

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 sindromie 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 cianofite costituiscono problemi sanitari per il tratto respiratorio (*Trichodesmium erytraeum*) 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 erytraeum*, una cianofite 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 cianofite 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 cianofite, ma inclusero anche clorofite e criptofite dimostrando che i composti allergenici non sono esclusivi delle alghe blu. Le criptofite 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 cianofite (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 Pernambuco (Brasile) (CARMICHAEL, 1996). Nel centro di emodialisi di Caruaru (Pernambuco, 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 cianofitiche (*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 cianofitiche. 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 cianofitiche 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 cianoficee 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*, *Hapalosyphon*, *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 cianoficee.

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 cianoficee. Il veicolo della patologie 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 di 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 cianofite fa riscontro il declino dei grandi cladoceri e di altri zooplantoni (VASCONCELOS, 1990) per i quali le cianofite 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'epatopancia 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 cianofite tossiche, ma assume caratteri organolettici sgraditi che limitano il consumo delle sue carni.

Le cianofite 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 cianofite 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 cianofite.

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. Chermichael (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., JOPOLO 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, Geneve 160.
- 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.

MCELHENNY 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.