

# **FIORITURE DI CIANOBATTERI TOSSICI IN ACQUE DOLCI: UN APPROCCIO INTEGRATO PER LA VALUTAZIONE E LA GESTIONE DEL RISCHIO**

Simona Scardala (a), Mara Stefanelli (a), Susanna Vichi (b)

(a) *Reparto Qualità degli ambienti acquatici e acque di balneazione, Dipartimento di Ambiente e Connessa Prevenzione Primaria, Istituto Superiore di Sanità, Roma*

(b) *Reparto Meccanismi di tossicità, Dipartimento di Ambiente e Connessa Prevenzione Primaria, Istituto Superiore di Sanità, Roma*

## **Introduzione**

I cianobatteri sono batteri Gram negativi e fotosintetici la cui origine risale a circa 2,5 miliardi di anni fa. Hanno caratteristiche morfologiche diverse con forme unicellulari, coloniali e filamentose.

Distribuiti in tutto il pianeta, sono capaci di vivere in habitat molto diversi, anche se prediligono gli ambienti acquatici, in particolare i laghi naturali e gli invasi artificiali, dove sono naturalmente presenti.

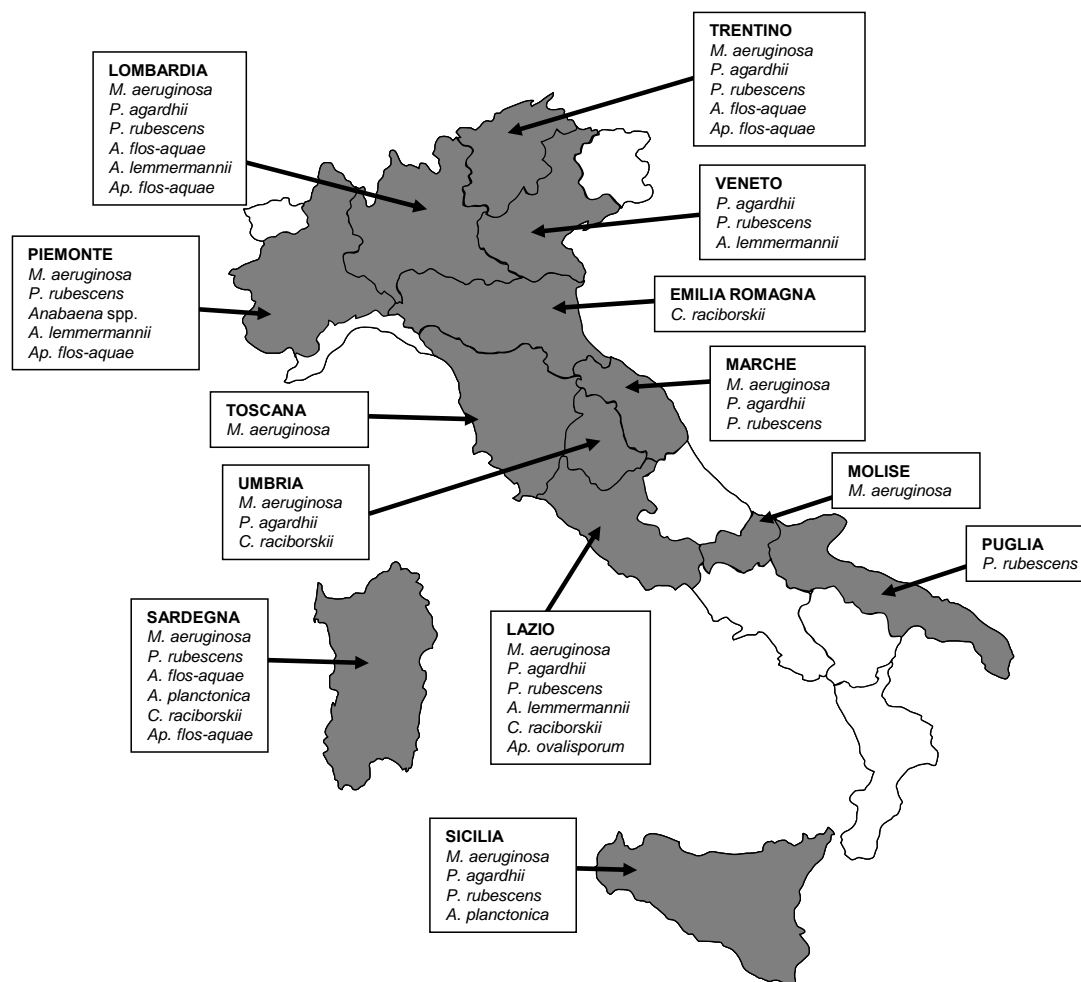
La crescente eutrofizzazione, dovuta all'aumento delle immissioni di nutrienti di origine antropica ha favorito la loro crescita anche a livelli elevati, con conseguente formazione di fioriture.

Il problema sanitario legato alla presenza dei cianobatteri è dovuto alla loro capacità di produrre sostanze tossiche, dette cianotossine, alle quali l'uomo può essere esposto attraverso diverse vie (Funari & Testai, 2008). La principale via di esposizione umana è la via orale mediante ingestione di alimenti, supplementi alimentari, acque potabili e accidentalmente acque ad uso ricreativo, che risultano contaminate. L'esposizione a cianotossine può avvenire anche per via cutanea e inalatoria, durante attività ricreative e professionali in acque contaminate e, non meno importante, per via parenterale nel caso in cui venga usata acqua contaminata per emodialisi.

La stessa specie di cianobatteri può essere associata a fioriture tossiche e non tossiche (Kurmayer *et al.*, 2002) e può produrre una o più tossine che possono essere classificate in diverse categorie in base agli effetti osservati sugli organi o tessuti bersaglio (Codd *et al.*, 2005). Queste includono:

- epatotossine (oltre 80 varianti di microcistine, 6 varianti note di nodularine)
- neurotossine (anatotossina-a, omoanatotossina-a, anatotossina-a(s), 20 varianti note di saxitossine)
- citotossine (cilindrospermopsina)
- tossine irritanti e gastrointestinali
- altre tossine con profilo tossicologico parziale (microviridina J e la  $\beta$ -N-metilamino-L-alanina) (Rohrlach *et al.*, 2003; Cox *et al.*, 2005)

La presenza di fioriture di cianobatteri è stata documentata in tutto il mondo e anche in Italia le segnalazioni sono numerose. Alcune tra le specie di cianobatteri tossici di cui si hanno segnalazioni nel nostro Paese sono *Microcystis aeruginosa*, *Planktothrix rubescens*, *Planktothrix agardhii*, *Cylindrospermopsis raciborskii*, *Anabaena flos-aquae*, *Anabaena lemmermannii*, *Anabaena planctonica*, *Aphanizomenon ovalisporum* e *Aphanizomenon flos-aquae* (Figura 1).



**Figura 1. Distribuzione dei cianobatteri nelle varie Regioni italiane**

La potenziale tossicità dei cianobatteri e il possibile impatto sanitario hanno portato ad un netto aumento dei piani di monitoraggio, la maggior parte dei quali prevede la sola determinazione della densità cellulare attraverso la conta dei cianobatteri mediante osservazione delle cellule al microscopio. È però da tenere in considerazione che in una specie non tutti gli individui sono tossici (la produzione della tossina dipende dallo specifico make-up genetico) e che il rapporto tra individui tossici e non tossici varia nel tempo con dinamiche ancora non chiarite. La sola densità cellulare non fornisce quindi informazioni sufficienti su quella che è la reale quantità di cianotossine.

## Obiettivo

L'obiettivo degli studi effettuati è stato quindi quello di capire le relazioni che intercorrono tra le condizioni ambientali, le fioriture e la tossicità dei cianobatteri al fine di poter identificare dei parametri cruciali da utilizzare per la pianificazione di piani di monitoraggio e per la

valutazione del rischio. Per fare ciò si è deciso di applicare un approccio integrato che prendesse in considerazione le caratteristiche chimico-fisiche del corpo idrico in esame, la dinamica spaziale e temporale della popolazione cianobatterica, il ruolo della comunità batterica nel riciclo dei nutrienti come possibile fattore di sostegno per la fioritura, i livelli di cianotossine e l'identificazione dei geni responsabili della produzione di tossina e la loro quantificazione.

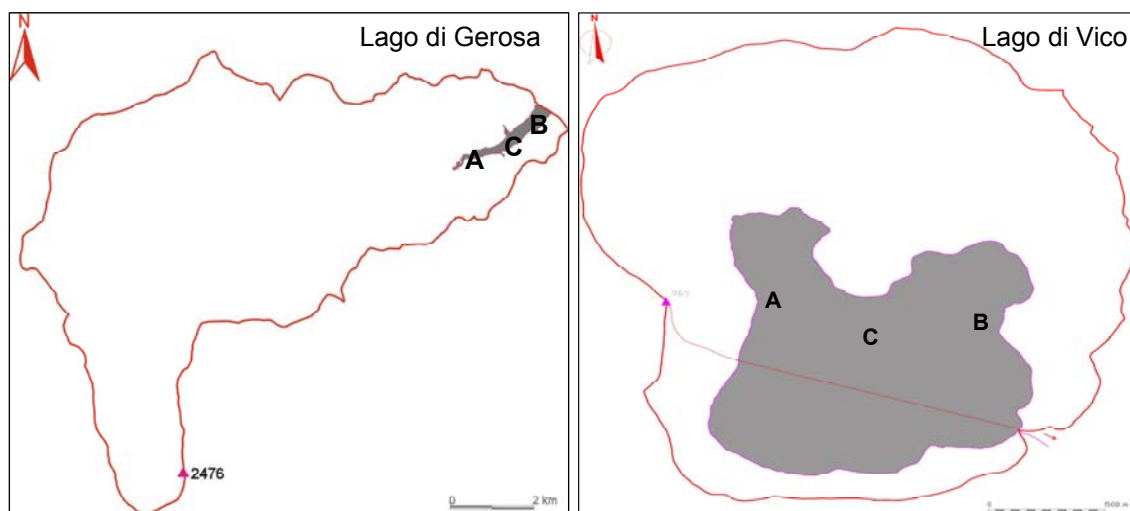
Questo tipo di approccio è stato applicato a due laghi del Centro Italia: il Lago di Gerosa, un piccolo bacino artificiale usato per attività ricreative, come riserva di acqua per irrigazione e potenzialmente come approvvigionamento di acqua potabile (Manganelli *et al.*, 2010); e il Lago di Vico, un piccolo lago vulcanico, usato per attività ricreative e come riserva di acqua potabile. I due laghi, anche se presentano caratteristiche ecologiche molto diverse, sono interessati da fenomeni di fioriture di *Planktothrix rubescens*, cianobatterio tossico caratteristico di climi temperati. *P. rubescens* è una specie comune in corpi d'acqua profondi, stratificati, oligotrofici o mesotrofici. Ben adattata a crescere in condizioni di basse radiazioni luminose, durante l'estate è in grado di stratificare nel metalimnion dove maggiore è la disponibilità di nutrienti. Le sue fioriture sono ben visibili di colore rosso porpora e si verificano prevalentemente in autunno-inverno. *P. rubescens* può produrre microcistine (Sivonen & Jones, 1999), note epatotossine.

## Materiali e metodi

Per il raggiungimento del nostro obiettivo è stato predisposto un piano di campionamento rappresentativo dei due laghi (Figura 2) (CNR-IRSA-ISE, 2004) (Tabella 1).

I campionamenti sono stati effettuati mensilmente: da ottobre 2006 a giugno 2007 per il Lago di Gerosa e da febbraio 2009 a dicembre 2010 per il Lago di Vico, per il quale durante il periodo di fioritura (da novembre 2009 ad aprile 2010) sono stati eseguiti prelievi settimanali.

10 L di campione per ogni sito sono stati prelevati attraverso l'uso di campionatori Niskin, conservati al buio in contenitori di policarbonato, precedentemente lavati in acido, e mantenuti alla temperatura di campionamento fino all'analisi.



**Figura 2. Lago di Gerosa e Lago di Vico:**  
A, B, C sono i punti di campionamento

Tabella 1. Stazioni di prelievo e piano di campionamento per i due laghi

Località	Stazione	Punto di prelievo	Profondità di prelievo (m)
Lago di Gerosa	A	Immissario	0,5
	B	Emissario	0,5
	C	Centro lago	0,5
			25
			50
Lago di Vico	A	Lido Fogliano	0,5
	B	Bella Venere	0,5
	C	Centro lago	1
			20
			40

## Parametri fisico-chimici e analisi dei nutrienti

Per le analisi dei nutrienti (P e N totale, P-PO<sub>4</sub>, N-NO<sub>3</sub>, N-NO<sub>2</sub>, N-NH<sub>4</sub>), sono stati utilizzati i metodi standard (APAT & IRSA-CNR, 2003) mentre per la determinazione della clorofilla-a è stato utilizzato il metodo di estrazione con etanolo e successiva determinazione in fluorescenza (Jespersen & Christoffersen, 1987). I campioni d'acqua sono stati filtrati su filtri GF/F (porosità nominale 0,7 µm) (Whatman). I filtri sono stati posti in provette di vetro per fluorimetro e lasciati al buio per 24 ore in 6 mL di etanolo al 96%; le letture sono state effettuate con un fluorimetro TURNER 10-AU-005, alla lunghezza d'onda di 450/570 (ex/em).

## Densità di cianobatteri

La conta di *Planktothrix rubescens* è stata effettuata mediante microscopio ad epifluorescenza. Cinque-dieci mL di campione fissati in formaldeide (concentrazione finale 4%) sono stati filtrati su filtri neri in polycarbonato da 5 µm (25 mm diametro) (Whatman). I filamenti sono stati contati in autofluorescenza (450-490 nm) (Olympus BX51). Il numero delle cellule per filamento è stato determinato come media del numero di cellule contate su almeno 50 filamenti.

L'analisi della restante comunità di cianobatteri è stata effettuata mediante l'utilizzo di pozzetti di sedimentazione (metodo Utermhöl) dopo fissazione del campione in formaldeide (concentrazione finale 4%). In presenza di comunità cianobatteriche complesse, come nel caso del Lago di Vico, gli individui appartenenti a specie considerate potenzialmente tossiche (*Limnolthrix redekei*, *Synechococcus* sp.) sono stati isolati e mantenuti in laboratorio in condizioni idonee alla crescita.

## Densità delle cellule batteriche e misure di attività ectoenzimatiche

I batteri sono stati contati in epifluorescenza, dopo fissazione con formaldeide (concentrazione finale 4%) e colorazione con DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindolo, concentrazione finale 1 µg/mL). Cinque mL di campione fissati e colorati sono stati filtrati su filtro da 0,22 µm nero in

policarbonato (diametro 25 mm) (Whatmann). Sono stati contati un minimo di 30 campi, per un numero minimo di 300 cellule, ad un ingrandimento di 1000x, con microscopio ad epifluorescenza (Olympus BX51). Per la misura delle attività ectoenzimatiche (leucina-aminopeptidasi, lipasi e fosfatasi alcalina) sono stati utilizzati substrati legati covalentemente ad un fluorocromo (7-amino-4-metilcumarine o AMC, e metil-umbelliferone o MUF) che diventa fluorescente dopo scissione enzimatica del complesso molecolare: la cinetica dell'incremento della fluorescenza è una misura indiretta dall'attività enzimatica (Hoppe, 1983). I risultati sono espressi in AMC o MUF L<sup>-1</sup>h<sup>-1</sup> dopo lettura di una curva di calibrazione con MUF e AMC. I saggi sono stati effettuati in piastre sterili da 96 e 24 pozzetti (Costar, USA), con un fluorimetro modello Wallac Victor<sub>2</sub>, PerkinElmer, alla lunghezza d'onda di 355/460 (ex/em).

## Analisi delle cianotossine

Sui campioni pervenuti in laboratorio è stata determinata sia la concentrazione di microcistine disciolte (extracellulare) (MC-Dis) che quella totale (extracellulare+intracellulare) (MC-Tot). All'arrivo in laboratorio i campioni sono stati separati in due aliquote, la prima, utilizzata per la determinazione delle MC-Dis, è stata immediatamente filtrata mentre la seconda, utilizzata per la determinazione delle MC-Tot è stata sottoposta a due cicli di congelamento/scongelo per causare la lisi cellulare e il conseguente rilascio in acqua delle cianotossine. I campioni così trattati sono stati quindi processati tramite Solid Phase Extraction (SPE) con piccole modifiche rispetto al metodo proposto da Lawton *et al.*, (1994) e successivamente analizzati mediante cromatografia liquida accoppiata ad uno spettrometro di massa tandem (*Liquid Chromatography-tandem Mass Spectrometry*, LC-MS/MS) utilizzato nella modalità di acquisizione *Multiple Reaction Monitoring* (MRM). Lo strumento è stato settato per la ricerca dei seguenti congeneri per i quali ad oggi è disponibile in commercio lo standard: MC-LR, -dem-LR, -RR, dem-RR, -LF, -LW, -LA, -YR.

Per il metodo applicato è stato calcolato un limite di quantificazione (*Limit Of Quantification*, LOQ) compreso tra 2 ng/L (MC-RR) e 9 ng/L (MC-LW).

Sui campioni del Lago di Gerosa è stata effettuata anche l'analisi mediante metodi immunoenzimatici per testarne l'efficacia come metodo di screening rispetto all'analisi in LC-MS/MS. Per tali analisi i campioni, dopo la lisi cellulare, sono stati filtrati su filtri Sterivex da 0,2 µm. Il filtrato è stato analizzato con kit ENVIROLOGIX, che riporta un LOD di 0,147 ppb, seguendo le istruzioni del produttore.

## Ricerca e quantificazione dei genotipi tossici

Per l'analisi molecolare, un volume di campione pari a 250-500 mL è stato filtrato su membrane Supor 0,2 µm e congelato a -20°C. Le cellule raccolte e risospese in tampone PBS sono state centrifugate in modo da ottenere un pellet, sottoposto a estrazione del DNA. La concentrazione e la purezza (determinata come rapporto A260/A280) del materiale genomico estratto sono state verificate mediante biofotometro.

L'identificazione dei cianobatteri appartenenti a *Planktothrix* è stata ottenuta mediante la ricerca di specifiche sequenze marker diagnostiche, in particolare lo spaziatore intergenico dell'operone Ficocianina (PC-IGS) e la regione rDNA16S. La presenza di individui tossici è stata testata mediante l'amplificazione all'interno dell'operone *mcy* (geni *mcyB* e *mcyE*), coinvolto nella produzione delle microcistine attraverso un meccanismo di sintesi peptidica non-

ribosomale ottenuta per mezzo di grandi complessi a struttura modulare, le peptide sintetasi non ribosomali (NRPSs). La conferma del genere di appartenenza delle cellule, sfruttando la regione PC-IGS e la potenziale capacità di produrre microcistine ricercando la presenza del marcatore di tossicità *mcyB*, è stata preliminarmente testata con analisi qualitativa mediante PCR e visualizzazione del prodotto di amplificazione su gel di agarosio 2%, secondo il metodo descritto da Kurmayer *et al.* (2004).

Nel caso del Lago di Vico, caratterizzato da una comunità cianobatterica eterogenea, l'analisi molecolare è stata utilizzata anche per confermare la specie di appartenenza di alcune forme unicellulari ritrovate nei campioni prelevati insieme a *P. rubescens*. Il metodo impiegato (Mühling *et al.*, 2005) permette di rilevare in un primo step la presenza di cianobatteri appartenenti a *Synechococcus*, *Prochlorococcus* e altre forme eterotrofe, sfruttando l'amplificazione di una regione all'interno del gene *rpoC1*. Il prodotto ottenuto sottoposto a una seconda PCR utilizzando dei primers interni discriminanti specifici è in grado di rilevare la presenza di cellule appartenenti a *Synechococcus*. Sono tuttora in corso studi volti all'identificazione molecolare di cellule appartenenti a *L. redekeii* potenzialmente in grado di produrre microcistine.

La quantificazione degli individui tossici (*mcyB* positivi) rispetto alla popolazione totale di *Planktothrix* (PC-IGS o 16S rDNA positivi) è stata realizzata mediante Taq Nuclease Assay (TNA). Le condizioni sperimentali, i primers e i probes utilizzati sono descritti da Kurmayer *et al.* (2004) e Ostermaier e Kurmayer (2009). Il saggio prevede, per ciascun target, l'utilizzo di una coppia di primers e una sonda TaqMan che è marcata con un fluorocromo reporter (FAM) all'estremo 5' e un quencher (TAMRA) al 3'. La quantificazione è stata effettuata sulla base di curve standard preliminarmente costruite, utilizzando diluizioni seriali di DNA a concentrazione nota (espressa come equivalenti di cellule) estratto da colture di *P. rubescens* CCAP 1460/3 e CCAP 1460/10. Le efficienze di qPCR per tutti i geni testati (PC-IGS, 16S rDNA e *mcyB*) erano comprese tra 95 e 99%. Ogni campione è stato analizzato in triplicato.

L'amplificazione del marcatore tassonomico (PC-IGS o 16S rDNA) e di tossicità (*mcyB*) è stata condotta simultaneamente in pozzetti separati. La composizione della comunità di *Planktothrix* in termini di cellule tossiche e non tossiche è stata misurata quantificando il numero di individui che riconoscono il marcatore di tossicità *mcyB* tra tutti quelli in grado di reagire con la regione PC-IGS/16S rDNA. La frazione di individui tossici all'interno della comunità *Planktothrix* è stata espressa come il rapporto *mcyB*/PC-IGS o *mcyB*/16S rDNA.

Le curve standard hanno mostrato per entrambi i marcatori scelti PC-IGS/16S rDNA e *mcyB* una relazione altamente significativa tra la concentrazione di DNA inizialmente presente (in termini di equivalenti di cellule) e i Ct. In ciascun caso, per entrambi i marcatori e per tutte le diluizioni, il numero di cellule stimato attraverso TNA su scala logaritmica correlava sempre con il numero di cellule inizialmente presenti contate al microscopio.

## Risultati e discussione

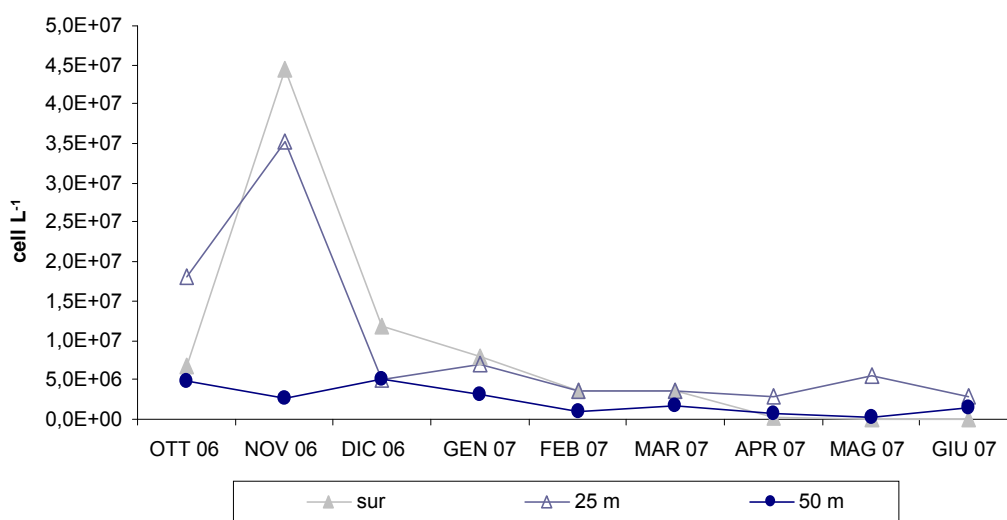
Dall'analisi dei dati risulta che sul Lago di Gerosa l'impatto antropico è modesto e infatti sia le concentrazioni dei nutrienti che quelle della clorofilla-a sono tipiche di un lago profondo oligotrofico (Quiros, 2003). Sul Lago di Vico, al contrario, l'impatto antropico è maggiore come dimostrato dai valori sia dei nutrienti che della clorofilla-a, tipici di un lago eutrofico (Legnani *et al.*, 2005; Jacquet *et al.*, 2005) (Tabella 2). Le concentrazioni più alte di nutrienti si riscontrano lungo la colonna alla profondità di -40 m, dove maggiore è l'effetto di rilascio dai sedimenti.

**Tabella 2. Stato trofico dei due laghi (valori massimi e minimi per ogni lago) ( $\mu\text{g/L}$ )**

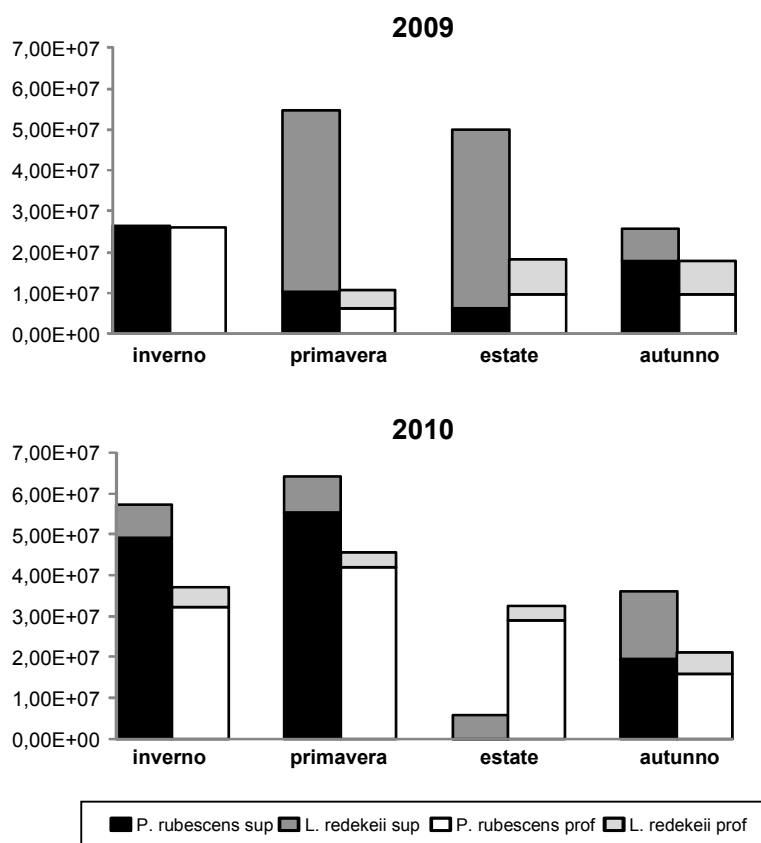
Indicatori dello stato trofico	Lago di Gerosa	Lago di Vico
Fosforo totale	2-24	2-400
Azoto inorganico	2-1404	33-2037
Clorofilla-a	0,3-6,20	1,16-26,73

Nel Lago di Gerosa *P. rubescens* è l'unico cianobatterio identificato sia morfologicamente che attraverso l'analisi molecolare qualitativa. Non è mai stato trovato nell'immissario mentre nell'emissario le sue densità sono sempre risultate molto più basse rispetto a quelle riscontrate lungo la colonna d'acqua.

La colonna d'acqua presenta un unico picco cellulare durante la fioritura invernale (novembre 2006), di  $4,4 \times 10^7$  cell/L. Dal mese di dicembre la fioritura inizia gradualmente a diminuire, fino a scomparire in estate dalla superficie, restando però costantemente presente in profondità a concentrazioni significative (Figura 3).

**Figura 3. Abbondanza e dinamica di *P. rubescens* nel Lago di Gerosa**

Nel Lago di Vico invece *P. rubescens* è molto dinamica e soggetta a variazioni sia stagionali che annuali accentuate, con un tendente aumento della sua abbondanza e un prolungarsi dei periodi di fioritura (Figura 4). È interessante notare come nei mesi estivi le densità cellulari nei campioni superficiali diminuiscano, talvolta fino a scomparire, andandosi a posizionare lungo la colonna d'acqua. *P. rubescens* risulta essere il cianobatterio dominante, ma la comunità di cianobatteri si presenta molto più complessa per la presenza sia di picocianobatteri (*Synechococcus* sp.) che di altre specie filamentose potenzialmente produttrici di microcistine (*Limnothrix redekei*) (Gkelis *et al.*, 2001). Da tenere presente che le conte delle densità cellulari per la specie *L. redekei* sono state effettuate a partire dalla primavera del 2009, e non si hanno dati pregressi né segnalazioni della sua presenza in studi precedenti. L'identificazione morfologica di alcune forme unicellulari descritte nel Lago di Vico è stata confermata anche con specifiche analisi molecolari.



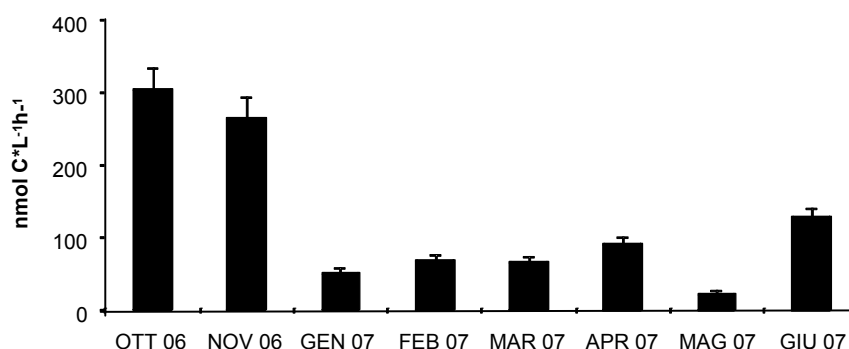
**Figura 4. Dinamica stagionale e annuale di *P. rubescens* e *L. redekeii* nel Lago di Vico (dati dei 3 siti superficiali e dei 2 siti di profondità sono stati mediati)**

Con l'obiettivo di caratterizzare meglio la capacità di *P. rubescens* di dare fioriture in ambienti diversi, è stata studiata anche la comunità batterica presente nei due laghi. I batteri eterotrofi infatti sembrerebbero avere un ruolo nella produzione e nella modulazione delle cianotossine (Cood *et al.*, 2005), così come nella rigenerazione di substrati e nutrienti grazie alla presenza di enzimi superficiali, come la fosfatasi alcalina e l'aminopeptidasi, attraverso i quali degradano le molecole organiche e i polipeptidi di grandi dimensioni in molecole più piccole e più facilmente utilizzabili (Hollibaugh & Azam, 1983). Visto il persistere della fioritura di *P. rubescens* in un lago oligotrofico come quello di Gerosa, abbiamo ipotizzato che l'attività di riciclo dei nutrienti da parte dei batteri potesse avere un ruolo nel mantenimento della sua dinamica. Per verificare questa ipotesi si è deciso di analizzare le abbondanze batteriche e le relative attività ectoenzimatiche dei batteri, che forniscono indicazioni sul tasso di riciclo dei nutrienti, sulle interazioni fra gli organismi e la sostanza organica disciolta, sulle caratteristiche della sostanza organica disciolta stessa e sugli eventuali parametri che possono rappresentare fattori limitanti per la comunità.

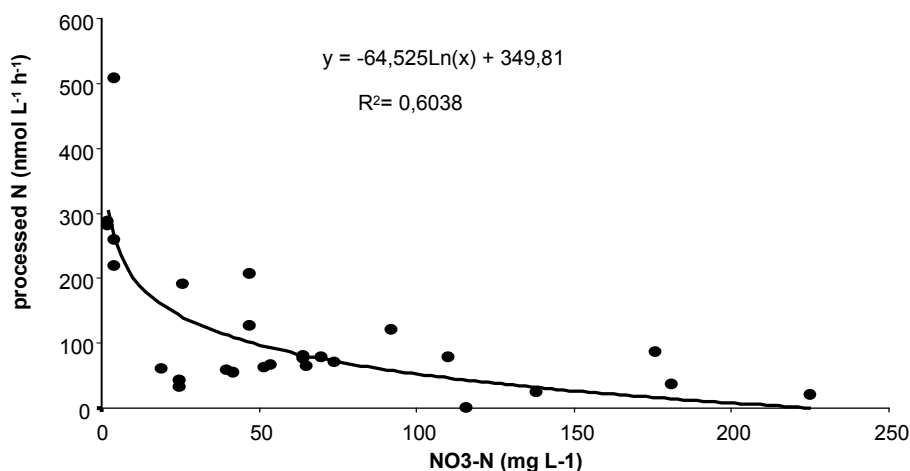
Dalle analisi dei dati risulta che le abbondanze batteriche dei due laghi rispecchiano lo stato trofico che li caratterizza. Per il Lago di Gerosa l'abbondanza batterica rientra in valori, tra  $1,6 \times 10^8$  e  $33,4 \times 10^8$  cell/L (Manganelli *et al.*, 2010), tipici di un lago oligotrofico (Porter *et al.*, 2004), mentre per il Lago di Vico i valori, tra  $4,8 \times 10^8$  e  $90 \times 10^8$  cell/L, sono tipici di un lago eutrofico.



Nel lago di Gerosa il ruolo dei batteri nel riciclo dei nutrienti sembra essere di fondamentale importanza per il mantenimento della fioritura di *P. rubescens*: l'attività aminopeptidasica risulta essere la più rilevante, con alti valori soprattutto in coincidenza del picco di fioritura (Figura 5). Questa ipotesi è avvalorata da una correlazione negativa significativa tra aminopeptidasi e la concentrazione di nitrati (Figura 6) il che dimostrerebbe che là dove la concentrazione di azoto è bassa, l'intensa attività di rimineralizzazione da parte dei batteri è in grado di sopperire a questa carenza e di permettere a *P. rubescens* di usare questa fonte di azoto per crescere.

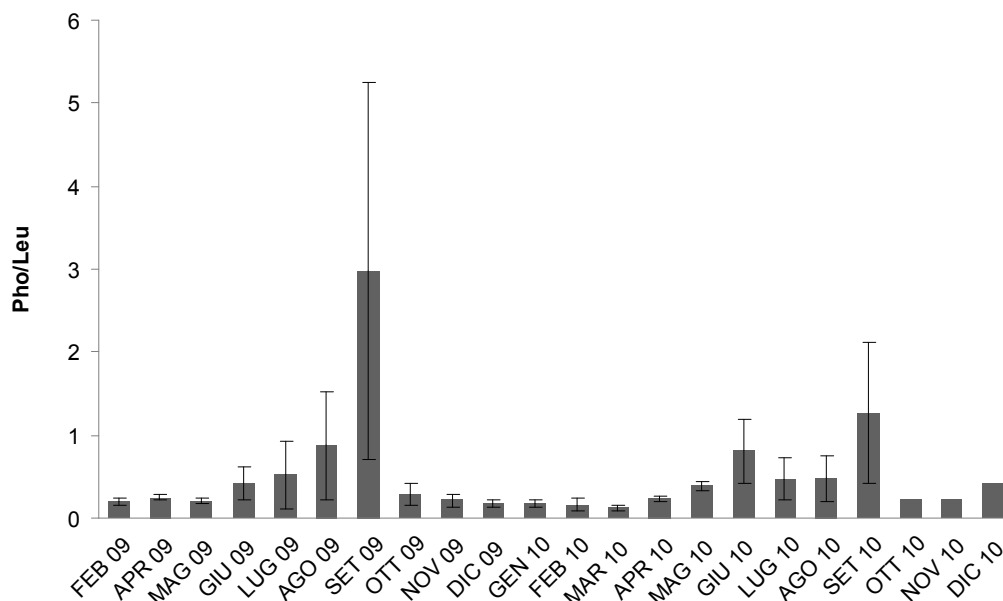


**Figura 5. Dinamica stagionale dell'attività aminopeptidasica (i dati di tutti i siti di campionamento sono stati mediati)**



**Figura 6. Correlazione tra aminopeptidasi e nitrati nel Lago di Gerosa**

Nel Lago di Vico, il rapporto tra attività fosfatasica e aminopeptidasica è quasi sempre minore di uno (Figura 7), a conferma di una situazione in cui il fosforo non è limitante. Le concentrazioni di nutrienti alte e non limitanti per la comunità permettono a *P. rubescens* di crescere ed essere sempre presente ad alte concentrazioni: il ruolo della comunità batterica nel riciclo dei nutrienti sembra essere meno rilevante ai fini del mantenimento della fioritura.



**Figura 7. Dinamica stagionale dell'attività ectoenzimatica**  
(i dati di tutti i siti di campionamento sono stati mediati) nel Lago di Vico

Relativamente al livello di cianotossine presenti nei due laghi, i dati ottenuti dalle analisi LC-MS/MS sono stati espressi per semplicità solo come frazione totale (MC tot), essendo in entrambi i casi la percentuale di tossina disciolta sempre inferiore al 10% del totale. Anche il profilo dei congeneri prodotti dalle due popolazioni risulta essere molto simile: le MC-LF, -LW, -LA ed -LY non sono mai state rilevate; la MC-dem-RR risulta per entrambi i laghi il congenere più frequente e più abbondante (Tabella 3), anche se nel Lago di Vico le concentrazioni massime raggiunte sono in media più elevate di quelle riscontrate nel Lago di Gerosa. In circa il 48% dei campioni analizzati, le MC hanno infatti mostrato concentrazioni al di sopra di 1 µg/L raggiungendo anche valori pari a 54 µg/L nel caso di accumuli e schiume.

**Tabella 3. Abbondanze e range di concentrazioni dei congeneri rilevati**

Congenere	Lago di Gerosa		Lago di Vico		
	presenza % nei campioni	range di conc (µg/L)	presenza % nei campioni	range di conc (µg/L)	conc max in accumuli (µg/L)
MC-RR	49	Tracce – 0,1	58	Tracce – 0,1	0,2
dem-MC-RR	85	Tracce - 1	81	Tracce – 7,7	54
MC-LR	0	-	1	Tracce	0,02
dem-MC-LR	73	Tracce – 0,15	47	Tracce – 0,06	2,3
MC-YR	48	Tracce – 0,09	38	Tracce – 0,06	0,4

Nel Lago di Gerosa i livelli di MC tot hanno raggiunto i valori più elevati nei mesi di ottobre e dicembre, sia nei campioni di superficie che lungo la colonna, mostrando un andamento simile a quello delle densità di *P. rubescens*, ma mai totalmente sovrapponibile: i livelli massimi di tossine e densità di *P. rubescens* non sono mai risultati coincidenti, ma sfalsati di circa un mese. Inoltre nei campioni di superficie i livelli delle tossine diminuiscono nettamente fino quasi a

sparire nei mesi più caldi (primavera/estate), mentre rimangono rilevabili per tutto il periodo del campionamento nei campioni di profondità (Figura 8).

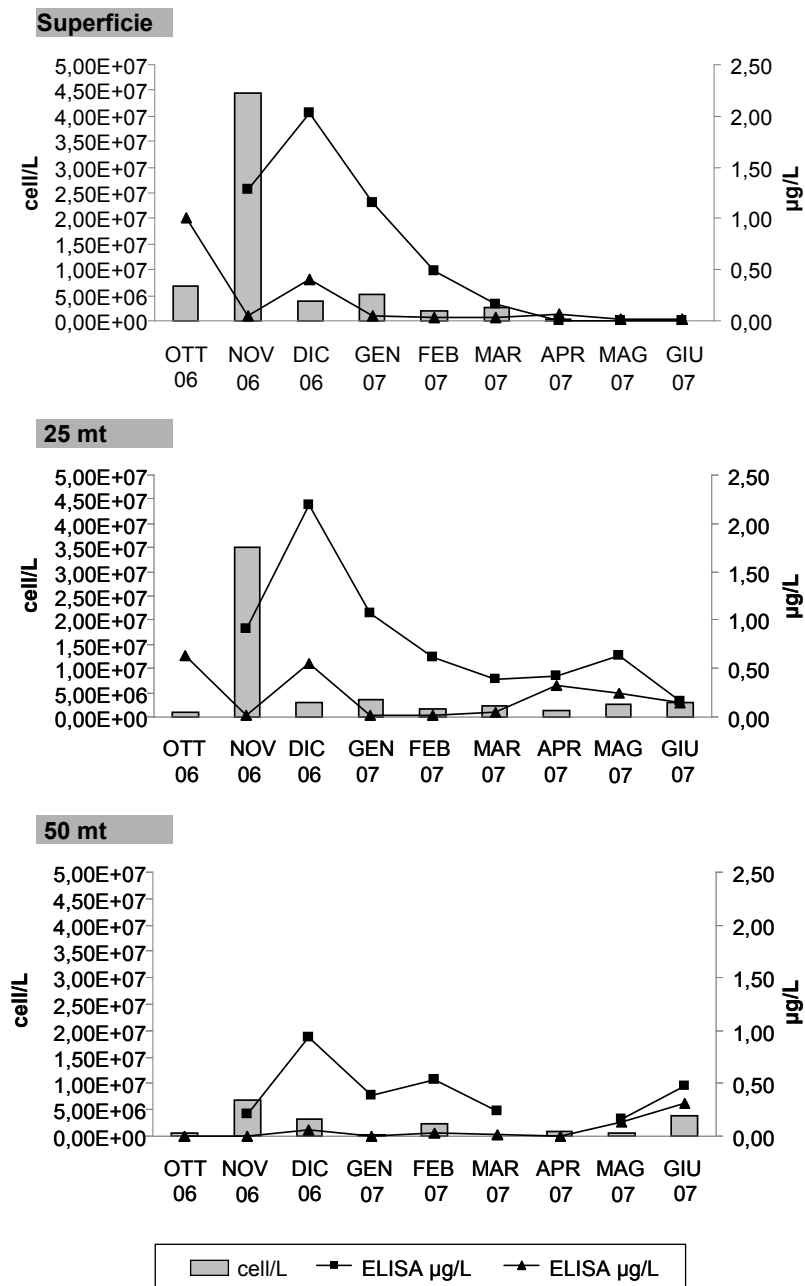
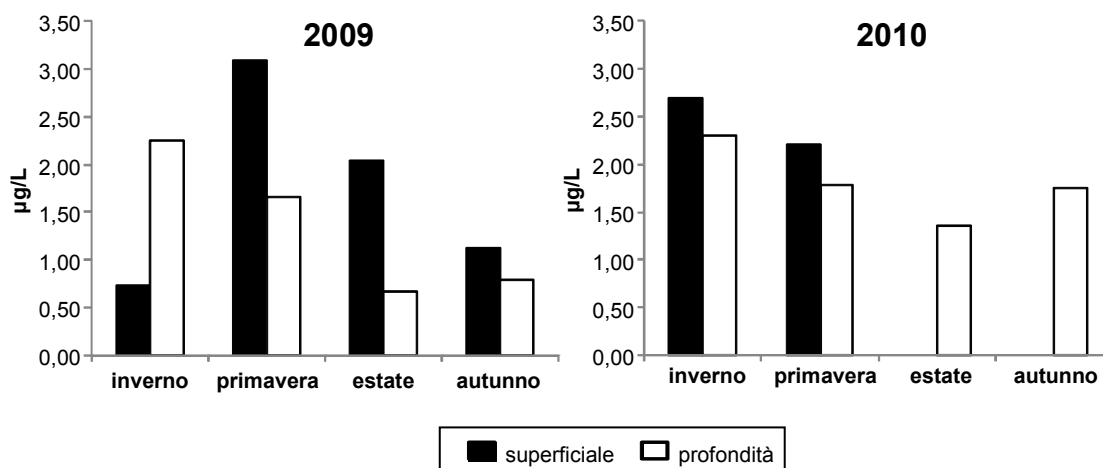


Figura 8. Dinamica di popolazione di *P. rubescens* e concentrazioni di MC tot nel Lago di Gerosa

È possibile infine notare come nella maggior parte dei campioni i valori delle MC tot rilevati con metodi LC-MS/MS ed ELISA abbiano trend molto simili, nonostante i valori rilevati con i metodi LC-MS/MS risultino spesso considerevolmente più bassi (Figura 9). Tale discrepanza potrebbe essere attribuita alla presenza di congeneri non ricercati in LC-MS/MS, o forse a

prodotti di degradazione delle microcistine, rilevati con il metodo immunologico. Il metodo ELISA infatti riconoscendo come aptene l'Adda, l'amminoacido specifico comune a tutte le microcistine, è in grado di rilevare qualsiasi frammento contenente tale amminoacido.

Per ciò che concerne il Lago di Vico, il contenuto di tossine segue abbastanza fedelmente l'andamento della densità di *P. rubescens*, ad eccezione dei campioni invernali e primaverili di profondità e di un campione primaverile superficiale del 2009 (Figura 9). Tale anomalia potrebbe in parte essere spiegata considerando il possibile contributo nella produzione di microcistine di *L. redekeii* (vedi Figura 4).

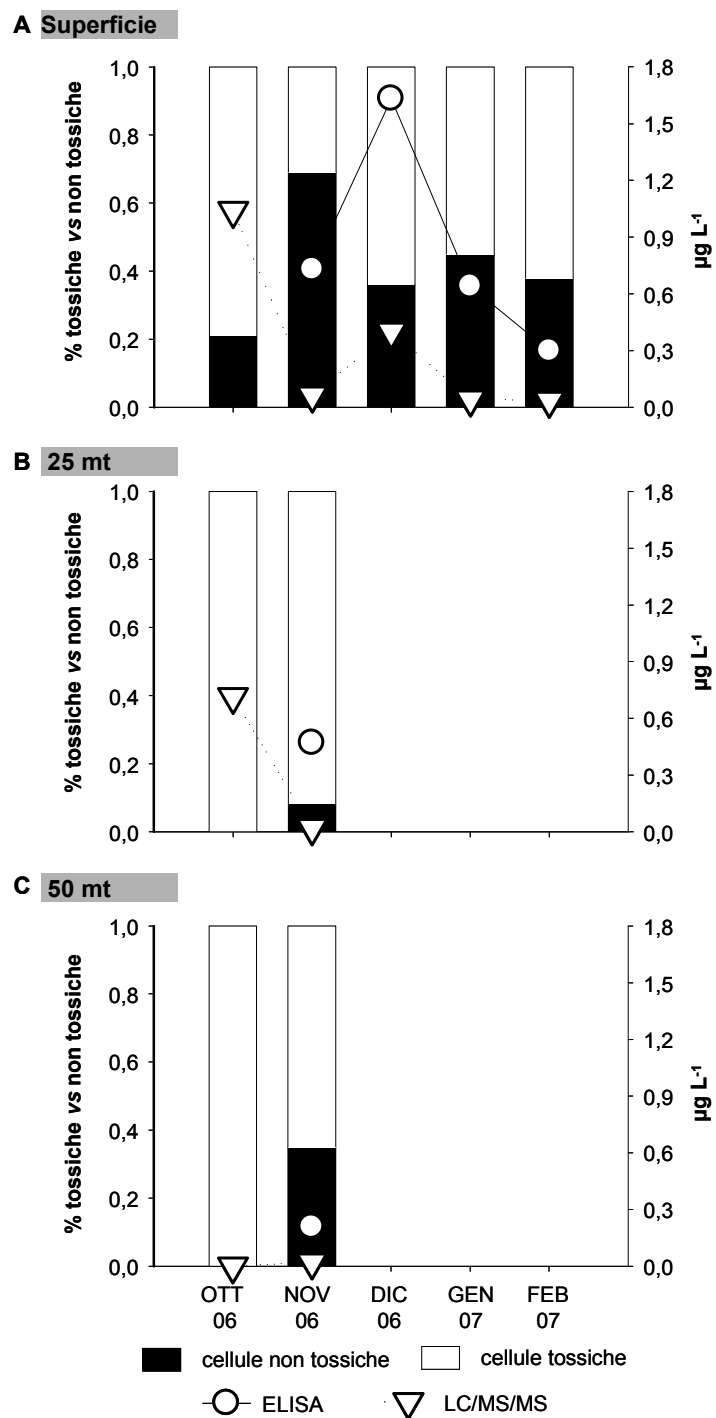


**Figura 9. Dinamica stagionale e annuale delle MC TOT nel Lago di Vico**  
(i dati dei 3 siti superficiali e dei 2 siti di profondità sono stati mediati)

Un'altra ipotesi plausibile per spiegare il potenziale tossico delle due comunità oggetto dello studio è legata alla composizione genotipica delle popolazioni.

L'analisi quantitativa delle due comunità cianobatteriche condotta mediante TNA assay ha evidenziato in entrambi i casi una composizione genotipica fortemente dinamica, poiché la frazione di individui tossici e non tossici ha mostrato oscillazioni ampie e repentine nei periodi di osservazioni effettuati.

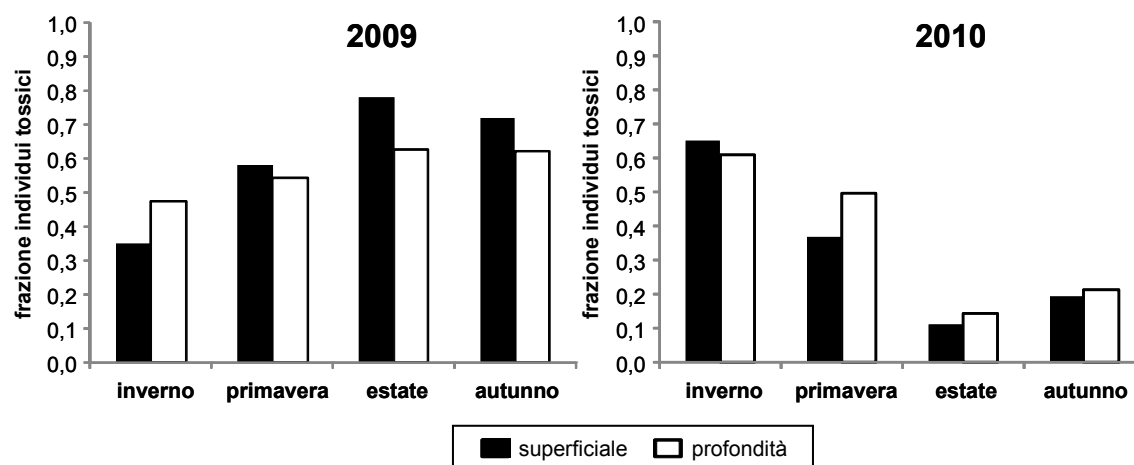
Nel caso del Lago di Gerosa la frazione stimata di cellule mcyB-positive rispetto alla popolazione totale era compresa tra 0,31 e 0,79 in superficie, e incrementava con la profondità lungo la colonna d'acqua (25 m e 50 m), fino ad avere una popolazione interamente tossica. La frazione di individui tossici aumentava proporzionalmente alla densità di cellule, ad eccezione del periodo di fioritura (novembre 2006), in cui è stato rilevato il valore minimo (Figura 10) (Manganelli *et al.*, 2010). L'analisi quantitativa della composizione dei genotipi della comunità di *P. rubescens* nel Lago di Gerosa può aiutare a comprendere l'apparente discrepanza osservata nel mese di novembre in superficie tra la concentrazione di cellule, che raggiunge il picco massimo, e i bassi livelli di microcistine misurati mediante analisi LC-MS/MS ed ELISA. Focalizzando l'attenzione sulla percentuale di cellule tossiche, piuttosto che sul numero totale di individui, è stato possibile osservare che proprio nel mese di novembre in superficie la frazione di cellule mcyB-positive raggiungeva il valore minimo (0,31), giustificando quindi seppur parzialmente lo shift tra biomassa e tossina (Figura 10).



**Figura 10. Frazione di cellule tossiche/non tossiche di *P. rubescens* (TNA assay) e concentrazione di MC (ELISA, LC-MS/MS) nel Lago di Gerosa nelle 3 stazioni di rilevamento**

Alcuni autori hanno ipotizzato che in condizioni tali da favorire una fioritura possano aumentare i mutanti incapaci di produrre tossina tra le cellule *mcyB*-positive (Ostermaier & Kurmayer, 2009), o in alternativa che intervengano meccanismi di regolazione della trascrizione dell'mRNA che portano a una diminuzione dei livelli di trascritto dei geni *mcy* (Kaebernick *et al.*, 2000).

Nel Lago di Vico l'analisi molecolare mostrava una situazione molto diversa nella composizione dei genotipi della comunità: la percentuale di cellule potenzialmente produttrici di microcistine misurata era indipendente dalla profondità, essendo consistentemente elevata sia in superficie che lungo la colonna d'acqua in tutto il periodo di rilevamenti effettuati, mantenendosi oltre lo 0,5 nel 60% dei campioni. Il picco è stato misurato a marzo 2010 in una delle due stazioni di riva (Figura 11). Una caratteristica comune è una diminuzione, anche se in misura inferiore, della frazione tossica durante le fioriture (0,5 nel 75% dei casi).



**Figura 11. TNA assay: fluttuazioni stagionali di genotipi tossici di *P. rubescens* nel Lago di Vico (i dati dei 3 siti superficiali e dei 2 siti di profondità sono stati mediati)**

La presenza di altri cianobatteri come *L. redekeii*, potenzialmente in grado di rispondere alla reazione di amplificazione del marcatore *mcyB*, potrebbe in parte spiegare l'elevata percentuale di individui tossici osservata nel corso del primo anno di monitoraggio (Figura 4). Sono in corso studi per verificare la plausibilità di questa ipotesi.

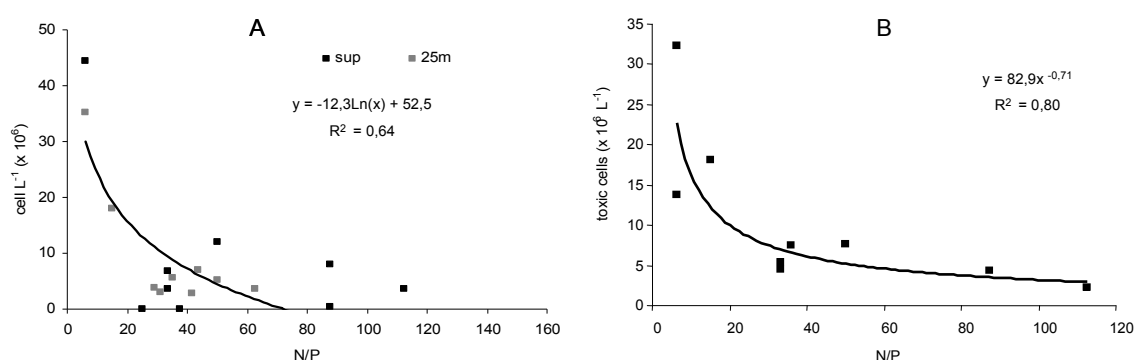
I dati di letteratura relativi a *Planktothrix* spp e *P. agardhii* (Kurmayer *et al.*, 2004; Briand *et al.*, 2008) riportano che entrambe le specie sono tipicamente caratterizzate da un'alta frazione di cellule tossiche (0,3-1), mentre in popolazioni di *Microcystis* questa frazione si presenta generalmente più bassa (0,05-0,38) e costante (Kurmayer *et al.*, 2004; Yoshida *et al.*, 2007).

I nostri dati, relativi a entrambe le comunità di *P. rubescens* monitorate, confermano che la frazione di individui tossici è alta e variabile, in particolare nei periodi di fioritura. La frazione di cellule produttrici di MC ha mostrato nel caso del Lago di Gerosa un andamento linearmente dipendente dalla densità, ad eccezione del bloom di superficie, in cui la frazione di individui tossici ha raggiunto il valore minimo rilevato.

Diverse ipotesi sono state avanzate per comprendere quali fattori ambientali possano regolare l'equilibrio tra le cellule tossiche e non tossiche in una popolazione, tali da determinare quello che sembra una fitness migliore per le cellule tossiche ad elevate biomasse. Esperimenti

su colture di *Microcystis* sembrano suggerire che in condizioni di scarsa intensità di luce, ad esempio durante una fioritura, in cui l'elevata biomassa ostacola la penetrazione dei raggi solari negli strati più profondi, le cellule non tossiche abbiano un vantaggio selettivo rispetto a quelle che producono tossina (Kaardinal *et al.*, 2007). Tuttavia i dati raccolti nel corso di entrambi i nostri studi sembrano escludere questa ipotesi, poiché nel Lago di Gerosa le più alte percentuali di individui tossici sono state misurate sotto il termoclino, ove l'intensità della luce è fortemente ridotta, mentre nel Lago di Vico l'andamento costante della frazione di individui tossici a tutte le profondità non permette di identificare un singolo fattore ambientale causale, ed è quindi più plausibile che diversi parametri possano entrare in gioco nell'equilibrio delle cellule tossiche/non tossiche all'interno della popolazione, attraverso un meccanismo di risposta comunque rapido. La tendenza ad una diminuzione della frazione di cellule MC-produttrici osservata in corrispondenza delle fioriture in entrambi gli studi può essere ricondotta a un maggior vantaggio adattativo delle cellule non tossiche in termini energetici, per il dispendio dovuto alla produzione di MC in una fase in cui le cellule sono principalmente impegnate nella riproduzione, anche se il mantenimento a livelli basali di una frazione di cellule tossiche può rappresentare in genere un vantaggio per le specie in termini di diversità biologica.

Il profilo della composizione genotipica della comunità di *P. rubescens* ha consentito di evidenziare alcune interessanti correlazioni tra la frazione di individui tossici misurata attraverso qPCR e la disponibilità dei nutrienti disciolti nel caso del Lago di Gerosa. In particolare, nei campioni prelevati in superficie e a -25 m, è stata osservata una correlazione negativa tra la densità delle cellule e il rapporto N/P totale (Manganelli *et al.*, 2010). Quando l'analisi è stata limitata alla frazione di individui tossici indipendentemente dalla profondità, la correlazione negativa è risultata ancora più evidente (Figura 12); una simile correlazione è stata osservata in un lago francese (Briand *et al.*, 2008) tra l'azoto totale e le cellule mcyA-positive in *P. agardhii*. Inoltre, è stata osservata una correlazione positiva tra cellule tossiche/non tossiche e P totale, che ha suggerito un possibile vantaggio competitivo per le cellule non tossiche in presenza di bassi livelli di fosforo totale. Nonostante sia riportato in alcuni lavori che un rapporto N/P > 16 è necessario affinché *P. agardhii* si affermi come specie dominante in una comunità cianobatterica e produca una fioritura (Teubner *et al.*, 1999), i nostri risultati indicano che bassi livelli di nutrienti non sono indicatori di basso rischio di proliferazione cianobatterica.



**Figura 12. Correlazione tra abbondanza di *P. rubescens* e rapporto N/P in superficie e a -25 m nel Lago di Gerosa (A); e correlazione tra frazione di cellule tossiche di *P. rubescens* e rapporto N/P nelle tre profondità (B)**

## Conclusioni

In conclusione, i nostri studi suggeriscono che non è possibile applicare uno stesso programma di monitoraggio a corpi idrici con differenti caratteristiche, mentre modelli *tailored-made* dovrebbero essere elaborati sulla base di studi preliminari utilizzando un approccio integrato che permetta di identificare i parametri chiave per effettuare una corretta valutazione del rischio. Infatti, la stima della densità delle cellule non è sempre un parametro indicativo per prevedere il potenziale tossico della popolazione, poiché il picco delle tossine può essere sfasato rispetto a quello dell'abbondanza cellulare, e la proporzione di genotipi tossici può variare nel tempo anche in modo repentino, alterando il livello di produzione delle tossine. Inoltre condizioni generalmente oligotrofiche non sono necessariamente un indice di basso rischio di proliferazione di cianobatteri, in quanto *P. rubescens* è in grado di dar luogo a fioriture anche in presenza di bassi livelli di nutrienti disciolti (come nel caso del Lago di Gerosa). D'altra parte, quando il livello dei nutrienti è sufficientemente elevato, la stagionalità di *P. rubescens* non si limita ai mesi più freddi, come dimostrato dalla presenza di fioriture superficiali nel Lago di Vico anche in primavera inoltrata. Si ritiene inoltre opportuno segnalare che, in presenza di *P. rubescens*, in caso di captazione di acque per uso potabile, è necessario monitorare le acque al di sotto del termoclino, dove la proporzione di cellule produttrici di MC può essere più elevata che in superficie, durante tutto l'anno. Infine è utile sottolineare che, ai fini di un monitoraggio di routine da parte delle strutture periferiche, è opportuno applicare un metodo aspecifico (come il test immunoenzimatico ELISA) a scopo di screening, in modo da avere una globale indicazione del contenuto totale di cianotossine. Solo per studi e approfondimenti più sofisticati, in presenza di livelli tali da destare preoccupazione, è opportuno ricorrere a un sistema di rilevazione con tecniche LC-MS/MS per ottenere un profilo degli specifici congeneri, ciascuno con differente potenziale tossico.

## Bibliografia

- APAT (Agenzia per la Protezione dell'Ambiente e per i Servizi Tecnici), IRSA-CNR (Istituto di Ricerca sulle Acque-Consiglio nazionale delle Ricerche). *Metodi analitici per le acque*. Roma: APAT; 2003. (Manuali e Linee Guida APAT 29/2003)
- Briand E, Gugger M, François JC, Bernard C, Humbert JF, Quiblier C. Temporal variations in the dynamics of potentially microcystin-producing strains in a bloom-forming *Planktothrix agardhii* (cyanobacteria) population. *Appl Environ Microbiol* 2008;74:3839-48.
- Chorus I, Bartram J. *Toxic cyanobacteria in water. A guide to their public health consequence, monitoring and management*. London: E&FN SPON; 1999.
- CNR-IRSA-ISE. *LIMNO database della qualità dei dati italiani*. Consiglio Nazionale delle Ricerche; Istituto di Ricerca Sulle Acque; Istituto per lo Studio degli Ecosistemi; 2004. Disponibile all'indirizzo <http://www.ise.cnr.it/limno/limno.htm>; ultima consultazione 27/9/11.
- Codd GA, Morrisn LF, Metcalf JS. Cyanobacterial tyoxins: risk management for health protection. *Toxicol Appl Pharmacol* 2005;203:264-72.
- Cox PA, Banack SA, Murch SJ, Rasmussen U, Tien G, Bidigare RR, Metcalf JS, Morrison LF, Codd GA, Bergman B. Diverse taxa of cyanobacteria produce beta- N-methylamino-L-alanine, a neurotoxic amino acid. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005;102:5074-8.
- Funari E, Scardala S, Testai E (Ed.). *Cianobatteri potenzialmente tossici: aspetti ecologici, metodologici e valutazione del rischio*. Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2008. (Rapporti ISTISAN 08/6).



- Funari E, Testai E. Human health risk assessment related to cyanotoxins exposure. *Crit Rev Toxicol* 2008;38:97-126.
- Gkelis S, Harjunpää V, Vardaka Y, Lanaras T, Sivonen K. Occurrence of microcystins in Greek water blooms and isolated strains. In: *5<sup>th</sup> Int. Conf. Toxic Cyanobacteria*. Noosa, Queensland, Australia, 15-20 July 2001.
- Hollibough JT, Azam F. Microbial-degradation of dissolved proteins in seawater. *Limnol Oceanogr* 1983;28:1104-16.
- Hoppe HG. Significance of exoenzymatic activities in the ecology of brackish water: measurements by means of methylumbelliferyl substrate. *Mar Ecol Prog Ser* 1983;11:299-308.
- Jacquet S, Briand JF, Leboulanger C, Avois-Jacquet C, Oberhaus L, Tassin B, Vinçon-Leite B, Paolini G, Druart J-C, Anneville O, Humbert J-F. The proliferation of the toxic cyanobacterium *Planktothrix rubescens* following restoration of the largest natural French lake (Lac du Bourget). *Harmful Algae* 2005;4:651-72.
- Jespersen AM, Christoffersen K. Measurements of Chl-a from phytoplankton using ethanol as extraction solvent. *Arch Hydrobiol* 1987;109:445-54.
- Kaebernick M, Neilan BA, Borner T, Dittmann E. Light and the transcriptional response of the microcystin biosynthesis gene cluster. *Appl Environ Microbiol* 2000;66:3387-92.
- Kardinaal WEA, Tonk L, Janse I, Hol S, Slot P, Huisman J, Visser PM. Competition for light between toxic and nontoxic strains of the harmful cyanobacterium *Microcystis*. *Appl Environ Microbiol* 2007;73:2939-46.
- Kurmayer R, Christiansen G, Fastner J, Börner T. Abundance of active and inactive microcystin genotypes in populations of the toxic cyanobacterium *Planktothrix* spp. *Environ Microbiol* 2004;6:831-41.
- Kurmayer R, Dittman E, Fastner J, Chorus I. Diversity of microcystin genes within a population of the toxic cyanobacterium *Microcystis* spp. in Lake Wannsee (Berlin, Germany). *Microb Ecol* 2002;43:107-18.
- Lawton LA, Edwards C, Codd GA. Extraction and high performance-liquid chromatographic method for the determination of microcystins in raw and treated waters. *Analyst* 1994;199:1525-30.
- Legnani E, Copetti D, Oggioni A, Tartari G, Palumbo M-T, Morabito G. *Planktothrix rubescens*' seasonal dynamics and vertical distribution in Lake Pusiano (North Italy). *J Limnol* 2005;64:61-73.
- Manganelli M, Scardala S, Stefanelli M, Vichi S, Mattei D, Bogiatti S, Ceccarelli P, Corradetti E, Petrucci I, Gemma S, Testai E, Funari E. Health risk evaluation associated to *Planktothrix rubescens*: An integrated approach to design tailored monitoring programs for human exposure to cyanotoxins. *Water Research* 2010;44:1297-306.
- Mühling M, Fuller NJ, Millard A, Somerfield PJ, Marie D, Wilson WH, Scanlan DJ, Post AF, Joint I, Mann NH. Genetic diversity of marine *Synechococcus* and co-occurring cyanophage communities: evidence for viral control of phytoplankton. *Environ Microbiol* 2005;7(4):499-508.
- Ostermaier V. and Kurmayer R. Distribution and abundance of nontoxic mutants of cyanobacteria in lakes of the Alps. *Microb Ecol* 2009;58(2):323-33.
- Porter J, Morrison SA, Pickup RW. Effect of trophic status on the culturability and activity of bacteria from a range of lakes in the English Lake District. *Appl Environ Microbiol* 2004;70:2072-8.
- Quiros R. The relationship between nitrate and ammonia concentrations in the pelagic zone of lakes. *Limnologia* 2003;22:37-50.
- Rohrlach T, Christoffersen K, Hansen PE, Zhang W, Czarnecki O, Henning M, Fastner J, Erhard M, Neilan BA, Kaebernick M. Isolation, characterization, and quantitative analysis of Microviridin J, a new *Microcystis* metabolite toxic to *Daphnia*. *J Chem Ecology* 2003;29:1757-70.

- Sivonen K, Jones G. Cyanobacterial toxins. In: Chorus I, Bartram J (Ed.), *Toxic cyanobacteria in water. A guide to their public health consequence, monitoring and management*. London: E&FN SPON; 1999. p. 41-111.
- Yoshida M, Yoshida T, Takashima Y, Hosoda N, Hiroishi S. Dynamics of microcystin-producing and non-microcystin-producing *Microcystis* populations is correlated with nitrate concentration in a Japanese lake. *FEMS Microbiol Lett* 2007;266:49-53.