
2. fisico (i gas intracellulari fanno galleggiare le ganghe aggregate);
3. chimico (gli esopolimeri algali ostacolano la complessazione e la flocculazione, anche con dosi elevate di additivi).

I trattamenti meccanici e fisici sono da preferire a quelli chimici (KEIJOLA *et al.*, 1988).

I filtri lenti sono molto più efficienti di quelli rapidi. Alcune cianofite (ad esempio *Oscillatoria*) possono però penetrare la barriera costituita dai letti di filtrazione, soprattutto quando i titoli delle acque grezze contengono più di 100.000 cellule/ml (BAYS, 1969). La microfiltrazione con maglie da 23 µm consentirebbe una rimozione di circa l'80-90% delle forme filamentose e del 65% di quelle coloniali mucillaginose (JAMES *et al.*, 1993). Per rimuovere una maggiore percentuale di microfite, la flottazione può essere più efficiente della flocculo-sedimentazione.

I sistemi tradizionali di filtrazione non sono sufficientemente efficienti nel rimuovere le tossine algali. Esperimenti condotti con tossine estratte da un bloom misto di *M. wesenbergii* e *M. viridis* o ottenute da una coltura di laboratorio di *O. agardhii* diluite in acqua in ragione di 30 e 60 µg/L hanno messo in luce che i tradizionali trattamenti di flocculazione-filtrazione-coagulazione consentono un minimo decremento della concentrazione delle tossine (HIMBERG *et al.*, 1989). Il sistema più efficace di abbattimento delle tossine è rappresentato dai carboni attivati (granulari e in polvere) (FALCONER *et al.*, 1989; RUF e REITTER, 1990); il permanganato di potassio e l'ozono, applicati sia sull'acqua grezza sia su quella finita, ossidano una buona parte di composti, inclusi i principi tossici (JAMES *et al.*, 1993).

L'efficacia del procedimento di potabilizzazione di acque con alghe e/o tossine può essere valutato attraverso la torbidità e il valore di permanganato dell'acqua in uscita o con saggi HPLC per evidenziare la presenza delle tossine (HIMBERG *et al.*, 1989).

BIBLIOGRAFIA

- ADELMAN W.J., JR., FOHLMEISTER J.F., SASNER J.J. JR., IKAWA M., 1982 - Sodium-channels blocked by aphatoxin obtained from the blue-green alga *Aphanizomenon flos-aquae*. *Toxicon* **20**: 513-516.
- BAYS L.F., 1969 - Pesticide pollution and the effects on the biota of Chew Valley Lake. *Wat. Treat. Exam.* **18**: 295-326.
- BERNHARDT H., CLASEN J., 1982 - Successes and failures on the management of lake restoration. Report on the Congress on Eutrophication of Small Lakes, Rome February 10-11.
- BILLINGS W.H., 1981 - Water-associated human illness in northeast Pennsylvania and its suspected association with blue-green algal blooms. In: *The Water Environment: Algal Toxins and Health*. W.W. Carmichael (Ed.) Plenum Press, NY and London: 423-455.
- BLACKBURN S.I., JONES J.G., 1993 - A coccolithophorid bloom in Jervis Bay, eastern Australia. 6th Internat. Conf. On Toxic Marine Phytoplankton, Nantes (France), 18-22 October 1993.
- BROOKS W.P., CODD G.A., 1986 - Extraction and purification of toxic peptides from natural blooms and laboratory isolated of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. *Letters Appl. Microbiol.* **2**: 1-3.
- BRUNO M., GUCCI P.M.B., PIERDOMINICI E., SESTILI P., JOPPOLO A., VOLTERRA L., 1992 - Production of microcystin-like toxins in different freshwater species of *Oscillatoria*. *Toxicon* **32**: 1115-1118.
- CARDELLINA J.H., MARNER F.J., MOORE R.E., 1979 - Seaweed dermatitis: structure of lymbyatoxin A. *Science* **204**: 193-195.
- CARMICHAEL W.W., 1988 - Toxins of fresh-water algae. In "Handbook of natural toxins" A. Tu (Ed.) Marcel Dekker Inc. 121-147.
- CARMICHAEL W.W., 1992 - Cyanobacteria secondary metabolites. A review. *J. Appl. Bacteriol.* **72**: 445-459.
- CARMICHAEL W.W., 1996 - Liver failure and human deaths at a haemodialysis centre in Brazil: microcystins as a major contributing factor. *Harmful Algae News.* **15**: 11.
- CARMICHAEL W.W., BIGGS D.F., PETERSON M.A., 1979 - Pharmacology of anatoxin-a, produced by the freshwater cyanophyte *Anabaena flos-aquae* NRC 44-1. *Toxicon* **17**: 229-236.
- CARMICHAEL W.W., FALCONER I.R., 1993 - Diseases related to freshwater blue-green algal toxins, and control measures. In "algal Toxins in seafood and drinking water". Academic Press, Hartcourt Brace & Comp., Publ., London. 187-209.
- CARMICHAEL W.W., MAHMOOD N.A., HYDE E.G., 1990 - Natural toxins from cyanobacteria (blue-green algae). In "Marine Toxins: Origin, Structure and Molecular Pharmacology" Hall S., Strichartz G (Eds.) Washington DC. American Chemical Soc.: 87-106.
- CARMICHAEL W.W., SCHWARTZ L.C., 1984 - Preventing livestock deaths from blue-green algae poisoning. U.S. Dept. of Agriculture. Farmer's Bull. N 2275, February, 11pp.

- CHOU Y.H., ROSEVEAR E., GOLDMAN R.D., 1989 - Phosphorylation and disassembly of intermediate filaments in mitotic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **86**: 1885-1889.
- CHORUS I., KLEIN G., FASTNER J., ROTARD W., 1992 - Off-flavors in surface waters - how efficient is banal filtration for their abatement in drinking water? *Wat. Sci. Technol.* **25**: 251-258.
- CHORUS I., SCHLAG F., 1993 - Importance of intermediate disturbances for the species composition and diversity of phytoplankton in two very different Berlin lakes. *Development in Hydrobiology* **81**: 67-92.
- CLEMENT G., 1975 - Producing *Spirulina* with CO₂. In "Single Cell Protein II". Tannenbaum S.R., Wang D.I.C. (Eds.) MIT Press, Cambridge, MA: 467-474.
- CODD G.A., BELL S.G., BROOKS W.P., 1989 - Cyanobacterial toxins in water. *Water Science & Technology* **21**: 1-13.
- CODD G.A., 1993 - Biological significance of cyanobacterial toxins. 1st Internationale Symposium on Detection Methods for Cyanobacterial (Blue-green Algal) Toxins. 27-29 September, University of Bath, UK.
- CODD G.A., 1996 - Awareness of Cyanobacterial or algal blooms at the Premonstratensian Monastery of the Green Loch, Souleseat Scotland, from the twelfth century and cattle poisonings attributed to cyanobacterial hepatotoxins at this location eight hundred years later. *Harmful Algae News.* **15**: 4.
- CODD G.A., BELL S., 1995 - National Rivers Authority R&D Rep. 29 (HMSO London): 30pp.
- CODD G.A., EDWARDS C., BEATTIE K.A., BARR W.M., GUNN G.J., 1992 - Fatal attraction to cyanobacteria. *Nature* **359**: 110-111.
- CONTRERAS A., HERBERT D.C., GRUBBS B.G., CAMERON I.L., 1979 - Blue-green alga *Spirulina* as the sole dietary source of protein in sexually maturing rats. *Nutr. Rep. Int.* **19**: 749-763.
- COOK W.O., BEASLEY V.R., LOVELL R.A., 1989 - Consistent inhibition of peripheral cholinesterases by neurotoxins from the freshwater cyanobacterium *Anabaena flos-aquae*: studies on ducks, swine, mice and sterr. *Environ. Toxicol. Chem.* **8**: 915-922.
- DABHOLKAR A.S., CARMICHAEL W.W., 1987 - Ultrastructural changes in the mouse liver induced by hepatotoxin from the freshwater cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* strain 7820. *Toxicon* **25**: 285-292.
- DILLIMBERG H.O., DEHNEL M.K., 1960 - Toxic waterbloom in Saskatchewan, 1959. *Can. Med. Assoc. J.* **83**: 1151-1154.
- EDWARDS C., BEATTIE K., HOPPER M.W., CODD G.A., 1993 - Qualitative and quantitative analysis of cyanobacterial neurotoxins. 1st International Symposium on Detection Methods for Cyanobacterial (Blue-green Algal) Toxins. 27-29 September University of Bath, UK. L9.
- EKMANN-EKEBOM M., KAUPPI M., SIVONEN K., NIEMI M., LEPISTO L., 1992 - Toxic cyanobacteria in some Finnish lakes. *Environ. Toxicol. Wat. Qual.* **7**: 201-213.
- ERIKSSON J.E., PAATERO G.I.L., MERILUOTO J.A.O., CODD J., KASS G.E.N., NICOTERA P., ORRENIUS S., 1989 - Rapid microfilament reorganization induced in isolated rat hepatocytes by microcystin-LR, a cyclic peptide toxin. *Experimental Cell Res.* **185**: 86-100.
- FALCONER I.R., 1989 - Effects on human health of some toxic cyanobacteria (blue-green algae) in reservoirs, lakes, and rivers. *Tox. Assess. Int. J.* **4**: 175-184.
- FALCONER I.R., 1991 - Tumor promotion and liver injury caused by oral consumption of cyanobacteria. *Environ. Toxicol. Water Qua.* **6**: 177-184.
- FALCONER I.R., 1993 - Measurement of toxins from blue-green algae in water and foodstuffs. In *Algal Toxins in Seafood and Drinking Water*". Academic Press, Hartcourt Brace & Comp. Publ., London.: 165-175.
- FALCONER I.A., 1993b - Mechanism of toxicity of cyclic peptide toxins from blue-green algae. In *Algal Toxins in Seafood and Drinking Water*". Academic Press, Hartcourt Brace & Comp. Publ., London: 177-186.
- FALCONER I.R., 1994 - *Algal Toxins in Seafood and Drinking Water*. Academic Press, Harcourt Brace & Company Publ., London.
- FALCONER I.R., BERESFORD A.M., RUNNEGAR M.T.C., 1983 - Evidence of liver damage by toxin from a bloom of the blue-green alga *Microcystis aeruginosa*. *Med. J. Aust.* **1**: 511-514.
- FALCONER I.R., BUCKLEY R.H., 1989 - Tumor promotion by *Microcystis*, a blue-green alga occurring in water supplies. *Med. J. Aust.* **150**: 351.
- FALCONER I.R., BURCH M.D., STEFFENSON D.A., CHOICE M., COVERDALE O.R., 1994 - Toxicity of the blue-green alga (Cyanobacterium) *Microcystis aeruginosa* in drinking water growing pig, as an animal model for human injury and risk assessment. *Exper. Toxicol. Wat. Qual. Internatl. J.*, **9**: 131-139.
- FALCONER I.R., DORNBUSCH M., MORAN G., YEUNG S.K., 1992 - Effect of the cyanobacterial (blue-green algal) toxins from *Microcystis aeruginosa* on isolated enterocytes from chicken small intestine. *Toxicon* **30**: 790-793.
- FALCONER I.R., JACKSON A.R.B., LANGLEY J., RUNNEGAR M.T., 1981 - Liver pathology in mice poisoning by the blue-green alga *Microcystis aeruginosa*. *Aust. J. Biol. Sci.* **34**: 179-187.
- FALCONER I.R., RUNNEGAR, M.T.C., 1987 - Effects of the peptide toxin from *Microcystis aeruginosa* on intracellular calcium, pH and membrane integrity in mammalian cells. *Chem. Biol. Interactions* **63**: 215-225.
- FALCONER I.R., RUNNEGAR M.T.C., BUCKLEY T., VAN HUYN L., BRADSHAW P., 1989 - Using activated carbon to remove toxicity from drinking water containing cyanobacterial blooms. *J. AWWA* **81** (February): 102-105.
- FALCONER I.R., SMITH J.V., JACKSON A.R.B., JONES A., RUNNEGAR M.T.C., 1988 - Oral toxicity of a bloom of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* administered to mice over a period up to 1 year. *J. Toxicol. Environ. Health* **24**: 291-304.

- FALCONER I.R., YEUNG D.S.K., 1992 - Cytoskeletal changes in hepatocytes induced by *Microcystis* toxins and their relation to hyperphosphorylation of cell preteins. *Chem. Biol. Interactions* **81**: 181-196.
- FLETT D.J., NICHOLSON B.C., 1991 - Toxic Cyanobacteria in Water Supplies: Analytical Techniques. Res. Rep. N. 26. Urban Water research Association of Australia, Melbourne.
- FRANCIS G., 1978 - Poisonous Australian lake. *Nature* **18**: 11-12.
- FUJIKI H., IKEGAMI K., HAKII H., SUGANUMA M., YAMAIZAMI Z., YAMAZATO K., MOORE R., SUGIMURA T., 1985 - A blue-green alga from Okinawa contains aplysiatoxins, the third class of tumor promoters. *Jpn. J. Cancer Res. (Gann)* **76**: 257-259.
- FUJIKI H., MORI M., NAKAYASU M., TERADA M., SUGIMURA T., MORE R.E., 1981 - Tumor promoting properties. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**: 3872.
- FUJIKI H., SAGANUMA M., HAKII H., BARTOLINI G., MOORE R.E., TAKEGAMA S., SUGIMURA T., 1984 - A two-stage mouse skin carcinogenesis study of lyngbyatoxin A. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **108**: 174-176.
- FUJIKI H., SUGANUMA M., SUGURI H., YOSHIZAWA S., TAKAGI K., UDA N., WAKAMATSU K., YAMADA K., MURATA M., YASUMOTO T., SUGIMURA T., 1988 - Diarrhetic shellfish toxins, dinophysistoxin-1 is a potent promoter on mouse skin. *Jpn. J. Cancer Res. (Gann)* **79**: 1089-1093.
- GERBA C.P., GOYAL S.M., 1985 - Potential for groundwater contamination. In "The Water Environment. Algal Toxins and Health" W.W. Carmichael (ed.) Plenum Press, New York and London 303-314.
- GORHAM P.R., CARMICHAEL W.W., 1988 - Hazards of freshwater blue-green (cyanobacteria). In "Algae and Human Affairs" Lembi C.A., Waaland J.R. (Eds.) Cambridge Univ. Press, New York: 403-431.
- GUPTA S.L., 1989 - Interactive effects of nitrogen and copper on growth of cyanobacterium *Microcystis*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **42**: 270-275.
- GUPTA S.L., 1986 - Copper uptake and inhibition of growth, photosynthetic pigments and macromolecules in the cyanobacterium *Anacystis nidulans*. *Photosynthetica* **20**: 447-453.
- GUPTA S.L., 1989 - Interactive effects of nitrogen and copper on growth of cyanobacterium *Microcystis*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **42**: 270-275.
- GUPTA S.L., KASHYAP A.K., SINGH A.P., 1985 - Responses of blue-green algae to copper: a comparative study. *Ind. J. Environ. Hlth.* **27**: 224-229.
- GRAUER F.H., ARNOLD H.L., 1961 - Seaweed dermatitis. *Arch. Dermatol.* **84**: 720-730.
- GRAY N.F. 1996 - Drinking Water Quality: Problems and Solutions. Wiley, Chichester, London.
- GREGSON R.P., LOHR R.R., 1983 - Isolation of peptide hepatotoxins from the blue-green alga *Microcystis aeruginosa*. *Comp. Biochem. Physiol.* **74**: 413-417.
- HANSON, M.J., STEFAN, H.G., 1984 - Side effects of 58 years of copper sulphate treatment of the Fairmont Lake, Minnesota. "Water Resources Bull". *American Water Resources Association*, **20** (6): 889-900.
- HARADA K.I., SUZUKI M. OKA H., DAHLEM A.M., BEASLEY J.R., CARMICHAEL W.W., 1988 - Improved method for purification of toxic peptides produced by cyanobacteria. *Toxicon* **26**: 433-439.
- HAWKINS P.R., RUNNEGAR M.T.C., JACKSON A.R.B., FALCONER I.R., 1985 - Severe hepatotoxicity caused by the tropical cyanobacterium (blue-green alga) *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska) Seenaya and Subba Rafu isolated from a domestic water supply reservoir. *Appl. Environ. Microbiol.* **50**: 1292-1295.
- HAWSER S.P., CODD G.A., CAPONE D.G., CARPENTER E.J., 1991 - A neurotoxic factor associated with the bloom-forming cyanobacterium *Trichodesmium*. *Toxicon* **29**: 277-278.
- HEISE H.A., 1949 - Symptoms of hay fever caused by algae. *J. Allergy* **20**: 383-385.
- HEISE H.A., 1951 - Symptoms of hay fever caused by algae. II. *Microcystis*. Another form of algae producing allergenic reactions. *Ann. Allergy* **9**: 100-101.
- HENRY, G., MORSE, S., JASCHKE, D., 1992 - Bioassessment analysis of Steilacoom Lake sediment. University of Minnesota.
- HERMANSKY S.J., STOHS S.J., ELDEEN Z.M., ROCHE V.F., MEREISH K.A., 1991 - Evaluation of potential chemoprotectants against microcystin-LR hepatotoxicity in mice. *J. Appl. Toxicol.* **11**: 65-74.
- HIMBEERG K., KEIJOLA A.M., HIISSVIRTA L., PYYSALO H., SIVONEN K., 1989 - The effect of water treatment process on the removal of hepatotoxins from *Microcystis* and *Oscillatoria* cyanobacteria a laboratory study. *Water Res.* **23** (8): 979-984.
- HUNTER P.R., 1993 - An epidemiological critique of reports of human illness associated with cyanobacteria. 1st International Symposium on Detection Methods for Cyanobacterial (Blue-green Algal) Toxins. 27-29 September University of Bath, UK. L3.
- HUNTER J.M., REY L., ADEKOLU-JOHN E.O., MOTT K.E., 1994 - Parasitoses et mise en valeur des ressources hydriques. OMS, Geneve160.
- JACKSON A.R.B., MC INNES A., FALCONER I.R., RUNNEGAR M.T.C., 1984 - Clinical and pathological changes in sheep experimentally poisoned by the blue-green alga *Microcystis aeruginosa*. *Vat. Pathol.* **4**: 225-236.
- JAMES H.A., JAMES C.P., HART J., 1993 - The analysis of microcystin-LR in water: application in water treatment studies. 1st International Symposium on Detection Methods for Cyanobacterial (Blue-green Algal) Toxins. 27-29 September, University of Bath, UK. L10.
- JOHNSON G.L., 1982 - In: Molecular aspects of cell regulation, edited by P. Cohen and S. Van Heyningen. Elsevier, vol. 2, 33 p.
- KALBE L., 1986 - Hyginische Beurteilung hocheutropher Bade-

gewasser. *Z. gesamte Hyg.* **32**: 164-170.

KEIJOLA A.M., HIMBERG K., ESALA A.L., SIVONENE K., HIISSVIRTA L., 1988 - Removal of cyanobacterial toxins in water treatment processes: laboratory and pilot-scale experiments. *Toxicity Assessment: An International J.* **3**: 643-656.

KELETI G., SYKORA J.L., LIPPY E.C., SHAPIRO M.A., 1979 - Composition and biological properties of lipopolysaccharides isolated from *Schizothrix calcicola* (Ag.) Gomont (Cyanobacteria). *Appl. Environ. Microbiol.* **38**: 471-477.

KIRIVANTA J., ABDEL-HAMED A., SIVONEN K., NIEMELA S.I., CARLBERG G., 1993 - Toxicity of Cyanobacteria to mosquito larvae - screening of active compounds. *Environ. Toxicol. Water Qual.* **8**: 63-71.

KIRIVANTA J., SIVONEN K., LAHTI K., LUUKKAINEN R., NIEMELA S.I., 1991 - Production and biodegradation of cyanobacterial toxins - a laboratory study. *Arch. Hydrobiol.* **121**: 281-294.

KIRPENKO Y.A., STANKEVICH V.V., KIRPENKO N.I., 1982 - Combined effect of toxins released by Cyanophyceae and certain components of industrial wastes on water quality. *Hydrobiological J: (Hydrobiologischesku Zh.)* **18**: 34-36.

KONONEN K., HAINANEN A., KUOSA H., KUPARINEN J., LEPPANEN J.M., LIN S., MOISANDER P., MAKELA K., NOMMANN S., PAVELSON J., RANTAJARVI E., SELNER K., 1993 - Hydrodynamical control of the toxic cyanobacterial blooms. 6th Internatl. Conf. On Toxic Marine Phytoplankton, Nantes (France) 18-22 October 1993.

LAND H., PARADA L.F., WEINBERG R.A., 1983 - Cellular oncogenes and multistep carcinogenesis. *Science* **222**: 771-778.

ERIKSSON J., MERILUOTO J., LINDHOLM T., 1986 - Can cyanobacterial peptide toxins accumulate in aquatic food chains? Proc. IV ISMF 655-658.

DEEM A.W., THORP F., 1939 - Toxic algae in Colorado. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **95**: 542.

LESHCHENKO P.D., KHOROSHILOVA N.V., SLIPCHENKO L.M., KAZNACHEI-RLA., 1965 - Observation of Haff-Uchs disease cases. *Vopr. Pitan* **24** (6): 73-76.

LIPPY E.C., ERB J., 1976 - Gastrointestinal illness at Sewickley, PA. *J. Am. Water Works Assoc.* **68**: 606-610.

LOIZZO A., SECHI N., VOLTERRA L., CONTU A., 1988 - Some features of a bloom of *Oscillatoria rubescens* D.C. registered in two Italian reservoirs. *Water Air and Soil Pollut.* **38**: 263-271.

MACKINTOSH C., BEATTIE K.A., KLUMPP S., COHEN P., CODD G.A., 1990 - Cyanobacterial microcystin-LR is a potent and specific inhibitor of protein phosphatases 1 and 2A from both mammal and higher plants. *FEBS Letters* **264**: 189-192.

MACKINTOSCH C., MACKINTOSCH R.W., COHEN P., 1993 - Inhibition of protein phosphatases by toxins: implications for health and an extremely sensitive and rapid method for toxin detection. 1st International Symposium on Detection Methods for Cyanobacterial (Blue-green Algal) Toxins. 27-29 September University of Bath, UK. L18.

MAHMOOD N.A., CARMICHAEL W.W., 1986 - The pharmacology of

anatoxin-a(s), a neurotoxin produced by the freshwater cyanobacteria *Anabaena flos-aquae* NRC-525-17. *Toxicon* **24**: 425-434.

MAHMOOD N.A., CARMICHAEL W.W., 1987 - Anatoxin-a(s), an anticholinesterase from the cyanobacterium *Anabaena flos-aquae* NRC-525-17. *Toxicon* **25**: 1221-1227.

MC ELHENNY T.R., BOLD H.C., BROWN R.M., MCGOVERN J.P., 1962 - Algae: a cause of inhalant allergy in children. *Ann. Allergy* **20**: 739-743.

MEREISH K.A., BUNNER D.L., RAGLAND D.R., CREASIA D.A., 1991 - Protection against microcystin-LR induced hepatotoxicity by silmarin-biochemistry, histopathology and lethality. *Pharmacol. Res.* **8**: 273-277.

MEZ K., WINKENBACH B., PREISIG H.R., HANSELMANN K., 1993 - Cyanobacterial toxicoses in the Swiss Alps - biological indication for environmental and climatological changes? 1st International Symposium on Detection Methods for Cyanobacterial (Blue-green Algal) Toxins. 27-29 September University of Bath, UK. P8

MITTAL A., ARGARWAL M.K., SCHIVPURI D.N., 1979 - Respiratory allergy to algae: clinical aspects. *Ann. Allergy* **42**: 253-256.

MOORE R.E., 1984 - Public health and toxins from marine blue-green algae. In: Seafood toxins, edited by E.P. Ragelis. AVS Symposium Series 262. Washington D.C. American Chemical Society, pp. 369-376.

MUTTARI I.A., VIRTANEN P., SALKNOJA A., SALONEN M., 1980a - Endotoxin and bathwater fever. *Lancet* **2**: C89.

MUTTARI I.A., KUUSISTO P., VIRTANEN P., SOVIJARVI A., GRONROOS P., HARMONINEN A., ANTILA P., KELLONAKI L., 1980b - An epidemic of extrinsic allergic alveolitis caused by tap water. *Clin. Allergy* **10**: 77-90.

MYNDERSE J.S., MOORE R.E., KASHIWAGI M., MORTON T.R., 1977 - Antileukemic activity in the Oscillatoriaceae: isolation of debromoaplastoxin from *Lyngbya*. *Science* **196**: 538-540.

NISHIWAKI-MATSUSHIMA R., OHTA T., NISHIWAKI S., SUGANUMA M., KOHYAMA K., ISHIKAWA T., CARMICHAEL W.W., FUJIKI H., 1992 - Liver cancer promoted by the cyanobacterial peptide toxin microcystin-LR. *J. Cancer Res. And Clin. Oncol.* **118**: 420-424.

NIZAN S.C., DIMENTMAN C., SHILO M., 1986 - Acute toxic effects of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* on *Daphnia magna*. *Limnol. Oceanogr.* **31**: 497-502.

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**: 7942-7944.

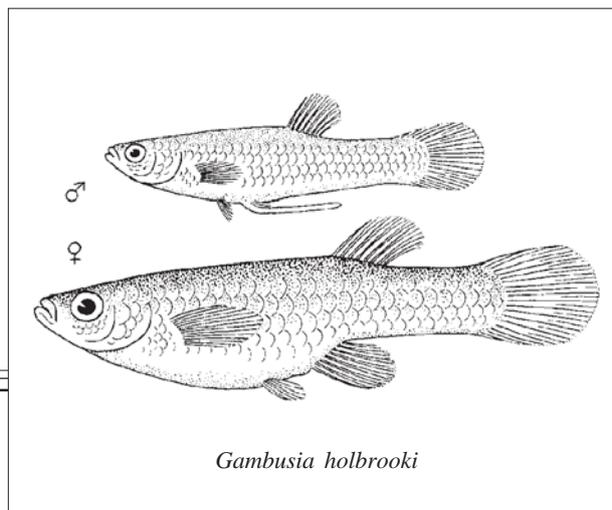
OLIVEIRA M.R., 1983 - Estrutura da comunidade fitoplanctonica e dinamica dos blooms na Albufeira do Maranhao. Bol. Inst. Nac. Inv. Pescas, 26p.

OLIVEIRA M.P., 1985 - Estudos biológicos realizados no Rio Guadiana e na estacao de tratamento de agua da vila de Mertola. *Inst. Nac. Inv. Pescas Rel. Int.* **103**: 1-12.

OWEN R., 1993 - Biological and economic significance of ben-

- thic cyanobacteria in two Scottish highland lochs. 1st International Symposium on Detection Methods for Cyanobacterial (Blue-green Algal) Toxins. 27-29 September University of Bath, UK. P12.
- PALMER C.M., 1962 - Algae in Water Supply. Publ. N. 657. US Public Health Service, Washington DC.
- PARKER D.L., KUMAR H.D., RAI L.C., SINGH J.B., 1997 - Potassium salts inhibit growth of the Cyanobacteria *Microcystis* spp. in pond water and defined media: implications for control of microcystin-producing aquatic blooms. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 2324-2329.
- PEARSON M.J., 1990 - Toxic Blue-green Algae. Report of the National River Authority Water Quality Series N.2 UK, Rushden, Northants, Stanley L. Hunt. 125 pp.
- PERSSON P.E., SIVONEN K., KETO J., KONONEN K., NIEMI M., VILJAMMAA H., 1984 - Potentially toxic blue-green algae (cyanobacteria) in Finnish natural waters. *Aqua fennica* **14**: 147-154.
- PREMAZZI G., VOLTERRA L., 1993 - Algal Toxins. A Manual for Toxin Detection, Environmental Monitoring and Therapies to counteract Intoxications. Joint Research Centre, Commission of the European Communities. EUR 14854 EN, pp 336.
- RAPALA J., SIVONEN K., LYRA C., NIEMELA S.I., 1997 - Variation of microcystins, cyanobacterial hepatotoxins in *Anabaena* spp. as a function of growth stimuli. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 2206-2212.
- REPAVICH W.M., SONZOGNI W.C., STANDRIDGE J.H., WEDEPOHL R.E., MEISNER L.F., 1990 - Cyanobacteria (blue-green algae) in Wisconsin waters: acute and chronic toxicity. *Wat. Res.* **24**: 225-231.
- RICHARD D.S., BEATTLE K.A., CODD G.A., 1983 - Toxicity of cyanobacterial blooms from Scottish freshwaters. *Environm. Technol. Letters* **4**: 377-382.
- RUF M., REITTER F.K., 1990 - Überprüfung der Inaktivierung von Algentoxinen durch Wasseraufbereitungsverfahren. Forschungsbericht aus der Wehrmedizin. BMVgFBWM 90-92.
- RUNNEGAR M.T.C., FALCONER I.R., SILVER J., 1981 - Deformation of isolated rat hepatocytes by a peptide hepatotoxin from a blue-green alga *Microcystis aeruginosa*. *Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* **317**: 268-272.
- RUNNEGAR M.T.C., FALCONER I.R., BUCKLEY T., JACKSON A.R.B., 1986 - Lethal potency and tissue distribution of ¹²⁵I-labelled toxic peptides from the blue-green alga *Microcystis aeruginosa*. *Toxicon* **24**: 506-509.
- RUNNEGAR M.T.C., ANDREWS J., GERDES R.G., FALCONER I.R., 1987 - Injury to hepatocytes induced by a peptide toxin from the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. *Toxicon* **25**: 1235-1239.
- SCHWINNER D., SCHWIMMER M., 1968 - Medical aspects of phyco-logy. In "Algae and Man" D.F. Jackson (Ed.) Plenum Publishing Corp. New York 1968: 368-412.
- SCOTT W.E., 1991 - Occurrence and significance of toxic cyanobacteria in southern Africa. *Wat. Sc. Technol.* **23**: 175-180.
- SCRIMSHAW N.S., 1975 - Single-cell protein for human consumption: an overview. In "Single Cell Protein II" Tannenbaum S.R., Wang D.I.C. (Eds.) MIT Press, Cambridge, MA: 24-45.
- SHIRAI M., TAKAMURA Y., SAKUMA H., KOJIMA M., NAKANO M., 1986 - Toxicity and delayed type of hypersensitivity caused by *Microcystis* blooms from Lake Kasumigaura. *Microbiol. Immunol.* **30**: 731-735.
- SIEGL G., MACKINTOSH C., STITT M., 1990 - Sucrose-phosphate synthase is dephosphorylated by protein phosphatase 2A in spinach leaves. *FEBS Letters* **270**: 198-202.
- SIKORA J.L., KELETI G., 1985 - Cyanobacteria and endotoxins in drinking water supplies. In: "The Water Environment - Algal Toxins and Health" Carmichael W.W. (Ed.) New York, Plenum Press: 285-301.
- SIVONEN K., HIMBERG K., LUUKKAINEN R., NIEMELA S., POON G.K., CODD G.A., 1989 - Preliminary characterization of neurotoxic cyanobacteria blooms and strains from Finland. *Toxicity Assessment* **4**: 339-352.
- SIVONEN K., NIEMELA S.I., NIEMI R.M., LEPISTO L., LUOMI T.H., RASANEN L.A., 1990 - Toxic cyanobacteria (blue-green algae) in Finnish fresh and coastal waters. *Hydrobiologia* **190**: 267-275.
- SKULBERG O.M., CODD G.A., CARMICHAEL W.W., 1984 - Toxic blue-green algal blooms in Europe: a growing problem. *Ambio* **13**: 244-247.
- SKULBERG O.M., CARMICHAEL W.W., ANDERSEN R.A., MATSUNAGA S., MOORE R.E., SKULBERG R., 1992 - Investigations of a neurotoxic oscillatorial strain (Cyanophyceae) and its toxin. Isolation and characterization of homoanatoxin-a. *Environ. Toxicol. Chem.* **11**: 321-329.
- SOLOMON M., 1990 - Haff disease. *Arch Intern. Med.* **150**: 683.
- SOONG F.S., MAYNARD E., KIRKE K., LUKE C., 1992 - Illness associated with blue-green algae. *Med. J. Aust.* **156**: 67.
- STOWE C.W., MONSON E., ABDULLAH A.S., BARNES D.S., 1981 - Blue-green algal poisoning (*Microcystis aeruginosa*) in a dairy herd. *Bovine Clin.* **1**: 6-8.
- SWODOBA U.K., DOW C.S., 1993 - Toxin expression by freshwater and marine freshwater *Oscillatoria* spp. 1st International Symposium on Detection Methods for Cyanobacterial (Blue-green Algal) Toxins. 27-29 September University of Bath, UK. P16.
- SWITZER L., 1982 - *Spirulina*: The Whole Food Revolution. Bantam Books, Toronto.
- TISDALE E.S., 1931 - Epidemic of intestinal disorders in Charleston, WV, occurring simultaneously with unprecedented water supply conditions. *Am.J. Public Health* **21**: 198-200.
- TOIVOLA D., REINIKAINEN M., MERILUOTO J.A.O., ERIKSSON J.E., 1993 - Application of hepatocyte and cell-line assays to test for toxins in cyanobacterial extracts. 1st International Symposium on Detection Methods for Cyanobacterial (Blue-green Algal) Toxins. 27-29 September University of Bath, UK. L16.
- TURNER P.C., GAMMIE A.J., HOLLINRAKE K., CODD G.A., 1990 -

- Pneumonia associated with contact with cyanobacteria. *Br. Med. J.* **300**: 1440-1441.
- VASCONCELOS V.M., 1990 - Preliminary results of a study on the impact of toxic and nontoxic cyanobacteria on some crustacean species. *Crustaceana* **59**: 316-318.
- VASCONCELOS V.M., 1992 - Toxicidade de "blooms" de cianobacterios em aguas portuguesas: impacte na soude publica e medidas de prevencao. Actos da III Conferencia Nacional sobre a Qualidade do Ambiente: 338-345.
- VASCONCELOS V.M., 1993 - Toxic cyanobacteria (blue-green alga) in Portuguese freshwaters. 1st International Symposium on Detection Methods for Cyanobacterial (Blue-green Algal) Toxins. 27-29 September University of Bath, UK. P3.
- VELDEE M.V., 1931 - Epidemiological study of suspected water-borne gastroenteritis. *Am. J. Public Health* **21**: 1227-1235.
- VOGLER G., 1967 - Intoxikationen von Mensch und Tier durch Phytoplanktoxine aus Oberflächengewässern. *Arch. Hyg.* **151**: 1-22.
- VOLTERRA L., 1992 - La potabilizzazione delle acque eutrofiche. *Biologia Ambientale. Boll. CISBA* **1**, 6(24): 5-27.
- VOLTERRA L., 1993a - Sanitary implications associated with the use of eutrophic freshwater. *Ann. Ist. Super. Sanità* **29**: 327-333.
- VOLTERRA L., 1993b - Algal toxicity in freshwater environments. *Mem. Ist. Ital. Idrobiol.* **52**: 281-299.
- VOLTERRA L., 1993c - Effetti dell'eutrofizzazione sugli usi delle acque. In "Analisi sulle Cause dell'Eutrofizzazione delle Acque del Sistema Idraulico Flumendosa-Campidano in Relazione all'Applicazione della Direttiva CEE sulle Acque Potabili". CCE Regione Autonoma della Sardegna, EAF (Eds.) Volume E2 Cagliari 1993.
- VOLTERRA L., 1994 - Interferenze tra alghe e vita acquatica. *Noi & l'Ambiente* **40**: 14-18.
- VOLTERRA L., 1995a - I problemi connessi con le alghe rilevabili nelle acque potabili. Quaderni di tecniche di protezione ambientale. Pitagora Editrice, Bologna: 127-132.
- VOLTERRA L., 1995b - Fioriture algali nella storia e nella tradizione. *Ambiente Risorse Salute* **9** (41): 14-17.
- VOLTERRA L., BRUNO M., GUCCI P.M.B., PIERDOMINICI E., 1992 - Fast method for detecting toxic cyanophytes blooms. *Sci. Total Environ. Suppl.*: 551-556.
- VOLTERRA L., MANCINI L., 1992 - Laghi ed invasi italiani adibiti ad uso potabile. *Biologia Ambientale, Boll. CISBA* **6** (24): 36-43.
- YOSHIZAWA S. MATSUSHI 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.* **116**: 609-614.
- ZHANG QUIN-XUE, CARMICHAEL W.W., YU M.-J., LI S.-H., 1991 - Cyclic peptide hepatotoxins from freshwater cyanobacterial (blue-green algae) waterblooms collected in central China. *Environ. Toxicol. Chem.* **10**: 313-321.
- WHO 1994 - Guidelines for Drinking Water Quality. Vol. 1 - Recommendations, WHO, Geneva.
- WILLIAMS, R., 1993 - Satellite communications for dissemination of taxonomic training material and information within the European Community. 6th International Conference on Toxic Marine Phytoplankton. Nantes (France) 18-22 October.
- ZIEGLER K., FRIMMER M., 1986 - Cyclosporine A and a diaziridine derivative inhibit hepatocellular uptake of cholate, phalloidin and rifampicin. *Biochem. Biophys. Acta* **855**: 136-142.
- Zilber B., 1966 - Gastroenteritis in Salisbury European children - a five year study. *Centr. Afr. J. Med.* **12**: 164-168.



RUOLO DI *Gambusia holbrooki* NEL CONTENIMENTO DEI CULICIDI E SUO IMPATTO SULLE BIOCENOSI ACQUATICHE

Veronesi Rodolfo¹, Bellini Romeo¹, Celli Giorgio²

RIASSUNTO

Gambusia holbrooki Baird è un pesce di piccole dimensioni originario dell'area Sud Orientale degli Stati Uniti, introdotto in Europa a partire dagli anni '20, come agente biologico in grado di contribuire alla lotta contro i vettori di malaria.

Alla luce delle esperienze accumulate in tutto il mondo, il suo ruolo nel contenimento delle popolazioni larvali di Culicidi molesti in particolari ambienti può essere riconsiderato nell'ambito di progetti territoriali di lotta.

Cenno storico

L'utilizzo di pesci larvivori per il contenimento dei vettori della malaria risale a quasi un secolo fa (MEISCH, 1985). Un'indagine condotta, tra gli Stati membri, dall'Organizzazione Mondiale della Sanità nel 1974, mise in evidenza che *G. affinis* (BAIRD & GIRARD) è stata la specie più utilizzata e tutt'oggi è largamente impiegata nella lotta biologica alle zanzare (HAAS e PAL, 1984).

I primi tentativi di sfruttamento delle sue doti predatorie risalgono al 1901 nell'areale originario (HAWARD, 1901 - cit. in RONCHETTI, 1968); al 1905 nelle Hawaii e nelle Filippine; al 1913 a Formosa; di nuovo negli Stati Uniti nel 1918, nella zona del Mississippi; e tra 1921 e 1924, in Georgia. A partire dal 1920 venne introdotta in Spagna. Grassi nel 1922 la introdusse in Italia in alcune zone del Lazio (RONCHETTI, 1968).

Nel 1924 dall'Italia venne importata nella regione transcaucasica da dove fu progressivamente diffusa in

¹ Centro Agricoltura e Ambiente - Crevalcore, Bologna

² Istituto di Entomologia "Guido Grandi", Università di Bologna

altre zone meridionali e centrali dell'ex URSS. Sempre nel 1924, venne introdotta in Corsica e da qui nella Francia meridionale; in Algeria nel 1926, in Marocco nel '28, in Libia nel '31 e successivamente in molte altre zone malariche del mondo come Germania, Dalmazia, Albania, Grecia, Cipro, Siria, Egitto, Tunisia, Sudan, Africa orientale, Madagascar, Iran, India, Indocina, Cina, Giappone, Australia, Nuova Zelanda, Canada, Messico, Argentina. Grazie alla sua plasticità biologica e rusticità *Gambusia* si è così ambientata in un gran numero di Paesi delle zone temperate, subtropicali e tropicali (RONCHETTI, 1968).

Nel nostro Paese il "pesce antimalarico" conquistò rapidamente larga fama e sollevò entusiasmi sul fronte della lotta alla malaria. Così, a partire dal 1922, l'Istituto Nazionale per il Risanamento Pontino, la Direzione di Sanità, il Governatorato e la Direzione della Pesca si prestarono attivamente alla diffusione del pesce a partire dall'Agro Romano e Pontino interessando tutta la Penisola, oltre a Sardegna, Sicilia ed Istria. In molte zone, l'azione antianofelica risultò efficace durante l'intera stagione; in altre, dove le basse temperature primaverili ne ritardavano la ripresa dell'attività di predazione e della riproduzione, efficace soltanto in piena estate (SELLA, 1928). L'ambientazione fu, ad esempio, difficile nel Veneto dove l'inverno lungo e rigido decimava le popolazioni rallentandone l'azione alla ripresa primaverile (RONCHETTI, 1968).

Nel decennio 1930-1940 si continuò con l'utilizzo del pesce, sia col rafforzamento delle popolazioni ormai acclimatate, sia con nuove introduzioni.

L'azione del pesce nel controllo delle popolazioni anofeliche era legata alle condizioni degli habitats che, quando favorevoli, ne consentivano la piena espressione con risultati durevoli e a bassissimi costi. In Italia complessivamente, il giudizio relativo alla sua efficacia risultò assai positivo (GRASSI, 1923; ZAVATTARI, 1934; PALADINO-BALDINI, 1933 - cit. in RONCHETTI, 1968).

Dagli anni '40 il grande interesse sollevato dalla chimica di sintesi nella lotta agli insetti ha fatto sì che diminuisse in quasi tutto il mondo l'utilizzo di questo metodo biologico di lotta. Nuova attenzione si è registrata a partire dagli anni '70 nell'ambito dell'accresciuto interesse per la lotta biologica.

Inquadramento tassonomico e distribuzione in Italia

Appartenente all'ordine *Ciprinodontiformes* e alla famiglia *Poeciliidae*, *Gambusia affinis* (BAIRD & GIRARD) veniva suddivisa in due sottospecie, *G. a. affinis* e *G. a. holbrooki*. Nella gran parte dei casi, fino a qualche tempo fa, la letteratura prendeva in considerazione in modo generico *G. affinis*. Solo recentemente *G. holbrooki* Baird è stata riconosciuta come specie separata da *G. affinis* (BLACK e HOWELL 1979; WOOTEN *et al.*, 1988). Le due specie sono molto simili, distinguibili solo dal numero di raggi della pinna dorsale, in numero di 8 nella prima e di 7 nella seconda. *G. affinis* ha come areale originario di distribuzione la zona meridionale degli Stati Uniti compresa dal Texas all'Alabama, mentre *G. holbrooki* occupa la regione compresa tra l'Alabama e il Delaware (WOOTEN *et al.*, 1988).

In Italia a oltre 70 anni dalla sua introduzione è considerata specie acclimatata, stabilmente insediata nelle acque ferme o a scorrimento lento e inserita nella checklist delle specie della fauna italiana presente su tutto il territorio nazionale incluse le piccole isole (AMORI *et al.*, 1993).

NATALI (1989) l'annovera tra la fauna ittica del lago Trasimeno e ne osserva una forte diminuzione, fin quasi alla scomparsa negli anni 1987 e 1988, probabilmente da imputare alla predazione esercitata dal persico reale (*Perca fluviatilis* L.) considerato da GANDOLFI e ZERUNIAN (1987) l'unico percide autoctono delle acque interne italiane.

MALESANI la segnala nel Lago di Garda per la prima volta nel 1973.

Nel Delta padano è indicata come presenza costante in ambienti laterali del fiume Po (lanche ed acque golenali), nei canali e nelle pozze di barena caratterizzati da forti variazioni di salinità, lungo le sponde delle sacche dove l'ambiente salmastro è influenzato da apporti di acqua dolce, e nelle valli di pesca in diretto contatto con i canali di acqua dolce che alimentano le valli stesse (GANDOLFI, 1973).

In Emilia-Romagna è segnalata in diverse provincie: in canali e in alcuni fiumi del ravennate; in provincia di Bologna nel basso corso del Reno, negli stagni e negli allevamenti ittici di pianura; nella provincia di Ferrara è diffusa nei canali irrigui, negli

stagni e negli allevamenti ittici ed infine nei canali di bonifica delle provincie di Modena e Reggio Emilia (REGIONE EMILIA-ROMAGNA, 1988).

Biologia

Gambusia è caratterizzata da un evidente dimorfismo sessuale. La femmina raggiunge una dimensione di 5-6 cm, circa doppia quella del maschio. Il colore in entrambi i sessi è grigio-olivastro con la regione ventrale bianca. Nella femmina, in vicinanza della pinna anale, è caratteristica una macchia nera, più evidente durante la gravidanza. Nel maschio è tipico il gonopodio, una modificazione stiliforme della pinna anale utilizzata durante l'accoppiamento.

Specie ovovivipara, può partorire fino a 100 avannotti per parto in rapporto di 1:1 tra i sessi (GEISER, 1924; DULZETTO, 1934 - cit. in BISAZZA *et al.*, 1990) portando a termine negli ambienti temperati 4-5 gravidanze per stagione. Esiste una correlazione tra peso, lunghezza, luogo di origine delle femmine e il numero di embrioni prodotti (NAAMA e AL-HASSAN, 1989). La temperatura ottimale per la crescita degli avannotti, nel caso di buona disponibilità di cibo, è compresa tra 25 e 35°C; ma in condizioni alimentari limitate, scende a 25°C (WURTSBAUGH e CECH Jr., 1983). Nell'Italia Nord-orientale BISAZZA *et al.* (1990) hanno studiato la biologia riproduttiva di *G. holbrooki* confrontando popolazioni presenti in biotopi con diverse caratteristiche. Nelle stazioni alimentate con acqua termale, dove in inverno la temperatura dell'acqua non scende al di sotto dei 15°C, le gambusie restano in attività tutto l'anno ed entrano in riproduzione tra i mesi di febbraio e marzo. Negli ambienti dove la temperatura dell'acqua si abbassa fino al congelamento, trascorrono un periodo di quiescenza invernale e la riproduzione inizia nel mese di maggio. In tutti gli ambienti considerati, l'attività riproduttiva termina in ottobre. Il fotoperiodo e la temperatura sono fattori che influenzano lo sviluppo delle gonadi e l'inizio del periodo riproduttivo anche se il fotoperiodo, da solo, sembra avere un peso maggiore. Un altro fattore che influenza la fertilità è la disponibilità alimentare (VONDRACECK *et al.*, 1988 - cit. in BISAZZA, 1990). In prove di laboratorio, alla temperatura costante di 25°C e in condizioni di elevata disponibilità di cibo, il fotoperiodo che consente la minore mortalità di femmine mature e la maggiore prolificità è di 13

ore di luce e 11 di buio oppure, 15 ore di luce e 9 di buio (CECH *et al.*, 1989).

Degna di nota è la naturale adattabilità di *Gambusia* alle varie condizioni ambientali quali la temperatura dell'acqua, il tenore di ossigeno disciolto, la salinità e i possibili inquinanti chimici, verso i quali dimostra sopportare valori elevati.

Nei confronti della temperatura dell'acqua *Gambusia* tollera temperature anche superiori a 35°C (ma entro i 40°C) mentre, come limite inferiore non tollera valori al di sotto dei 6-7°C (CASTLEBERRY e CECH, 1987). Nei climi temperati può sopportare temperature invernali anche di diversi gradi sotto zero purchè il fondo sia melmoso da consentire l'affondamento nel fango (RONCHETTI, 1968; SELLA, 1928).

Sorprendente è la capacità di resistenza a bassi livelli di ossigeno disciolto fino a tensioni di circa 7 mmHg (CASTLEBERRY e CECH, 1987) e per aumentare gli scambi gassosi con l'aria, quando il livello è molto basso, è in grado di "schiumare" il pelo dell'acqua.

Risulta essere in grado di tollerare bene variazioni di salinità dell'acqua, specie se gradualmente. Sperimentazioni di laboratorio hanno dimostrato che una mortalità del 10% si verifica quando la salinità varia in modo brusco da 0,05% a 1,95%; mentre elevata sopravvivenza si riscontra anche a valori di salinità del 3,9% (acqua di mare) nel caso di un aumento progressivo (CHERVINSKI, 1983).

Nei confronti di ammoniaca e nitrati dimostra resistenza a livelli che risultano essere tossici per altre specie (BEESLEY *et al.*, 1986).

Dieta

G. holbrooki non può essere considerato un predatore specifico di larve di zanzare. L'azione predatoria nei confronti di molte specie di organismi acquatici è alla base delle preoccupazioni espresse da diversi autori circa l'impatto negativo del pesce sulle biocenosi. La dieta è infatti costituita per lo più da crostacei e insetti, predati in proporzione variabile a seconda degli ambienti e della densità relativa di ogni gruppo tassonomico (BENCE e MURDOCH, 1986; LINDEN e CECH Jr., 1990). Tra i Crostacei, frequente è la predazione a carico di Cladoceri, (BLAUSTEIN e KARBAN, 1990), Ostracodi e Copepodi (KRAMER *et al.*, 1987). Tra gli insetti, oltre a larve di Culicidi e Chironomidi, preda stadi preimmaginali di Notonecti-

di, Corixidi, Omotteri, Odonati, Coleotteri Idrofilidi, Ditisididi, ed Efemerotteri (FARLEY e YOUNCE, 1977b; KRAMER *et al.*, 1987; WALTERS e LEGNER, 1980).

SATO (1989), analizzando il contenuto stomacale di *G. affinis* raccolte in una palude ed in una risaia incolta, riscontrò la presenza di Cianoficee, Diatomee, Cloroficee, Protozoi, Trochelminti, Asplanchnidi, Dafnidi, Centropagidi, Euplotidi, Culicidi (larve e adulti), Chironomidi (larve e adulti), Formicidi, Odonati, Coleotteri, Lepidotteri, scaglie di pesci, crostacei, antere con polline, fibre vegetali.

In risaia non mostra preferenze verso le larve di zanzara rispetto ad altre prede (BENCE, 1985; KRAMER *et al.*, 1987).

In un esperimento svolto da CECH *et al.* (1982) in condizioni di semi-campo e di laboratorio le gambusie hanno predato tutte le specie di invertebrati messe a disposizione preferendo *Culex* e *Daphnia* a Corixidi ed Anfipodi. La preferenza è sembrata essere individuale con un comportamento di scelta verso una certa preda per un determinato periodo di tempo. Tra larve di *Culex* e *Anopheles* non sono emerse preferenze.

Il fenomeno del cannibalismo è rilevante in condizione di digiuno prolungato quando si può verificare la predazione degli adulti verso gli avannotti e, in un secondo tempo, delle femmine verso i maschi (RONCHETTI, 1968).

La dieta di *G. affinis* è stata considerata in ambienti naturali nel Sud della Francia (CRIVELLI e BOY, 1987). Nel periodo non riproduttivo (ottobre-maggio) sono risultati preferiti Copepodi e Cladoceri (*Chyrodidae* e *Daphnidae*), mentre nella stagione riproduttiva gli insetti terrestri e acquatici hanno rappresentato circa l'80% del cibo assunto. Le larve di zanzara sono risultate praticamente assenti dai contenuti stomacali ma non è chiaro quale fosse la loro distribuzione e la densità nell'ambiente studiato.

Altre osservazioni, condotte su una popolazione di gambusie presente stabilmente da 20 anni in piccoli stagni nella Riserva di Castel Porziano nel Lazio, confermano l'elevata polifagia verso organismi acquatici e terrestri. Quest'ultimi, evidentemente caduti in modo accidentale in acqua, rappresentavano una quota dal 10 al 50% dell'intero contenuto stomacale (STELLA *et al.*, 1984). Tra gli organismi acquatici prevalevano le larve di Chironomidi, tra i terrestri

Aracnidi, Coleotteri, Afidi e Neurotteri). Dalle osservazioni risulta l'assenza completa di larve di Culicidi nei bacini in cui era presente *Gambusia*.

La tabella 1 (A e B) riporta alcuni lavori inerenti l'analisi del contenuto stomacale di gambusie provenienti da diversi ambienti, confermando l'ampio spettro alimentare di *Gambusia* spp..

Impatto sulle biocenosi acquatiche

La polifagia, l'intensa attività predatoria e in particolari casi, il contributo a fenomeni di eutrofia sono alla base dei problemi evidenziati in biocenosi in cui *Gambusia* era stata introdotta. In questo senso, sono diversi gli studi volti alla verifica degli effetti sugli equilibri biologici.

In un famoso esperimento realizzato da HURLBERT *et al.* (1972), in vasche di plastica, vennero ridotte le popolazioni di *Daphnia pulex* Leydig, Culicidi e Chironomidi fino a completa scomparsa, permettendo il temporaneo incremento numerico e varietale dei Rotiferi. In seguito alla mancanza delle prede preferite, *Gambusia* si adattò a cibarsi di Rotiferi provocando anche un loro crollo. La pressione sullo zooplancton determinò un elevato sviluppo di alghe unicellulari verdi e azzurre che, intorbidando l'acqua, ridussero la penetrazione della luce e provocarono l'innalzamento della temperatura. Il ciclo del fosforo e probabilmente di altri nutrienti venne, inoltre, alterato.

In un esperimento successivo (HURLBERT e MULLA, 1981), effettuato in pozze artificiali (4 x 6 m), *Gambusia* eliminò le popolazioni zooplanctoniche di *D. pulex* e *Ceriodaphnia* sp., ridusse fortemente *Diatomus pallidus* Herrick e *Keratella quadrata* (O.F. Müller), mentre ebbe un impatto ridotto su *Cyclops vernalis* Fischer. All'opposto causò un forte incremento dei Rotiferi (*K. colearis* [Ehrb.], *Polyarthra* sp., *Synchaeta* sp., e *Trichocerca* spp.) e di tutto il fitoplancton (alghe verdi, blu, e flagellate). Da ispezioni visive, Emitteri –quali *Microvelia* sp., *Buenoa* sp., *Notonecta* sp.– e girini dell'anuro *Hyla regilla* non si riscontrarono nelle vasche in cui era presente il pesce. Inoltre rispetto alle pozze di controllo si osservò un aumento del pH e del livello di ossigeno da mettere in correlazione con l'abbondanza del fitoplancton.

Non mancano recenti osservazioni sull'argomento. In piccoli bacini sperimentali in terra (36 m²),

Tabella 1. Dieta di *Gambusia* dall'analisi del contenuto stomacale

A. Frequenza delle prede nel campione di pesci esaminati

| N. individui esaminati | Organismi rinvenuti / % sui pesci esaminati | Ambiente | Autori |
|------------------------|---|---|-----------------------------|
| 120 | stomaco vuoto / 39% zooplankton / 42% zooplankton + insetti o molluschi / 28% Alghe / ? Insetti / 11% Culicidi [larve] / 7,5% Chironomidi [larve] / 16,7% Coleotteri Idrofilidi [larve] / 6,7% molluschi (<i>Physa</i>) / 7,5% Cestodi / 4,2% <i>G. affinis</i> / 0,8% Anisotteri, Zigotteri, Cercopidi, Corixidi, Omotteri, Tisanotteri, Cecidomidi, Stratiomidi, / < 1% | California, risaia | KRAMER <i>et al.</i> , 1988 |
| 1.343 | <u>periodo non riproduttivo (ottobre-maggio)</u> Copepodi Ciclopoidi, Cladoceri Chirodidi e Dafnidi / 85% Ditteri (Chironomidi ed Empididi) [larve] / ? <u>periodo riproduttivo (giugno-settembre)</u> Crostacei, Insetti (Ditteri [larve], Coleotteri [adulti e larve], Emittenti, Odonati, Efemerotteri) / 80% Hydracarina, Rotiferi / 11% Molluschi / 11,5% Alghe, frammenti di macrofite, detriti solidi / 25% | Francia meridionale, canali di drenaggio | CRIVELLI & BOY, 1987 |
| 110 | stomaco vuoto / 17% zooplankton / 55% zooplankton + insetti o molluschi / 27% insetti / 1% | California, risaia (zizania acquatica, <i>Zizania palustris</i> L.) | KRAMER <i>et al.</i> , 1987 |

| | | | |
|--|--|---|--|
| <p>54 (immaturi) <i>G. patruelis</i> Baird e Girard</p> <p>219 (adulti) <i>G. patruelis</i> Baird e Girard</p> | <p>Cladoceri / 40,6% Acari / 22,2% Coleotteri [adulti e larve] / 42,6% Efemerotteri [larve] / 16,6% Tricotteri [larve] / 1,8% Chironomidi / 18,5% Rotiferi / 40,7% Culicidi: <i>Anopheles</i> / 64,8% Alghe / 12,9%</p> <p>Copepodi / 4,1% Cladoceri / 10% Molluschi / 2,3% Acari / 8,7% Rincoti [adulti] / 21,5% Coleotteri [adulti e larve] / 16,9% Efemerotteri [larve] / 21,9% Tricotteri [larve] / 3,6% Chironomidi / 16,9% Rotiferi / 8,7% Culicidi: <i>Culex</i> / 20% <i>Anopheles</i> / 32,8%</p> | <p>Turkestan, risaia</p> | <p>SOKOLOV, 1936</p> |
| <p>400</p> | <p>fibre vegetali / 13% Alghe / 2% Copepodi / 60% Decapodi / 12% Emitteri / 16% Culicidi / 54% Coleotteri / 12% Imenotteri / 12% Acarina / 11% Pesci / 3%</p> | <p>Florida, palude salmastra subtropicale</p> | <p>HARRINGTON & HARRINGTON, 1961</p> |
| <p>80</p> | <p>Cladoceri / 14,3% Copepodi / 7% Ostracodi / 12,7% Coleotteri [larve] / 2,9% Odonati [ninfe] / 1,7% Emitteri Corixidi / 3,7% Efemerotteri [ninfe] / 2,3% Chironomidi [larve] / 35% Culicidi [larve] / 1,6% Molluschi / 28% fibre vegetali / 14%</p> | <p>California, stagni artificiali</p> | <p>WALTERS & LEGNER, 1980</p> |

B. Composizione volumetrica del contenuto stomacale

| N. individui esaminati | Organismi rinvenuti/volume % del contenuto stomacale | Ambiente | Autori |
|-------------------------------|--|--|----------------------------------|
| ? | Cladoceri / 82% | California, stagni | MIURA et al, 1979 |
| ? | Culicidi [larve] / 5,08% Chirononidi [larve] / 13,31 % Altro / 81,61% | California, zona paludosa | FLEMING <i>et al.</i> , 1984 |
| 90 (30 maschi, 60femmine) | Copepodi / 50% Chironomidi / 30% altro (non classific.) / 20% | Italia settentrio- nale, lago | MALESANI, 1985 |
| ? | Afidi / 2,6% Chironomidi / 54,5% Coleotteri / 8,4% Ditteri [adulti] / 3,4% Emitteri / 5,8% Imenotteri / 2,8% Molluschi / 1,3% Cladoceri / 16,1% | Italia centrale, stagni artificiali | STELLA <i>et al.</i> , 1984 |
| 400 | fibre vegetali / 8% Copepodi / 9% Gammaridi / 1% Decapodi / 1% Ortotteri / 3% Emitteri / 5% Culicidi [larve e pupe] / 50% Culicidi [adulti] / 2% Coleotteri / 2% Imenotteri Formicoidei / 1% Aracnidi / 2% Uova di invertebrati / 1% Pesci | Florida, palude salmastra subtropicale | HARRINGTON & HARRINGTON, 1961 |

Gambusia ha ridotto le popolazioni di larve di Ditiscidi e Chaoboridi, nonché di neanidi di Odonati e Notonectidi (WALTON e MULLA, 1991). Mentre, in vasche sperimentali, ha determinato fioriture di Diatomee, Cianobatteri filamentosi ed alghe verdi, incremento della popolazione di Rotiferi, ed ha soppresso le popolazioni di Copepodi, Cladoceri e Chironomidi (LANCASTER e DRENNER, 1990).

In Sudan, in canali di irrigazione, ha ridotto le popolazioni degli invertebrati predatori ad esclusione dei Notonectidi. Anche il pesce *Oreochromis niloticus* subì un impatto negativo (EL-SAFI *et al.*, 1985).

In Italia, a pochi anni dalla sua introduzione, PARENZAN nel 1929, descrisse un notevole peggioramento delle caratteristiche fisiche e biologiche di alcuni bacini di piccole dimensioni nell'Istria meridionale, rispetto agli anni precedenti, quando si presentavano con acque di migliore aspetto, con fitoplancton ricco e svariato ed abbondanza di Crostacei (Cladoceri, Copepodi, Ostracodi). Tale peggioramento era legato al sovraffollamento di gambusie che avevano provocato la scomparsa dei Crostacei, la decomposizione del fitoplancton e lo sviluppo di Protozoi Infusori e Rotiferi. L'acqua era torbida e il fondo si presentava ricoperto da un detrito costituito per lo più da escrementi di gambusie. Lo stesso autore sottolineava che l'uso delle gambusie non deve essere generalizzato ma valutato sulla base delle caratteristiche delle raccolte d'acqua. Ad esempio, ne consigliava l'impiego nei bacini temporanei dove potevano controllare le larve di anofele e col prosciugamento si estinguevano esse stesse.

L'impoverimento e l'alterazione delle biocenosi appare, quindi, senz'altro un fenomeno da attribuire a *Gambusia* nel caso di ambienti acquatici instabili per le ridotte dimensioni e la variabilità stagionale del loro regime idrico.

Osservazioni recenti (STELLA *et al.*, 1984; MARGARITORA, 1990) condotte nelle "piscine" della tenuta di Castel Porziano hanno rilevato un forte impoverimento delle zoocenosi dovuto alla predazione soprattutto a carico di Cladoceri e Copepodi e la comparsa di fenomeni eutrofici favoriti oltre che dalla predazione, dalla notevole quantità di escrementi che, incentivando la crescita algale, riducevano la disponibilità di ossigeno provocando la scomparsa di tutti gli organismi più sensibili.

In ambienti umidi temporanei quali le risaie, *Gambusia* ha ridotto in modo significativo le popolazioni non bersaglio di insetti (Odonati, Corixidi, Belostomatidi, Notonectidi, Ditiscidi) e crostacei (Copepodi, Ostracodi, Cladoceri) (KRAMER *et al.*, 1988). Lo stesso effetto sullo zooplacton è stato osservato nelle lagune per la fitodepurazione delle acque reflue (CASTLEBERRY e CECH, 1990).

Uno studio condotto in risaie della California ha messo in luce gli effetti indiretti prodotti da *G. affinis* che, oltre a ridurre la densità di *Cx. tarsalis* Coquillet, ha ridotto le popolazioni di Copepodi Ciclopoidi, Cladoceri, Ostracodi ed insetti predatori di Culicidi (specialmente stadi preimmaginali di Coleotteri e Odonati) (BENCE, 1988).

L'azione predatoria nei confronti di altri predatori di zanzare può avere come risultato l'aumento del tasso di sopravvivenza larvale con il temporaneo incremento delle densità delle larve di zanzara. Questa circostanza è stata osservata in diversi lavori (HOY *et al.*, 1971; FARLEY e YOUNCE, 1977a, b) in contrasto con osservazioni compiute da WALTERS e LEGNER (1980) che in piccoli bacini di terra, con una dose di immissione di 8.957 pesci/ha, riscontrarono predazione su larve di coleotteri predatori e sullo zooplancton senza incremento delle zanzare e nemmeno fioriture di fitoplancton.

La comparsa di effetti collaterali appare largamente dipendente dalla dose di immissione. MIURA *et al.* (1984) in California hanno studiato l'impatto di *G. affinis* sull'ecosistema risaia. Immissioni di 0,22 Kg di pesce/ha non hanno prodotto effetti sulle densità di Copepodi, Ostracodi, Corixidi, Odonati, Belostomatidi, mentre hanno ridotto in modo significativo la popolazione di Cladoceri, Efemerotteri, Notonectidi e Chironomidi. BLAUSTEIN (1992) in risaia con immissioni di 2.318 gambusie/ha ha osservato riduzione significativa, rispetto alle parcelle di controllo, dei Notonectidi, mentre gli stadi preimmaginali di Efemerotteri, Coleotteri, Chironomidi e le popolazioni di microcrostacei (Copepodi, Cladoceri, Ostracodi) non hanno subito riduzioni significative.

L'analisi del possibile impatto a carico di specie ittiche è stata condotta in diversi studi. Eclatanti le osservazioni condotte da MILLER che, nel 1961, affermava come *G. affinis* fosse responsabile della scomparsa del pesce *Gasterosteus* sp. L. da molti corsi

d'acqua del Sud California (GERBERICH e LAIRD, 1985). Attribuita a *G. affinis* (DEACON *et al.*, 1964) anche la scomparsa del pesce *Rhynchtylus osculus* nella zona del lago Meaad in Nevada e di un'altra specie ittica, *Poeciliopsis occidentalis*, nella parte meridionale del fiume Colorado (MINCKLEY e DEACON, 1968). D'altra parte i fenomeni di interazioni negative interspecifiche sono sempre possibili quando si introducono specie esotiche: nell'areale di origine lo sviluppo di *G. affinis* è contrastato dalla voracità di un pecilide esotico per quell'area, *Belonesox belizanus*, la cui voracità porta a predare piccoli pesci tra cui appunto la gambusia (LACHNER, 1970 - cit. in VAINI, 1985).

Nell'ambiente del Delta del Po, *G. holbrooki* sembra avere instaurato un rapporto di concorrenza con il nono (*Aphanius fasciatus* Nardo) affermandosi numericamente e aumentando progressivamente l'area di distribuzione a scapito di questa specie autoctona la quale impiega più tempo a raggiungere la maturità sessuale, depone sulla vegetazione acquatica, una sola volta all'anno, uova facilmente predabili, ha una minore adattabilità alimentare ed è più soggetta ad attacchi parassitari (GANDOLFI, 1973).

L'impatto di *G. affinis* ha destato preoccupazioni anche nei confronti degli anfibi anuri. Sono state eseguite specifiche prove di laboratorio allo scopo di evidenziare se *G. affinis* si alimentasse preferibilmente di girini della specie *Rana aurora draytonii* rispetto a prede alternative e se quest'ultimi diminuissero il livello di attività in presenza del pesce. I risultati dell'indagine hanno evidenziato che *Gambusia* preferiva cibarsi di larve di *Cx. tarsalis* e di *Daphnia* spp. rispetto ai girini che raramente erano attaccati e consumati. Comunque la presenza di *Gambusia* provocava una diminuzione del tasso di crescita dei girini per ferimento o per danneggiamento dell'attività di foraggiamento, effetto che non si osservava più negli stadi finali. Lo stesso rischio di ferimento era ridotto in presenza di prede alternative (LAWLER e DRITZ, 1995).

Efficacia nei confronti delle popolazioni di zanzare moleste

A partire dalla fine degli anni '60, numerosissime sono state le prove di campo per verificare le potenzialità di varie specie ittiche nel contenimento delle zanzare. *Gambusia* spp. è stata certamente al centro dell'interesse (LACEY e LACEY, 1990). La tipo-

logia delle raccolte d'acqua in cui le zanzare trovano condizioni idonee allo sviluppo è molto variabile e diversi sono i casi che si prestano all'impiego di questa specie. Ad esempio l'utilizzo di *Gambusia* risulta efficace in canali di scolo sotterranei (Fresno, California) nei quali per l'inaccessibilità sono ostacolati altri tipi di trattamento (MIURA e MULLIGAN, 1982; FARLEY e CATON, 1982), oppure in bacini per la fitodepurazione di acque di scolo dove risulta importante la sua tolleranza a condizioni ambientali scadenti (CASTLEBERRY e CECHE Jr., 1990).

G. affinis viene considerata con favore in ambiente urbano in combinazione con larvicidi piretroidi da MOHSEN *et al.* (1995). L'autore valuta l'efficacia del pesce contro *Cx. quinquefasciatus* Say, insieme e a confronto, con un larvicida piretroide, lambda-cyhalothrin, in focolai larvali artificiali costituiti da contenitori di cemento di pochi metri quadrati di superficie. Con una immissione di 50 individui/m² ottiene una riduzione di larve e pupe del 21% fino ad arrivare progressivamente al 99% dopo 24 giorni. Un'aggiunta pari a 100 individui/m² mantiene l'assenza completa di larve e pupe dal 38esimo giorno di post-trattamento fino alla fine dell'esperimento (57esimo giorno). Parallelamente, alla dose di 8 mg p.a./m² di lambda-cyhalothrin in combinazione con 50 gambusie/m², non si osservano effetti dannosi sul pesce e si ottiene una riduzione del 100% a partire dal primo giorno di post-trattamento.

Non è mancato l'interesse nella verifica della capacità predatoria di *Gambusia* nei confronti delle zanzare rispetto ad altre specie ittiche autoctone. In Colorado è stata valutata la capacità predatoria di *G. affinis* e di un ciprinide indigeno *Fundulus zebrinus*, in stagni di ridotta dimensione colonizzati da *Cx. tarsalis*. Entrambe le specie sono risultate efficaci, durante tutta la stagione, rispetto alle pozze non trattate. *F. zebrinus* è però valutato più interessante perchè riesce a resistere ai rigori dell'inverno (NELSON e KEENAN, 1992). In California, WALTERS e LEGNER (1980) hanno studiato gli effetti dovuti all'introduzione di *G. affinis* e di *Cyprinodon macularius* Baird e Girard, sui principali elementi biotici in piccoli bacini in cui sono stati riprodotti un ambiente palustre naturale e l'ecosistema risaia. Entrambe le specie hanno ridotto le popolazioni di *Cx. tarsalis* ma *G. affinis* si è dimostrato più efficace di *C. macularius* in presenza

di riso. Gli autori concludono, comunque, che *C. macularius* può essere un sostituto di *G. affinis* nella lotta alle zanzare negli Stati Sud-Ovest degli Stati Uniti, specialmente in habitat che presentano altre specie ittiche e dove l'acqua ha oscillazioni ampie di temperatura e di salinità.

In un areale deltizio giapponese, SATO (1989) ha compiuto osservazioni di carattere ecologico sulla colonizzazione e distribuzione di *G. affinis*, a cinque anni dalla sua introduzione, e sulle relazioni competitive con un'altra specie di pesce, *Oryzias latipes*. *Gambusia* si è diffusa rapidamente colonizzando nuovi ambienti dove non si rinvenivano più larve di zanzara. La maggiore capacità di predare larve di zanzara e di espandere rapidamente le sue popolazioni, rendono *G. affinis* specie più adatta, rispetto a *O. latipes*, per il controllo culicidico.

Negli Stati Uniti, *Gambusia* è ampiamente utilizzata nei programmi integrati di lotta alle zanzare in molte aree (GARCIA e ROCHERS, 1986; JONES, 1988; HARAMIS e DOMINICK, 1990).

In tutto il mondo l'ambiente nel quale l'utilizzo di *Gambusia* ha trovato maggiore impiego è sicuramente la risaia. La presenza di acqua per diversi mesi e i movimenti cui è sottoposta per ragioni agronomiche creano un ambiente idoneo allo sviluppo culicidico. Negli Stati Uniti, è utilizzata su larga scala nelle risaie della California (MEISH, 1985; GARCIA e ROCHERS, 1986). La tabella 2 riassume gran parte delle esperienze condotte e mette in evidenza i risultati raggiunti in termini di riduzione delle densità culicidiche.

A condizionare l'efficacia, oltre alla quantità di individui introdotti, è anche l'età dei pesci. Immissioni di 6.458 individui giovani per ettaro, dal peso medio di 0,6 gr e della lunghezza media di 3,2 cm, in parcelle di risaie nell'Arkansas, a 48 ore danno luogo ad una predazione larvale molto bassa (0,6%) rispetto ad una riduzione del 100% ottenuta con individui adulti di peso medio di 1,5 gr e della lunghezza di 3,9 cm. (DAVEY et al, 1974).

A specifici lavori mirati a verificare l'efficacia di *Gambusia* nel controllo dei Culicidi negli ambienti dove era stata immessa, ne sono seguiti molti altri mirati a mettere in luce gli effetti indiretti e i limiti come agente di controllo anticulicidico.

BLAUSTEIN e KARBAN (1987) in prove sperimentali

eseguite in risaia in parcelle ricavate all'interno dell'appezzamento, hanno osservato che lo sviluppo larvale di *Cx. tarsalis*, fino allo stadio di pupa, è più veloce in presenza del pesce, così come il tasso di sopravvivenza per la maggiore disponibilità di cibo (fitoplancton, protozoi, batteri, detriti organici) mancando la competizione esercitata dallo zooplancton che è ridotto in densità dalla predazione esercitata da *Gambusia*.

I risultati ottenuti in ambienti simili non sono univoci a dimostrazione della complessità dei fattori che interagiscono sullo sviluppo culicidico e sull'attività di predazione.

BLAUSTEIN di recente (1992) utilizzando dosi elevate di immissione del pesce (2.318 individui/ha) in parcelle all'interno di risaie non ha ottenuto differenze significative rispetto alle parcelle di controllo.

In risaie coltivate a riso selvatico (*Zizania palustris* L.) non si è ottenuto un controllo larvale sufficiente con immissioni di 0,6 e 1,7 Kg/ha di gambusie (in questo caso si è stimato che un Kg di gambusie era costituito da 1.000 individui) (KRAMER et al., 1987). Gli stessi ricercatori, in esperimenti eseguiti successivamente negli stessi ambienti hanno riscontrato invece buoni risultati a diverse dosi di immissione del pesce (1,1 e 3,4 Kg/ha) con o senza l'ausilio di trattamenti a base di *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* De Barjac (KRAMER et al., 1988).

In aree delle regioni paleartiche, dove in un recente passato si sono verificate epidemie malariche, il ruolo di *Gambusia* è stato considerato importante per la riduzione delle densità di *Anopheles*. Esperienze in cui sono stati ottenuti risultati positivi a seguito dell'introduzione di *G. affinis* sono riportate da HADJINICOLAOU e BETZIOS in Grecia, TABIBZADEH et al. in Iran (cit. in MEISCH, 1985), INCI et al. in Turchia (1992), MARUASHVILLI (1990) in Georgia.

Attuale utilizzo in Italia

Dopo le campagne coordinate di introduzione del pesce, condotte fino agli anni '40, l'avvento del D.D.T. ha relegato in secondo piano il suo ruolo. L'uso delle gambusie interessò situazioni isolate di anofelismo come nel caso della tenuta di Castel Porziano nel 1963 contro *An. melanoon* Hackett ed *An. maculipennis* s.s. Hackett e Missiroli che colonizzavano piccoli stagni e dove l'efficacia del controllo fu

Tabella 2. *Gambusia affinis* come agente di controllo biologico nei confronti di larve di Culicidi (Tratto da *Journal of the American Mosquito Control Association* - Supplement # 2, June 1990, modificata e integrata).

| Quantità immessa individui/ha | Ambiente | Specie bersaglio | Riduzione% densità larve - periodo di controllo | Autori |
|-------------------------------|---|---|---|------------------------------|
| 13.500 27.000 54.000 | Louisiana - risaia | <i>Ps. confinnis</i> | 86 - 2 sett. 87 96 | CRAVEN & STEELMAN, 1968 |
| 500 2.500 | California - risaia | <i>Cx. tarsalis</i> | 95 - 11 sett. 99 | HOY & REED, 1970 |
| 250 500 | California - risaia - | <i>Cx. tarsalis</i> | 82 - 12 sett. 82 | HOY & REED, 1971 |
| 2.200 6.700 | Arkansas - risaia | <i>Ps. confinnis</i> | 72 - 36 ore 100 - 48 ore | DAVEY <i>et al.</i> , 1974 |
| 100-50.000 | Uzbekistan - risaia | <i>An. hyrcanus</i> <i>An. pulcherrimus</i> <i>Cx. pusillus</i> <i>Cx. pipiens</i> <i>Un. unguiculata</i> | 96,4 - 100 - | ZAIÑIEV & MUMINOV, 1983 |
| 1.600 | California - parcelle di riso - | <i>An. freeborni</i> | 72 - 120 giorni | BLAUSTEIN & KARBAN, 1985 |
| 280 | California - risaia | <i>Cx. tarsalis</i> | 49 - 7 sett. | STEWART <i>et al.</i> , 1983 |
| 930 2.800 | California - parcelle di riso | <i>An. freeborni</i> <i>Cx. tarsalis</i> | +53 (a) - 18 - | CECH Jr. & LINDEN, 1987 |
| 600 1.700 | California - parcelle di riso selvatico | <i>Cx. tarsalis</i> <i>An. freeborni</i> <i>An. franciscanus</i> | 0 | KRAMER <i>et al.</i> , 1987 |
| 225 | California - risaia | <i>Cx. tarsalis</i> | 42 - 11 sett. | MIURA <i>et al.</i> , 1984 |
| 1.100 3.400 | California - parcelle di riso selvatico | <i>Cx. tarsalis</i> <i>An. freeborni</i> <i>An. franciscanus</i> | 89 - 10 sett. 90 | KRAMER <i>et al.</i> , 1988 |

| | | | | |
|---|---|---|------------------------|-----------------------------|
| 1.600 <i>G. affinis</i> 1.600 <i>Lepomis cyanellus</i> | California - risaia | <i>An. freeborni</i> | 86 - 120 giorni | BLAUSTEIN & KARBAN, 1985 |
| 0,75 Kg | California - risaia | <i>Cx. tarsalis</i> <i>An. freeborni</i> <i>An. franciscanus</i> | 80 | GARCIA <i>et al.</i> 1990 |
| 1.100 3.400 | California - parcelle di riso selvatico | <i>Cx. tarsalis</i> <i>An. freeborni</i> <i>An. franciscanus</i> | 89 - 10 sett. 90 | KRAMER <i>et al.</i> , 1988 |
| 50.000 | India - risaia | ? | significativa - 42 gg. | DAS & PRASAD, 1991 |
| ? | India - risaia | <i>An. annularis</i> <i>An. subpictus</i> <i>An. nigerrimus</i> <i>An. barbirostris</i> <i>An. aconitus</i> <i>Cx. tritaeniorhynchus</i> <i>Cx. bitaeniorhynchus</i> <i>Cx. quinquefasciatus</i> <i>Aedes sp.</i> | 87,8 - 150 gg. | PRASAD & PRASAD, 1993 |

(a) incremento nel numero di larve di zanzara

completa (VALENTI, 1964).

Soltanto di recente sono riportate esperienze localizzate di utilizzo del pesce contro le specie di Culicidi moleste, come l'introduzione in stagni alla periferia di Lodi (BARLASSINA e GOBBO, 1985), in canali di irrigazione in provincia di Ravenna (FERRARI e ARGNANI, 1993). Nel 1986 un nucleo di 2.000 esemplari fu introdotto nel Lago Grande e nel canale che attraversa la palude nei Laghi di Avigliana in Piemonte (ROLANDO e PALESTRINI, 1989) ma non si hanno dati relativi all'acclimatemento.

Viene inoltre impiegata, con speciale deroga alla L.R. n.11 del 22/02/93, che ne vieta l'immissione nelle acque interne della regione Emilia-Romagna, nel Progetto regionale di lotta ai Culicidi nelle zone turistiche costiere del delta del Po, esclusivamente in risaia e bacini chiusi (BELLINI e VERONESI, 1994;

VERONESI *et al.*, 1995).

Conclusioni

Nonostante non manchino esempi di scarsa efficacia, resta indubbia l'azione che *Gambusia* può svolgere come mezzo di controllo anticulicidico all'interno di progetti di lotta integrata alle zanzare.

La delicatezza dei rapporti che sostengono le biocenosi acquatiche e l'osservazione di effetti collaterali negativi in seguito alla sua immissione in alcuni ambienti hanno richiesto approfondite verifiche del suo comportamento.

L'Organizzazione Mondiale della Sanità la eliminò dall'elenco delle specie larvivore raccomandate nel 1980 per poi riabilitarla due anni dopo (WHO, 1982 - cit. in GERBERICH e LAIRD, 1985).

L'argomento continua ad essere oggetto di di-

battito all'interno della comunità scientifica. Di recente, entomologi e ittiologi hanno messo a confronto diversi punti di vista in un dibattito che ha confermato quanto lontano sia una visione unanime sull'argomento (RUPP, 1996).

Su posizioni di cautela prudentiale sono le normative della Regione Piemonte (L.R. n°7 del 18/02/81) e della Regione Emilia-Romagna (L.R. n°11 del 22/02/93) in materia di fauna ittica e pesca che, viste le finalità di salvaguardia del patrimonio ittico, ne vietano l'immissione nelle acque interne.

Gli effetti di destabilizzazione osservati in alcuni ambienti messi a contatto con *Gambusia* riguardano biotopi particolarmente vulnerabili per le piccole dimensioni e la conseguente fragilità delle biocenosi presenti. Il fenomeno limite della "sovrasaturazione" è legato in particolar modo a bacini piccoli e completamente isolati. In genere l'aumento della concentrazione del pesce, porta al contenimento naturale delle popolazioni di *Gambusia* per effetto feed back, in seguito alla diminuzione delle risorse alimentari, nonché per l'instaurarsi di fenomeni di cannibalismo.

Elevate densità di larve di Culicidi si riscontrano frequentemente in ambienti con biocenosi assai semplificate selezionate dalla qualità scadente dell'acqua o immature, dove le popolazioni non sono sottoposte, o lo sono in misura lieve, a pressione predatoria. È questo il caso di ambienti allagati temporaneamente per l'azione di attività produttive come le vasche di decantazione delle acque di lavorazione dell'industria agro-alimentare (ad es. vasche degli stabilimenti saccariferi) o le risaie che possono essere definite un agroecosistema umido temporaneo, distrutto alla fine di ogni ciclo colturale. In questi ambienti l'introduzione di *Gambusia* fornisce risultati apprezzabili senza provocare, per contro, effetti ecologicamente negativi. La sua azione è comunque sempre da considerare ausiliaria in un contesto di lotta biologica integrata e può avere efficacia alterna durante la stagione qualora vengano modificate le condizioni ambientali (ad es. variazioni del livello d'acqua, l'aumento della vegetazione acquatica che può offrire riparo alle larve).

In genere l'utilizzo di *Gambusia* risulta più adatto nella lotta contro *Culex* ed *Anopheles* mentre non garantisce risultati sufficienti contro le specie che ovidepongono sul terreno umido soggetto ad inonda-

zioni per svilupparsi rapidamente in modo sincrono in seguito all'allagamento. Questo è quanto verificato nelle risaie dell'Arkansas dove la coltura del riso prevede, per tutto il ciclo, asciutte e successive sommersioni e quindi la gambusia non si presta al controllo di *Psorophora columbiae* (Dyar & Knab) (DAVEY e MEISCH, 1977a). Ciò vale anche per le risaie della pianura Padana nei confronti di *Ae. caspius* (Pallas) (BELLINI *et al.*, 1994). Nel periodo iniziale della coltura prima dell'allagamento definitivo, si susseguono 2-3 periodi di asciutta e sommersione che permettono alle uova di questa specie deposte sul suolo di schiudere ad ogni allagamento del bacino e dare origine a popolazioni larvali spesso numericamente molto elevate che richiederebbero quantità di pesce insostenibili.

Nel caso delle risaie, l'epoca di immissione è condizionata anche dalla forte pressione chimica cui è sottoposta la coltura. Le gambusie introdotte fin dall'inizio con il primo allagamento, potrebbero concentrarsi e mantenersi durante le fasi di asciutta nelle canalette perimetrali, dove spesso permane acqua, se la stessa sopravvivenza non fosse compromessa dalla tossicità dei prodotti fitosanitari. L'integrazione tra pesce e trattamenti larvicidi a base di *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* sembra al momento la strategia di lotta da preferire. Se necessario ed in presenza di forti infestazioni larvali un trattamento larvicida è a volte necessario anche subito dopo l'introduzione del pesce prima che la sua azione si esplichino appieno.

Infine, uno dei possibili problemi da affrontare riguarda l'approvvigionamento del pesce. Per piccole quantità il problema si supera effettuando raccolte direttamente nei luoghi accessibili in cui è presente. In questi casi l'operazione è il più delle volte poco impegnativa se si adotta un retino a maglia sufficientemente fine con manico allungabile. Altra fonte di approvvigionamento è rappresentata dagli allevamenti ittici che essendo spesso infestati da *Gambusia* dispongono a fine ciclo di buone quantità di materiale. Tuttavia in questi casi, il reperimento è legato al ciclo di allevamento delle specie pregiate e quindi non sempre la disponibilità coincide con le esigenze del programma di lotta anticulicidico. Nel caso di introduzioni su larga scala che richiedono un numero elevato di individui in gran parte in età riproduttiva all'inizio della stagione primaverile, la strada può essere quella della

raccolta autunnale, stabulazione invernale in appositi ambienti e riutilizzo nella primavera successiva. Ricorrere ad allevamenti razionali, come avviene negli Stati Uniti dove si sono realizzate forme intensive di allevamento (DAVEY e MEISCH, 1977b; DOWNS, 1986; FONTAINE *et al.*, 1984; GALL *et al.*, 1980; HOY, 1985), sembra al momento fuori luogo per il nostro Paese.

BIBLIOGRAFIA

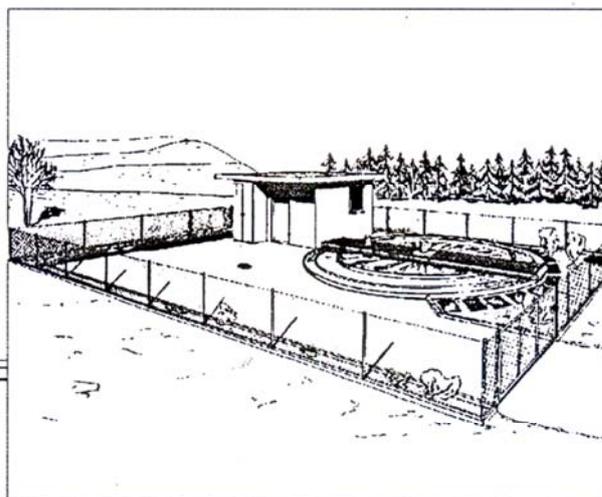
- AMORI G., ANGELICI F.M., FRUGIS S., GANDOLFI G., GROPPALE R., LANZA B., RELINI G., VICINI G., 1993. - Checklist delle specie della fauna d'Italia. Vertebrata. - In: S., (Eds.). Checklist delle specie della fauna italiana, Minelli A., Ruffo S., La Posta. Calderini, Bologna, pp.110.
- BARLASSINA C., GOBBO C. 1985. *Gambusia affinis* (Baird et Girard): un tentativo di lotta biologica alle larve di zanzara in provincia di Milano. *Disinfestazione*, **3** (2): 10.
- BEESLEY C., DOWNS C., FONTAINE R.E., CECH J.J. Jr. 1986. Influence on flow rate on *Gambusia affinis* growth rate and water quality. *Proc. & Papers Ann. Conf. Calif. Mosq. Vector Control Assoc.*, **53**: 107-110.
- BELLINI R., VERONESI R., 1994. Il programma di lotta ai Culicidi nelle località costiere della regione Emilia-Romagna inserite nel Parco del Delta del Po. *Atti XVII Congresso nazionale italiano di Entomologia, Udine 13-18 giugno 1994*, pp. 795-798.
- BELLINI R., VERONESI R., RIZZOLI M., 1994. Efficacy of various fish species (*Carassius auratus* [L.], *Cyprinus carpio* [L.], *Gambusia affinis* [Baird and Girard]) in the control of rice field mosquitoes in Northern Italy. *Bull. Soc. Vector Ecol.*, **19** (2): 87-99.
- BENCE J. 1985. Behavioral responses of predators to prey abundance: learning and population dynamic consequences. *Bull. Ecol. Soc. Amer.*, **66**: 140.
- BENCE J.R., 1988. Indirect effects and biological control of mosquitoes by mosquitofish. *J. Appl. Ecol.*, **25**: 505-521.
- BENCE J.R., MURDOCH W.W. 1986. Prey size selection by the mosquitofish: relation to optimal diet theory. *Ecology*, **67** (2): 324-336.
- BISAZZA A., ZULIAN E., MERLIN E. 1990. Note sulla biologia riproduttiva di *Gambusia holbrooki* nell'Italia Nord-orientale. *Riv. Idrobiol.*, **29** (1): 151-162.
- BLACK D.A., HOWELL W.H. 1979. The North American mosquitofish, *Gambusia affinis*: a unique case in sex chromosome evolution. *Copeia*, 509-513.
- BLAUSTEIN L. 1992. Larvivoracious fishes fail to control mosquitoes in experimental rice plots. *Hydrobiologia*, **232**: 219-232.
- BLAUSTEIN L., KARBAN R. 1985. Effects of mosquitofish on mosquito abundance in rice fields. In: *Mosquito Control Research - Ann. Rep. Univ. Calif. Div. Agric. Nat. Res.*, pp.57-58.
- BLAUSTEIN L., KARBAN R. 1987. Larvivoracious predators and zooplankton: indirect effects on mosquitoes in rice fields. *Proc. & Papers Ann. Conf. Calif. Mosq. Vector Control Assoc.*, 55, 120.
- BLAUSTEIN L., KARBAN R. 1990. Indirect effects of the mosquitofish *Gambusia affinis* on the mosquito *Culex tarsalis*. *Limnol. Oceanogr.*, **35** (3): 767-771.
- CASTLEBERRY D.T., CECH Jr.J.J. 1987. Selected larvivoracious fish for mosquito control in wastewater. In: *Mosquito Control Research - Ann. Rep. Univ. Calif. Div. Agric. Nat. Res.*, pp.30-32.

- CASTLEBERRY D.T., CECH Jr. J.J. 1990. Mosquito control in wastewater: a controlled and quantitative comparison of pupfish (*Cyprinodon nevadensis amargosae*), mosquitofish (*Gambusia affinis*) and guppies (*Poecilia reticulata*) in sago pondweed marshes. *J. Am. Mosq. Control Assoc.*, **6** (2): 223-228.
- CECH JR. J.J., BOTSFORD L.W., VONDRACEK B., LINDEN A.L., WAINWRIGHT T., KOPE R. 1982. Bioenergetic model of mosquitofish predation on mosquito larvae. In: *Mosquito Control Research - Ann. Rep. Univ. Calif. Div. Agric. Nat. Res.*, pp. 52-54.
- CECH Jr. J.J., LINDEN A.L. 1987. Comparative larvivorious performances of mosquitofish, *Gambusia affinis*, and juvenile sacramento blackfish, *Orthodon microlepidotus*, in experimental paddies. *J. Am. Mosq. Control Assoc.*, **3** (1): 35-41.
- CECH JR. J.J., SCHWAB R.G., COLES W.C., BRIDGES B.B. 1989. Dietary and fotoperiodic effects on mosquitofish reproduction. In: *Mosquito Control Research - Ann. Rep. Univ. Calif. Div. Agric. Nat. Res.*, pp. 29-31.
- CHEVINSKI J., 1983. Salinity tolerance of the mosquito fish, *Gambusia affinis* (Baird and Girard). *J. Fish Biol.*, **22**: 9-11.
- CRAVEN B.R., STEELMAN C.D. 1968. Studies on a biological and chemical method of controlling the dark rice field in Louisiana. *J. Econ. Entomol.*, **61**: 1333-1336.
- CRIVELLI A.J., BOY V. 1987. The diet of mosquitofish *Gambusia affinis* (Baird & Girard) in Mediterranean France. *Rev. Ecol. Terre Vie*, **42**: 421-435.
- DAS M.K., PRASAD R.N. 1991. Evaluation of mosquito fish *Gambusia affinis* in the control of mosquito breeding in rice fields. *Indian J. Malariol.*, **28** (3): 171-178.
- DAVEY R.B., MEISCH M.V., GRAY D.L., MARTIN J.M., SNEED K.E., WILLIAMS F.J. 1974. Various fish species as biological control agents of the dark rice field mosquito in Arkansas rice fields. *Environ. Entomol.*, **3**: 823-826.
- DAVEY R.B., MEISCH M.V. 1977a. Control of dark ricefield mosquito larvae, *Psorophora columbiae* by mosquitofish, *Gambusia affinis* and green sunfish, *Lepomis cyanellus*, in Arkansas ricefields. *Mosq. News*, **37**: 258-262.
- DAVEY R.B., MEISCH M.V. 1977b. Low maintenance production studies of mosquitofish, *Gambusia affinis* in Arkansas. *Mosq. News*, **37**: 760-763.
- DAVEY R.B., MEISCH M.V., GRAY D.L., MARTIN J.M., SNEED K.E., WILLIAMS F.J. 1974. Various fish species as biological control agents for the dark ricefield mosquito in Arkansas ricefields. *Environ. Entomol.*, **3**: 823-831.
- DEACON J.E., HUBBS C., ZAHURANEC B.J. 1964. Some effects of introduced fishes on the native fish fauna of Southern Nevada. *Copeia*, **2**: 384-388.
- DOWNES C.W., BEESLEY C., FONTAINE R.E., CECH Jr. J.J. 1986. Operational mosquitofish production: brood stock management. In: *Mosquito Control Research - Ann. Rep. Univ. Calif. Div. Agric. Nat. Res.*, pp. 86-88.
- EL-SAFI S.H., HARIDI A.A.M., EL RABAA F.M.A. 1985. The impact of the exotic fish *Gambusia affinis* (Baird and Girard) on some natural predators of immature mosquitoes. *J. Trop. Med. & Hyg.*, **88**: 175-178.
- FARLEY D.G., CATON J.R. 1982. A preliminary report on the use of mosquitofish to control mosquitoes in an urban storm drain system. In: *Mosquito Control Research - Ann. Rep. Univ. Calif. Div. Agric. Nat. Res.*, pp.57-58.
- FARLEY D.G., YOUNCE L.C. 1977a. Stocking date versus efficacy of *Gambusia affinis* in Fresno County rice fields. *Proc. Cal. Mosq. Vector Control Assoc.*, **45**: 83-86.
- FARLEY D.G., YOUNCE L.C. 1977b. Effect of *Gambusia affinis* (Baird & Girard) on selected non-target organism in Fresno County rice fields. *Proc. Calif. Mosq. Vector Control Assoc.*, **45**: 87-94.
- FERRARI R., ARGNANI C. 1993. Utilizzo di *Gambusia holbrooki* nella lotta biologica alle larve di zanzara in Romagna. *Disinfe-stazione*, **10** (2): 31-34.
- FLEMING K.J., SCHOOLEY J.K., GRANT C.D., COMBS J.C., COYKENDALL R.L., LUSK E.E., WASHINO R.K. 1984. Foraging patterns and prey selection by marsh fish. *Proc. & Papers fifty-second Ann. Conf. Calif. Mosq. Control Assoc., Inc., January 29 thru February 1, 1984, Long Beach, California*
- FONTAINE R.E., CECH J.J., BEESLEY C. 1984. Progress in intensive culture of mosquitofish. In: *Mosquito Control Research - Ann. Rep. Univ. Calif. Div. Agric. Nat. Res.*, pp. 69-70.
- GALL A.E., DAWNS C., MONACO G. 1980. Technology for mass production of *Gambusia*. In: *Mosquito Control Research - Ann. Rep. Univ. Calif. Div. Agric. Nat. Res.*, p.78.
- GANDOLFI, G. 1973. Primi dati sul popolamento ittico nelle acque interne del Delta padano. *Acta Natur.*, **9**: 409-417.
- GANDOLFI G., ZERUNIAN S. 1987. I pesci delle acque interne italiane: aggiornamento e considerazioni critiche sulla sistematica e la distribuzione. *Atti Soc. It. Sc. Nat. Mus. civ. St. Nat. Milano*, **128** (1-2): 3-56.
- GARCIA R., ROCHERS B. 1986. Studies of the development of an integrated mosquito control strategy for the Foll River Mills Area. *Proc. & Papers Ann. Conf. Calif. Mosq. Vector Control Assoc.*, **53**: 57-62.
- GARCIA R., VOIGT W.G., HAYES A., COLWELL A.E., WOODWARD D.V., ANDERSON N.L. 1990. Integrated control of mosquitoes. In: *Mosquito Control Research - Ann. Rep. Univ. Calif. Div. Agric. Nat. Res.*, pp. 51-53.
- GERBERICH J.B., LAIRD M. 1985. Larvivorous fish in the biocontrol of mosquitoes, with a selected bibliography of recent literature. In: *Integrated Mosquito Control Methodologies, (Vol. 2). Biocontrol and other innovative components and future directions. M. Laird and J.W. Miles, (Eds.) Academic Press, London*, pp. 47-76.
- HAAS R., PAL R. 1984. Mosquito larvivorous fishes. *Bull. Ent. Soc. Am.*, **30**: 17-25.
- HARAMIS L.D., DOMINICK H.J. 1990. Pesticide use by Illinois

- abatement districts. *Proc. Illinois Mosq. Vector Control Assoc.*, **1**: 31-36.
- HARRINGTON JR. R.W., HARRINGTON E.S. 1961. Food selection among fishes invading a high subtropical salt marsh: from onset of flooding through the progress of a mosquito brood. *Ecology*, **42** (4): 646-666.
- HOY J.B. 1985. Experimental mass-rearing of the mosquitofish, *Gambusia affinis*. *J. Am. Mosq. Control Assoc.*, **1** (3): 295-298.
- HOY J.B., REED D.E. 1970. Biological control of *Culex tarsalis* in a California rice field. *Mosq. News*, **30** (2): 222-230.
- HOY J.B., REED D.E. 1971. The efficacy of mosquitofish for control of *Culex tarsalis* in California rice fields. *Mosq. News*, **31** (4): 567-572.
- HOY J.B., O'BERG A.G., KOUFFMAN E.E. 1971. The mosquitofish as a biological control agent against *Culex tarsalis* and *Anopheles freeborni* in Sacramento Valley rice field. *Mosq. News*, **31**: 146-152.
- HURLBERT S.H., MULLA S. 1981. Impact of mosquitofish (*Gambusia affinis*) predation on plankton communities. *Hydrobiologia*, **83**: 125-151.
- HURLBERT S.H., ZEDLER J., FAIRBANKS D. 1972. Ecosystem alteration by mosquitofish (*Gambusia affinis*) predation. *Science*, **175**: 639-641
- INCI R., YLDIRIM M., BAGCI N., INCI S. 1992. Biological control of mosquito larvae by mosquitofish (*Gambusia affinis*) in the Batman-Siirt area. *Turkiye Paraz. Dergisi*, **16** (2): 60-66.
- JONES C.J. 1988. A survey of the use of biological control of mosquitoes by Mosquito Control Districts in Florida, with comments on mosquito and other pest arthropod prevalence. *J. Fl. Anti Mosq. Assoc.*, **59** (1): 22-27.
- KRAMER V.L., GARCIA R., COLWELL A.E. 1987. An evaluation of the mosquitofish, *Gambusia affinis*, and the inland silverside, *Menidia beryllina*, as mosquito control agents in California wild rice fields. *J. Am. Mosq. Control Assoc.*, **3**: 626-632.
- KRAMER V.L., GARCIA R., COLWELL A.E. 1988. An evaluation of *Gambusia affinis* and *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* as mosquito control agents in California wild rice fields. *J. Am. Mosq. Control Assoc.*, **4**: 470-478.
- LANCASTER H.F., DRENNER R.W. 1990. Experimental mesocosms study of the separate and interaction effects of phosphorus and mosquitofish (*Gambusia affinis*) on plankton community structure. *Can. J. Fish. & Aquat. Sc.*, **47**: 471-479.
- LACEY L.A., LACEY C.M. 1990. The medical importance of riceland mosquitoes and their control using alternatives to chemical insecticides. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* - Supplement # 2, pp. 93
- LAWLER S.P., DRITZ D.A. 1995. Assessing the direct and indirect effects of the mosquitofish (*Gambusia affinis*) on the tadpoles of a declining species of amphibian, the red-legged frog (*Rana aurora draytonii*). In: *Mosquito Control Research - Ann. Rep. Univ. Calif. Div. Agric. Nat. Res.*, pp. 50-52.
- LINDEN A.L., CECH JR. J.J. 1990. Prey selection by mosquitofish (*Gambusia affinis*) in California rice fields: effect of vegetation and prey species. *J. Am. Mosq. Control Assoc.*, **6**: 115-120.
- MALESANI V. 1985. La gambusia (*Gambusia affinis* Baird et Girard) nel Garda. *Atti Mus.civ. St. nat. Trieste*, **37** (3): 235-246.
- MARUASHVILLI G.M. 1990. [Prophylaxis of malaria by ecologically safe methods]. *Meditsinskaya Parazitologiya i Parazitarnye Bolezni*, **4**: 3-4.
- MARGARITORA F.G. 1990. Influenza di *Gambusia affinis* sulla struttura e dinamica dei popolamenti zooplanctonici degli stagni di Castel Porziano (Lazio). *Riv. Idrobiol.* **29** (3): 747-762.
- MEISCH M.V. 1985. *Gambusia affinis affinis*. In: - Biological control of mosquitoes. H.C. Chapman (ed.). *Am. Mosq. Control Assoc. Bull. n. 6.*, pp 3-17.
- MINCKLEY W.L., DEACON J.E. 1968. Southwestern fishes and the enigma of "endangered species". *Science*, **159**: 1424-1432.
- MIURA T., MULLIGAN III F.S. 1982. Mosquitofish for control of mosquitoes in underground drains. In: *Mosquito Control Research - Ann. Rep. Univ. Calif. Div. Agric. Nat. Res.*, pp. 55-56.
- MIURA T., TAKAHASHI R.M., STEWART R.J. 1979. Habitat and food selection by the mosquitofish, *Gambusia affinis*. In: *Proc. & Papers Forty-seventh Ann. Conf. Calif. Mosq. Vector Control Assoc., Inc. January 28-31, 1979, Grant, C.D. (ed.) Burlingame, California, , 120 pp.*
- MIURA T., TAKAHASHI R.M., WILDER W.H. 1984. Impact of the mosquitofish (*Gambusia affinis*) on a rice field ecosystem when used as a mosquito control agent. *Mosq. News*, **44**: 510-517.
- MOHSEN Z.H., OUDA N.A., HASHIM A.K., ZAYIA H.H. 1995. Combined larvicidal efficacy of lambda-cyhalothrin and larvivorous fish (*Gambusia affinis*) against *Culex quinquefasciatus* mosquitoes. *J. Vector Ecol.*, **20** (2): 164-167.
- NAAMA A.K., AL-HASSAN L.A.J. 1989. Note on the potential brood size of mosquito fish, *Gambusia affinis* (Baird & Girard) collected from Iraq and Egypt (Pisces). *Boll. Mus. reg. Sc. nat. Torino*, **7** (1): 117-123.
- NATALI M. 1989. La fauna ittica del Lago Trasimeno: aggiornamento al 1988. *Riv. Idrobiol.*, **28**: 1-2.
- NELSON S.M., KEENAN L.C. 1992. Use of an indigenous fish species, *Fundulus zebrinus*, in a mosquito abatement program: a field comparison with the mosquitofish, *Gambusia affinis*. *J. Am. Mosq. Control Assoc.*, **8** (3): 301-304.
- PARENZAN P. 1929. Saturazione delle acque da parte delle Gambusie e danni che ne derivano. *Boll. Pesca, Piscic., Idrobiol.*, **5**: 1040-1047.
- PRASAD H., PRASAD R.N. 1993. Control of mosquito breeding through *Gambusia affinis* in rice fields. *Indian J. Malariol.*, **30** (2): 57-65.
- REGIONE EMILIA-ROMAGNA. 1988. Specie ittiche esotiche in Emilia-Romagna. Regione Emilia-ROMAGNA, *Assessorato Scuola, Cultura, Sport e tempo libero, Grafiche Zannini Bologna*, pp.56.

- REGIONE EMILIA-ROMAGNA. 1993. Tutela e sviluppo della fauna ittica e regolazione della pesca in Emilia Romagna. L.R. n. 11, 22 febbraio 1993.
- REGIONE PIEMONTE. 1981. Norme per la tutela e l'incremento del patrimonio ittico e per l'esercizio della pesca nelle acque della regione Piemonte. L.R. n. 7, 18 febbraio 1981.
- ROLANDO A., PALESTRINI C. 1989. Il controllo biologico delle popolazioni di insetti. Il caso dei Culicidi dei laghi di Avigliana. *Parco Naturale dei Laghi di Avigliana*, pp.28.
- RONCHETTI G. 1968. L'azione antianofelica dei pesci del genere *Gambusia*, utilizzati per la lotta biologica contro la malaria. *Natura*, **LVIII**: 25-41.
- RUPP H.R. 1996. Forum: adverse assessments of *Gambusia affinis*: an alternate view for mosquito control practitioners. *J. Am. Mosq. Control Assoc.*, **12** (2): 155-166.
- SATO H. 1989. Ecological studies on the mosquito fish, *Gambusia affinis* for encephalitis control with special reference to selective feeding on mosquito larvae and competition with the medaka, *Oryzias latipes*. *Japan. J. Trop. Med. Hyg.*, **17** (2): 157-173.
- SELLA M. 1928. I pesci larvifagi e l'esperimento di campagna antimalarica con le Gambusie a Rovigno d'Istria. *Boll. Pesca, Piscic., Idrobiol.*, **4** (2): 174-197.
- SOKOLOV N.P. 1936. L'acclimatation du *Gambusia patruelis* en Asie central. *Riv. Mal.*, **15** (5): 325-344.
- STELLA E., DI GIROLAMO I., DELL'UOMO G., RIVOCCHI I. 1984. Osservazioni sulla distribuzione di *Gambusia affinis* (Baird e Girard, 1854) negli ambienti umidi naturali di Castel Porziano a 20 anni dalla loro immissione. *Riv. Idrobiol.*, **23** (2-3): 173-186.
- STEWART R.J., SCHAEFER C.H., MIURA T. 1983. Sampling *Culex tarsalis* (Diptera: Culicidae) immatures on rice field treated with combination of mosquitofish and *Bacillus thuringiensis* H-14 toxin. *J. Econ. Entomol.*, **76**: 91-95.
- VAINI F.A. 1985. Introduzione di specie ittiche esotiche nelle acque interne: storia, motivazioni, aspetti ecologici e sanitari. *Riv. Ital. Piscic. Ittiop.*, **20** (4): 118-126.
- VALENTI M. 1964. Impiego delle Gambusie per il controllo dell'anofelismo residuo a Castel Porziano (Roma). *Riv. Mal.*, **43**: 50-62.
- VERONESI R., DONATI L., BELLINI R. 1995. Studio sulle specie di zanzare nocive nell'area del Delta del Po e sul loro contenimento. *Quad. Staz. Ecol. civ. Mus. St. nat. Ferrara*, **9**: 261-273.
- VONDRACEK B., WURTSBAUGH W.A., CECH J.J. 1988. Growth and reproduction of the mosquitofish, *Gambusia affinis*, in relation to temperature and ration level: consequences for life history. *Env. Biol. Fish.*, **21**: 45-57.
- WALTERS L. L., LEGNER E.F. 1980. Impact of the desert pupfish, *Cyprinodon macularius*, and *Gambusia affinis* on fauna in pond ecosystems. *Hilgardia*, **48** (3): 1-18.
- WALTON W.E., MULLA M.S. 1991. Integrated control of *Culex tarsalis* larvae using *Bacillus sphaericus* and *Gambusia affinis*: effect on mosquitoes and nontarget organisms in field mesocosms. *Bull. Soc. Vector Ecol.*, **16**: 203-221.
- WOOTEN M.C., SCRIBNER K.T., SMITH M.H., 1988. Genetic variability and systematics of *Gambusia* in the southeastern United States. *Copeia*, 283-289.
- WURTSBAUGH W.A., CECH Jr. J.J. 1983. Growth and activity of juvenile mosquitofish: temperature and ration effects. *Am. Fisheries Soc.*, **112**: 653-660.
- ZANĀEV S.A., MUMINOV M.S. 1983. [The delarvation effectiveness of *Gambusia* in rice fields of the engineering type in the Uzbek SSR] . *Meditinskaya Parazitologiya i parazitarnye Bolezni*, **4**: 74-77.

DEPURAZIONE



Non-filamentous bulking nel trattamento dei reflui di rendering mediante sistemi biologici SBR (Sequencing Batch Reactor).

Sergio Facchini² e Piergiacomo Sarra¹

Riassunto

Viene descritto un caso di non-filamentous bulking su un sistema SBR aerobico-anossico per il trattamento dei reflui di rendering in scala reale. Supponendo che l'eccessiva produzione dei polimeri extracellulari fosse causata da carenze nutrizionali, si è provveduto a correggere il refluo da trattare con ferro e fosforo ottenendo la scomparsa pressoché totale dei microrganismi *Zoogloea*-like.

Il miglioramento dei valori di SVI da 200-300 ml/g a 75-120 ml/g ha consentito il raggiungimento di alte età del fango e quindi una elevata stabilità della nitrificazione biologica.

Introduzione

Uno dei presupposti per la riuscita del trattamento biologico delle acque reflue mediante il processo a fanghi attivi è rappresentato dalle buone caratteristiche strutturali del fiocco, che influenzano direttamente la torbidità dell'effluente ed il grado di sedimentabilità ed ispessibilità del fango stesso. Il rigonfiamento o bulking dei fanghi è in genere dovuto alla eccessiva proliferazione di microrganismi filamentosi (filamentous bulking) e le cause più frequenti di tale anomalia sono da ricondurre a carenze di ossigeno o nutrienti, presenza di solfuri nel refluo, basso pH o bassa concentrazione del substrato solubile biodegradabile come avviene ad esempio nei sistemi di trattamento a flusso continuo completamente miscelati in assenza di selettori^(1,5,6,7). In alcuni casi un elevato SVI (Sludge Volume Index) risulta non correlato con un alto livello di microrganismi filamentosi mentre si osserva una eccessiva presenza di polimeri extracellulari nella

¹ Centro Ricerche Biotecnologiche, Università Cattolica, Cremona.

² Collaborators esterno.

biomassa. Il fango assume una consistenza gelatinosa e le caratteristiche di sedimentabilità e di ispessibilità vengono seriamente compromesse (Viscous bulking o non-filamentous bulking)⁽⁹⁾.

Per evitare la perdita di solidi sospesi con l'effluente è necessario quindi abbassare la concentrazione dei fanghi in vasca di aerazione, con innalzamento dei valori di carico sul fango e diminuzione dell'età del fango, innescando problemi relativi alla corretta conduzione dei processi di rimozione dell'azoto per nitrificazione e denitrificazione.

Questa disfunzione può essere definita come una microstruttura del fiocco non ideale in cui il materiale polimerico che contribuisce alla bioflocculazione è prodotto in modo eccessivo da parte dei microrganismi, i quali si trovano "dispersi" in una massa extracellulare gelatinosa con un elevato grado di idratazione. All'estremo opposto, per ragioni diverse, una scarsa produzione di polimeri extracellulari può portare al fenomeno della crescita dispersa, in cui non si ha bioflocculazione oppure questa non è sufficiente per il mantenimento di una adeguata struttura ed il surnatante del fango presenta alti livelli di cellule batteriche disperse.

La presenza di viscous bulking è evidenziabile dagli alti valori dello SVI (oltre 150 ml/g), dalla consistenza gelatinosa del fango e soprattutto, attraverso l'esame microscopico a contrasto di fase, dalla presenza di estese strutture *Zoogloea*-like di tipo amorfo o digitato con le cellule batteriche disperse in una abbondante massa extracellulare. La definizione dei contorni del fiocco viscoso è possibile con colorazione negativa mediante India Ink Test, in cui si osserva la diffusione delle particelle di carbonio che, essendo incapaci di penetrare lo strato extracellulare, ne indicano orientativamente l'estensione.

In alcune circostanze è possibile il verificarsi di un bulking misto, in cui i microrganismi filamentosi e le strutture *Zoogloea*-like contribuiscono entrambi al deterioramento della struttura. In presenza di viscous bulking è anche possibile avere una intensa formazione di schiuma biologica anche senza microrganismi foam-forming quali *Nocardia* spp. o *Microthrix parvicella*. La matrice extracellulare prodotta dai batteri *Zoogloea*-like è probabilmente da considerare assimi-

labile a materiale capsulare. Attraverso tecniche che prevedono trattamenti termici e precipitazione con acetone o etanolo è possibile studiare la natura chimica dei polimeri, dalla cui idrolisi si forma glucosio, galattosio, fucosio, mannosio, arabinosio, ramnosio, ribosio, acido galatturonico, acido glucuronico ed altri ancora⁽¹²⁾. Gli estratti da colture pure di *Zoogloea ramigera* e da diversi fanghi attivi contengono uno o più dei composti prima elencati.

Per analogia anche la composizione della capsula batterica è piuttosto semplice, essendo in genere costituita da un unico polisaccaride oppure da un polipeptide formato da un solo tipo di aminoacidi, mentre occasionalmente si formano capsule "miste" contenenti due costituenti polimerici diversi⁽¹¹⁾.

Sono note alcune cause in grado di favorire lo sviluppo del non-filamentous bulking, tuttavia le conoscenze su questo fenomeno sono ancora fortemente incomplete in quanto quasi tutti gli studi sul rigonfiamento del fango attivo si riferiscono al filamentous bulking⁽³⁾. La composizione chimica dei reflui ha una sua importanza in quanto la presenza di acidi organici, grassi ed olii permette la crescita dei microrganismi zoogleali⁽³⁾.

Altre possibili cause sono da ricercarsi nell'elevata cinetica di rimozione del substrato organico solubile biodegradabile che favorisce i microrganismi flocc-forming rispetto ai filamentosi. Quindi un eccessivo carico sul fango oppure un troppo spinto effetto selettore, nei sistemi che prevedono un selettore aerobico, possono portare a problemi di questo tipo. Inoltre un influente contenente un insufficiente apporto di alcuni nutrienti oppure una eccessiva crescita di poly-P bacteria (clusters di *Acinetobacter*-like) nei trattamenti per la rimozione biologica del fosforo possono innescare una produzione eccessiva di materiale extracellulare.

Le caratteristiche negative del fiocco viscoso sulla sedimentabilità e sulla ispessibilità dei fanghi non si controllano agevolmente con dosaggi di polimeri, cloro o H₂O₂, contrariamente a quanto in genere avviene con molti tipi di filamentous bulking⁽⁹⁾. Un risultato positivo sul controllo del fango viscoso mediante ozono al dosaggio di 1 g/(Kg MLSS · d) è stato ottenuto su impianto per il trattamento di reflui petrolchimici, ottenendo una riduzione della crescita zoogleale⁽⁹⁾.

Considerando la scarsità di informazioni esistente sul fenomeno, soprattutto relativamente allo studio dei problemi in piena scala, si è ritenuto utile descrivere un caso di non-filamentous bulking, seguito per un periodo di oltre tre anni, su di un sistema SBR (Sequencing Batch Reactor) utilizzando un processo aerobico-anossico per il trattamento dei reflui di rendering in scala reale.

Descrizione del sistema SBR

Materiali e metodi

Il trattamento SBR oggetto di studio è costituito da due vasche di equalizzazione miscelate in cui confluiscono i reflui del condensatore ed alcune acque di lavaggio e da un bacino di 650 m³ utili dove avvengono sequenzialmente, sotto controllo di microprocessore, le fasi aerobiche ed anossiche in cui si ha rispettivamente la nitrificazione ed il metabolismo aerobico eterotrofo nelle prime ed il metabolismo anossico eterotrofo nelle seconde, utilizzando il carbonio interno del refluo da trattare per la denitrificazione dell'azoto nitrico.

Il pH viene controllato mediante pHmetro da processo e dosaggio automatico di NaOH per compensare la perdita di alcalinità dovuta alla nitrificazione e solo in parte coperta dalla produzione di alcalinità dovuta alla denitrificazione e dalla presenza di bicarbonati nel refluo. La temperatura è controllata nel bacino SBR mediante l'utilizzo di scambiatori di calore con recupero dell'energia proveniente dalla condensazione del vapore. In questo modo si mantengono, anche nelle condizioni invernali, temperature di 16-18 °C necessarie per una rimozione spinta dell'azoto. Le metodiche analitiche relative ai parametri chimico-fisici delle acque sono quelle dell'I.R.S.A.-C.N.R.⁽¹⁰⁾ mentre per la determinazione degli acidi volatili è stato seguito il procedimento di ANDERSON e YANG⁽¹³⁾.

L'identificazione dei microrganismi filamentosi, la definizione delle classi di abbondanza e la diagnosi del viscous bulking fanno riferimento al manuale di D. JENKINS⁽⁹⁾ mentre per l'analisi della microfauna sono state utilizzate le tabelle di P. MADONI⁽²⁾. La determinazione della biomassa attiva eterotrofa mediante l'utilizzo di metodi respirometrici è stata effettuata secondo le indicazioni di YOUNG^(14, 15).

Risultati e discussione

Le caratteristiche delle acque reflue in ingresso, il carico giornaliero da trattare ed i principali parametri di processo sono riportati nella tab. I. Il COD è presente soprattutto in forma solubile e risulta costituito in buona parte da acidi volatili. L'azoto si trova quasi interamente nella forma ammoniacale mentre il fosforo ed il ferro indicano forti carenze.

Durante la prima fase dello studio si avevano alti valori di SVI (Fig. 1) dovuti all'eccessiva produzione di materiali extracellulari. Supponendo che questo fosse causato principalmente da carenze nutrizionali, si è provveduto a correggere il refluo da trattare con acido ortofosforico. Il dosaggio è stato iniziato secondo un rapporto COD:P = 100:0,3 (punto A, Fig. 1), immettendo il nutriente in equalizzazione per ottenere

Tab. I - Caratteristiche medie dei reflui da trattare, carico inquinante e parametri di processo.

| <i>Caratteristiche delle acque da trattare (valori medi)</i> | | |
|--|--------------------|------------|
| COD | mg/l | 4.480 |
| BOD ₅ | mg/l | 2.720 |
| Solidi sospesi | mg/l | 220 |
| Azoto ammoniacale | mg/l | 800 |
| Azoto totale (TKN) | mg/l | 810 |
| Azoto nitroso | mg/l | 0 |
| Azoto nitrico | mg/l | 0 |
| Fosforo totale | mg/l | 0,3 |
| Cloruri | mg/l | 30 |
| pH | | 8,5-9,0 |
| Estratto eterico | mg/l | 110 |
| Ferro | mg/l | < 0,1 |
| Acidi volatili | 70-80% COD | |
| <i>Portata idraulica media</i> | m ³ /d | 48 |
| <i>Carico organico giornaliero</i> | Kg COD /d | 215 |
| <i>Carico in azoto giornaliero</i> | Kg TKN /d | 39 |
| <i>Carico fango (Cf)</i> | Kg COD/(Kg MLSS·d) | 0,12-0,025 |
| <i>Conc. MLSS</i> | g/l | 2,8-13 |
| <i>pH (miscela aerata)</i> | | 7,0-7,5 |
| <i>O₂ disciolto (fase aerobica)</i> | mg/l | 1-4 |
| <i>O₂ disciolto (fase anossica)</i> | mg/l | 0 |
| <i>Temper. (misc. aerata) esc. annuale</i> | °C | 16-26 |

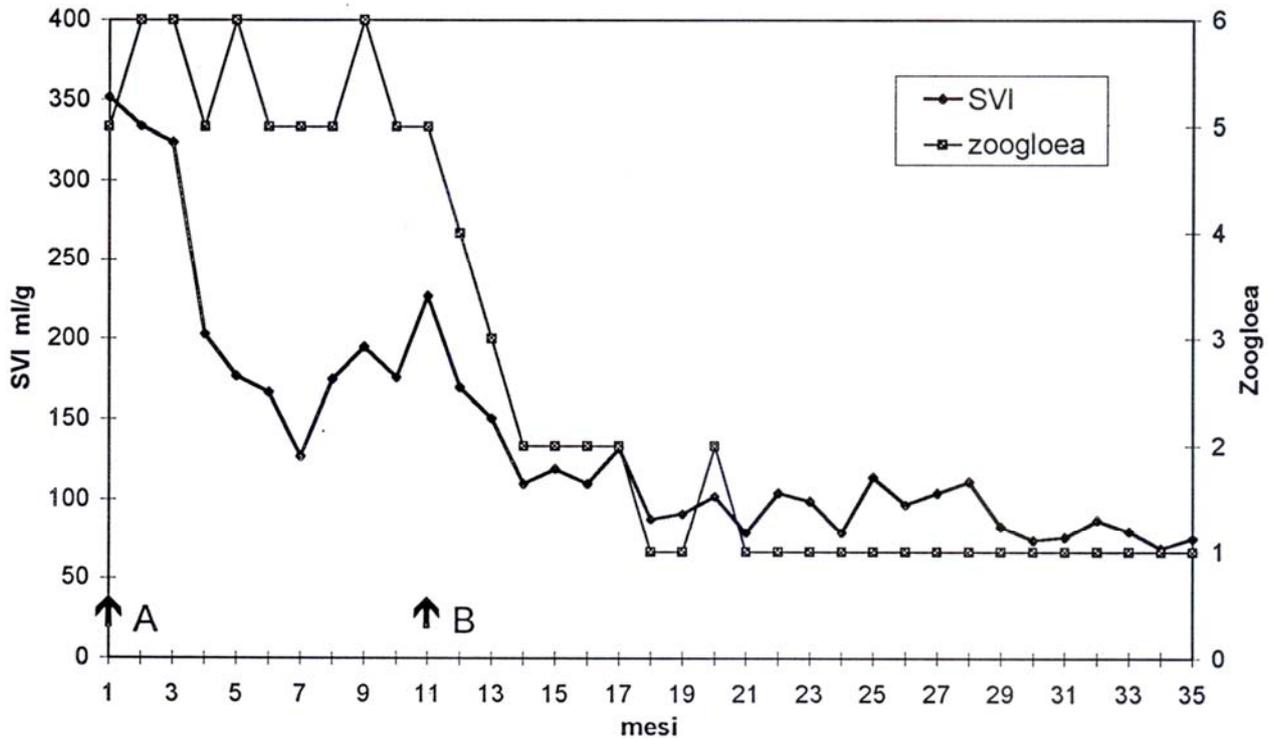


Fig. 1 - Andamento del SVI (Sludge Volume Index, ml/g) e dei microrganismi *Zoogloea*-like durante la sperimentazione (classi di abbondanza: 0. Assenti; 1. Scarse; 2. Alcune; 3. Comuni; 4. Molto comuni; 5. Abbondanti; 6. Eccessive. A. Inizio dosaggio fosforo. B. Inizio dosaggio ferro e fosforo.

una composizione costante del refluo in alimentazione e favorire una crescita bilanciata della biomassa⁽⁴⁾.

Nel primo periodo di osservazione l'azoto ammoniacale indicava spesso valori elevati (Fig. 2) a causa delle basse concentrazioni di MLSS (Mixed Liquor Suspended Solids) che si riuscivano ad ottenere. In questo periodo è risultato utile anche l'inoculo di fanghi nitrificanti con buone caratteristiche di sedimentabilità. Dopo circa 11 mesi di sperimentazione con il solo dosaggio del fosforo, i valori di SVI erano prossimi a 200 ml/g ed il livello di strutture *Zoogloea*-like molto alto.

Si è quindi iniziato il dosaggio di ferro (punto B. Fig. 1) secondo un rapporto COD:Fe = 100:0,4 ed è stato aumentato il fosforo a COD:P = 100:0,5. Lo SVI si è progressivamente ridotto da valori di circa 200 ml/g a meno di 100 ml/g, con la scomparsa delle caratteristiche viscose del fango ed in parallelo l'esame microscopico ha indicato una continua diminuzione delle strutture *Zoogloea*-like fino alla loro quasi totale

eliminazione. Sono stati necessari alcuni mesi per osservare cambiamenti radicali nella microstruttura del fiocco, per effetto degli alti valori dell'età del fango e quindi del lento ricambio della biomassa, tuttavia i risultati raggiunti sembrano presentare una stabilità elevata in quanto si sono mantenuti costanti per un periodo di controllo di quasi due anni nei quali i nutrienti sono stati dosati regolarmente.

I bassi valori di SVI hanno permesso alte concentrazioni di MLSS e bassi carichi sul fango, consentendo efficienza e stabilità nella rimozione dell'azoto. I batteri filamentosi presenti nella biocenosi sono stati identificati con preparati a fresco mediante microscopia a contrasto di fase e con colorazioni Gram, Neisser ed S-test⁽⁴⁾.

Durante tutto il periodo di osservazione è stato possibile evidenziare la costante presenza di Type 0092 mentre Type 0041, Type 0675 e *Nostocoida limicola* sono apparsi nettamente secondari. I microrganismi filamentosi rientravano normalmente nella

classe II di frequenza⁽¹⁾ e non hanno mai creato bulking dovuto ad una loro crescita eccessiva. La presenza di Type 0092 può essere spiegata considerando la presenza nel processo di fasi anossiche, condizioni che stimolano lo sviluppo di tale microrganismo.

La microfauna non ha mostrato variazioni di rilievo tra il periodo con alto SVI e le fasi successive. Si possono indicare come dominanti i Ciliati Ipotrichi (*Aspidisca cicada*) e nettamente secondari i Ciliati Olotrichi (*Trachelophyllum pusillum*, *Plagiocampa*

metabolica, *Chilodonella uncinata* e sporadici *Cyclidium glaucoma*), i Ciliati Tentacoliferi (*Acineta* sp.), i Ciliati Peritrichi (*Epistylis* sp.) e scarsi Flagellati. Tra i Metazoi sono sempre risultati abbondanti i Rotiferi.

La microfauna indica quindi una elevata età del fango con condizioni di ossigenazione mediamente buone, parametri del tutto confermati dalla rilevazione diretta dei parametri di processo.

La biomassa attiva eterotrofa è risultata il 9% dei VMLSS (Volatile Mixed Liquor Suspended Solids) (VMLSS = 81-85% MLSS). Le cinetiche di nitrificazione hanno fornito valori medi di 1,30 mg N-NH₃ ox/(g VMLSS · h) a 20°C e pH 8,0 con N-NH₃ e O₂ non limitanti. Le cinetiche di denitrificazione 1,54 mg N-NO₃ rid./(g VMLSS · h) a 20°C, pH 8,0 ed N-NO₃ e substrato organico non limitanti. I rendimenti depurativi medi relativi agli ultimi due anni di controllo sono risultati del 98,7% per il COD, del 99,9% per l'azoto ammoniacale e del 98,9% per l'azoto complessivo.

In conclusione si ritiene che la causa del non-filamentous bulking osservato sia rappresentata dalla composizione chimica del refluo da trattare, in particolare dalle carenze in ferro e fosforo.

Le caratteristiche della frazione carboniosa, ricca in acidi volatili, non hanno avuto in questo caso effetto determinante quando non associate a carenze nutrizionali. *Zoogloea ramigera* è una specie in grado di accumulare sostanze organiche sotto forma di granuli intracellulari di poli-β-idrossibutirrato⁽¹¹⁾.

È probabile che i microrganismi *Zoogloea*-like, durante la crescita limitata da scarsità di nutrienti, utilizzino parte del substrato organico in eccesso per la biosintesi di polimeri extracellulari oltre che per il deposito intracellulare di PHB. La correzione dei fattori limitanti aumenta inoltre la competitività di altri gruppi microbici portando ad un nuovo equilibrio nella composizione biocenotica dei fanghi.

BIBLIOGRAFIA

I. JENKINS D., RICHARD M.G., DAIGGER G.T. (1986). Manual on the causes and control of activated sludge bulking and foaming. Water Research Commission, Pretoria.

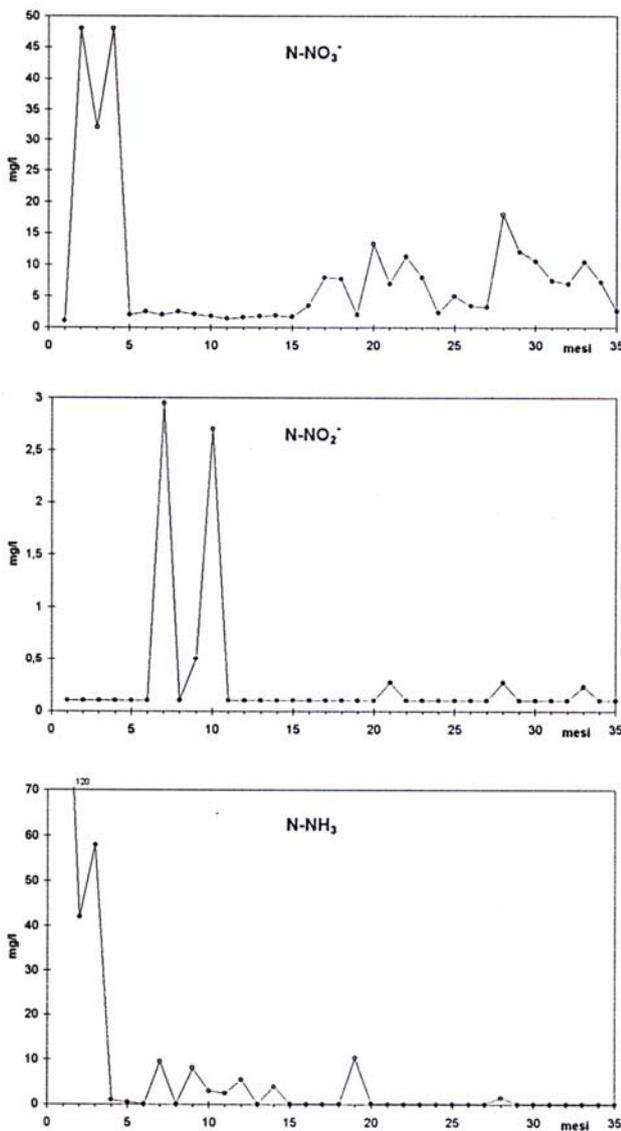


Fig. 2 - Concentrazione dell'azoto ammoniacale, nitroso e nitrico durante la sperimentazione (mg/l).

2. MADONI P. (1988). I Protozoi Ciliati nel controllo di efficienza dei fanghi attivi. *Centro Italiano Studi di Biologia Ambientale*, Reggio Emilia.
3. NOVAK L., LARREA L., WANNER J., GARCIA-HIERAS J.L. (1993). Non-filamentous activated sludge bulking in a laboratory scale system. *Water Res.*, **27** (8): 1339-1346.
4. PIPES W.O. (1969). Types of activated sludge which separate poorly. *J. Wat. Poll. Control Fed.*, **41**: 714-728.
5. VAN NIEKERK A.M., JENKINS D., RICHARD M.G. (1987). The competitive growth of *Zoogloea ramigera* and Type 021N in activated sludge and pure culture. A model for low F:M bulking. *J. Wat. Poll. Control Fed.*, **59** (5): 262-273.
6. CHIESA S.C., IRVINE R.L. (1985). Growth and control of filamentous microbes in activated sludge: an integrated hypothesis. *Water Res.*, **19** (4): 471-479.
7. SHAO Y.-J., JENKINS D. (1989). The use of anoxic selectors for the control of low F/M activated sludge bulking. *Wat. Sci. Tech.*, **21**: 609-619.
8. CHUDOBA J. (1991). Operational experience with an anoxic selector treating rendering-plant wastewaters. *Wat. Sci. Tech.*, **24** (7): 1-7.
9. VAN LEEUWEN J. (1989). Ozonation for non-filamentous bulking control in an activated sludge treating fuel synthesis wastewater. *Water S.A.*, **15**: 127-132.
10. I.R.S.A. (1976). Metodi analitici per le acque. Vol. I-II. C.N.R., Roma.
11. STANIER R.Y., DOUDOROFF M., ADELBERG E.A. (1975). Il mondo dei microrganismi. *Zanichelli*, Bologna.
12. PIKE E.B. (1975). Aerobic Bacteria. In "Ecological aspects of used-water treatment", Curds C.R., Hawkes H.A., *Academic Press*, London.
13. ANDERSON G.K., YANG G. (1992). Determination of bicarbonate and total volatile acid concentration in anaerobic digesters using a simple titration. *Wat. Environ. Res.*, **64**: 53-59.
14. VISMARA R., BUTELLI P., COMOLLI P. (1991). La regolazione dei processi biologici per impianti a fanghi attivi. *Quad. Ing. Amb.*, N° 13, Milano.
15. YOUNG J.C. (1981). Specific oxygen demand as an operating parameter for activated sludge process. *Wat. Sci. Technol.*, **13**: 397-403.

ACCADEMIA DI STUDI MEDITERRANEI
AGRIGENTO

Premio internazionale «Empedocle» per le scienze umane

in memoria di Aurelio Peccei

V edizione 1997 - Ecologia

Bando di concorso

L'Accademia di Studi Mediterranei bandisce un concorso per l'assegnazione del Premio «Empedocle» per le scienze umane, in memoria di Aurelio Peccei (V edizione 1997 - Ecologia).

Il concorso è riservato a studiosi di età non superiore ai 35 anni che abbiano prodotto lavori su: **«La crisi ambientale del Mar Mediterraneo - Analisi delle possibili soluzioni connesse allo sviluppo sostenibile in un quadro di relazioni internazionali»**.

La monografia, per le questioni trattate, per l'indagine condotta, deve presentare i caratteri dell'originalità e della completezza.

Possono partecipare al concorso giovani studiosi, laureati col massimo dei voti.

Al vincitore del concorso, il giorno **30 novembre 1997 in Agrigento**, nell'ambito di una cerimonia solenne, verrà conferito il premio, la cui dotazione economica è di lire cinque milioni.

Le decisioni della commissione sono insindacabili. Per partecipare al concorso occorrerà far pervenire la monografia in 6 copie, direttamente o a mezzo posta in plico raccomandato, all'*Accademia di Studi Mediterranei, Istituto Gioeni, Via Oblati n. 96 - 92100 Agrigento*, entro e non oltre la 2^a decade di ottobre 1997, unitamente alla seguente documentazione:

- dichiarazione sostitutiva del certificato di nascita e residenza;
- certificato di laurea con votazione finale;
- ogni altra eventuale documentazione ritenuta utile ai fini della valutazione della Commissione giudicatrice.

I lavori dovranno essere presentati in lingua italiana.

Sono esclusi dalla partecipazione al concorso i docenti universitari ordinari e associati.

Le monografie non saranno restituite.

AMGA**AZIENDA MEDITERRANEA GAS E ACQUA S.P.A.****European Training Course on Water Quality Measurements****ANALYTICAL METHODS
FOR ALGAE, PROTOZOA,
HELMINTS IN FRESH WATER****Genoa, Italy****November 10-14, 1997****Course objectives**

This course to be developed in Genoa, Italy, is one of a total of five European Training Courses coordinated by TECHWARE and approved by EC-DG XII (Standards, Measurements & Testing).

The aim of this course is to give:

- An overview on the state of the art of determination methods of Algae, Protozoa and Helminths in fresh water and in distributed water.
- An opportunity to be confronted with some practical aspects related to sampling, concentration and identification techniques.
- An opportunity to exchange knowledge between teachers and participants of different European countries.

Topics to be covered

- Drinking water policy and sanitary issues
- Monitoring strategies
- Sampling, storage and detection of Algae, Protozoa, Helminths
- Viability of Giardia and Cryptosporidium
- Immunofluorescence assay methods
- Polymerase chain reaction
- Quality assurance in laboratory practice

Target audience

This course is intended for researchers, scientific staff from industry, state and commercial laboratories, as well as for undergraduate and graduate students.

To ensure the efficiency of the experimental part of the course, the number of participants must be limited to 25. Candidates can send their CVs and explain their reasons for participating, as well as their expectations from the course, so that the selection procedure can be facilitated. The final selection will be made taking into consideration the international character of the course.

Language

The official languages of the course are English and Italian. Simultaneous translation will be provided.

Per informazioni:

*AMGA S.p.A.
D. Bergamotti
Via SS. Giacomo e Filippo, 7
16100 Genoa - Italy
Tel. 010 8343235
Fax 010 8343327
E-mail: amga01@mbox.ulisse.it*