



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI SASSARI

**SCUOLA DI DOTTORATO IN
SCIENZE VETERINARIE**

INDIRIZZO: Produzione, Qualità e Sicurezza Alimentare (XXVIII CICLO)

**Ricerca di *Microcystin-LR* in molluschi bivalvi e nel
loro habitat in alcune zone della Sardegna**

Docente Guida

Prof.ssa Maria Piera Demontis

Direttore

Prof. Sergio Ledda

Tesi di dottorato della

Dott.ssa Tiziana Sedda

ANNO ACCADEMICO 2014 – 2015

*La ripetizione di piccoli sforzi otterrà
più dell'uso occasionale di grandi talenti.*

(C.S.)

INDICE

1. INTRODUZIONE	1
1.1. Cianobatteri	1
1.2. Cianotossine: classificazione, proprietà chimiche e tossicità	8
1.3. Microcistine	12
1.4. Microcistina LR	19
1.5. Aspetti tossicologici della MC-LR	21
1.6. Epidemiologia	26
1.7. Aspetti normativi	30
2. SCOPO DEL LAVORO	32
3 PARTE I – Studi condotti negli Stati Uniti	35
3.1. Premessa	36
3.1.1 Fioriture del genere <i>Microcystis</i> in California (USA): il caso del Sacramento-San Joaquin River Delta	36
3.1.2 I Medaka (<i>Oryzias latipes</i>) come modello di tossicità	37
3.2. Materiali e metodi	38
3.2.1 Medaka Toxicity Test	38
3.3. Risultati	42
4. PARTE II- Studi condotti in Sardegna	46
4.1 Premessa	46

4.1.1. Molluschi oggetto di studio: <i>M. galloprovincialis</i> e	47
<i>T.decussata</i>	53
4.1.2 Siti di campionamento: generalità	
4.1.3. Tecniche utilizzate per la quantificazione della microcistina	
LR: Enzyme Linked Immunosorbent Assay (<i>ELISA</i>) e	60
Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry	63
(<i>LC- MS/MS</i>)	63
4.2. Materiali e metodi	63
4.2.1 Sostanze utilizzate	64
4.2.2 Campionamento	72
4.2.3 Siti di campionamento: punti di prelievo	73
4.2.4 Preparazione dei campioni	
4.2.5 Estrazione in fase solida (SPE) della MC-LR da campioni di	74
acqua	74
4.2.6 Estrazione in fase solida (SPE) della MC-LR da campioni	75
di molluschi	77
4.2.7 Dosaggio ELISA	77
4.2.8 Dosaggio LC-MS/MS	78
4.3. Risultati	81
4.3.1 Scelta del metodo estrattivo	
4.3.2 Analisi ELISA della Microcistina-LR	
4.3.3 Analisi LC-MS/MS della Microcistina-LR	

5. DISCUSSIONE E CONCLUSIONI	85
6. BIBLIOGRAFIA	89

1. INTRODUZIONE

1.1 Cianobatteri

I Cianobatteri sono organismi procarioti fotoautotrofi appartenenti al gruppo degli Eubatteri Gram-negativi conosciuti anche con il nome di Cianoficee o erroneamente alghe verdi-azzurre. Sono distribuiti in tutto il pianeta, soprattutto nell'ambiente acquatico, con un ruolo fondamentale negli ecosistemi contribuendo alla fissazione dell'azoto atmosferico. In determinate condizioni ambientali e per la crescente eutrofizzazione possono raggiungere elevate densità, formare fioriture e schiume, talvolta tossiche. Sono caratterizzati da una grande variabilità morfologica, con forme unicellulari, coloniali e filamentose, ramificate o uniseriate, con dimensioni variabili da 0.2 μm a 200 μm a seconda della specie. Il loro polimorfismo a livello fenotipico, unitamente alla loro natura procariotica e alla coesistenza di diversi sistemi di classificazione, hanno sempre reso difficoltosa l'identificazione tassonomica di questi microrganismi. Tuttavia un'attenta analisi morfo-funzionale, unitamente a studi di carattere molecolare, hanno permesso di considerarli distinti dalle alghe sia per citologia e fisiologia che per caratteristiche biochimiche. Infatti, a differenza delle cellule eucariotiche algali, con le quali peraltro hanno in comune sia la grandezza sia la capacità di svolgere la fotosintesi, in ambiente aerobio ed anaerobio, i cianobatteri non possiedono i cloroplasti ma i tilacoidi. Questi ultimi contengono pigmenti fotosintetici quali clorofilla e pigmenti accessori detti ficobiline quali ficocianina e alloficocianina di colore azzurro e la ficoeritrina di colore rosso, responsabili

della caratteristiche colorazioni che in passato gli sono valsi il nome di alghe verdi-azzurre; posseggono inoltre carotenoidi e xantofille. Le ficobiline captano radiazioni luminose a lunghezza d'onda diversa da quella che assorbe la clorofilla per poi trasmetterle a quest'ultima per il processo della fotosintesi.

I cianobatteri sono organismi unici nel loro genere poiché rappresentano i soli procarioti in grado di svolgere una fotosintesi ossigenica simile a quella delle piante superiori con liberazione di ossigeno nell'ambiente, mentre, le altre classi di batteri con attività fotosintetica operano invece una fotosintesi di tipo anossigenica.

Dal punto di vista strutturale, la cellula cianobatterica possiede una parete cellulare pluristratificata, delimitata da un rivestimento (*envelope*) composto da quattro strati: uno strato elettronegativo a contatto con il plasmalemma (la cui composizione non è stata ancora del tutto chiarita), uno intermedio, composto in massima parte da peptidoglicano che le conferisce grande robustezza e rigidità e due strati esterni lipopolisaccaridici che complessivamente costituiscono la membrana esterna (Wolk, 1973).

In molti casi, esternamente alla parete cellulare e saldamente aderente ad essa, si trova una guaina fortemente mucillaginosa, a struttura finemente fibrillare, ricca di mucopolisaccaridi e fortemente idrofila. La guaina favorisce la formazione di colonie tenendo uniti i gruppi di cellule e proteggendo gli organismi dalla disidratazione.

È proprio per l'analogia strutturale della membrana esterna che i cianobatteri sono classificati come batteri Gram-negativi; tuttavia, lo spessore dello strato di

peptidoglicano dei cianobatteri è maggiore (dai 10 ai 700 nm, a seconda delle specie) di quello dei batteri Gram-negativi (2-6 nm) e più simile a quello dei batteri Gram-positivi (20-40 nm), con il quale condivide altre caratteristiche, come ad esempio la presenza di un più elevato numero di legami tra le catene polisaccaridiche di peptidoglicano. In aggiunta, anche la membrana esterna dei Cianobatteri presenta una composizione unica e diversa da quella dei batteri Gram-negativi (Hoiczuk *et al.*, 2000).

Come tutti i procarioti, i cianobatteri hanno cellule prive di compartimentazione interna (Van den Hoek *et al.*, 1995). Nel citoplasma è presente materiale nucleare ammassato in posizione centrale in una regione denominata nucleoplasma, ribosomi 70S e vescicole gassose che regolano il galleggiamento. Si possono distinguere inoltre tutta una serie di inclusi costituiti da sostanze di riserva come granuli di cianoficina, che rappresenta una riserva di azoto, granuli di poli- β -idrossibutirrato che rappresentano riserve di carbonio, granuli di “amido delle *Cyanophyceae*” (un polisaccaride simile al glicogeno) ed infine granuli di polifosfato utilizzati come riserva di fosfato e gocce lipidiche. (Flores *et al.*, 1994).

Le particolari caratteristiche morfologiche e fisiologiche consentono ai cianobatteri di colonizzare vari tipi di substrato e di adattarsi ad ampi cambiamenti ambientali, rendendoli microrganismi ubiquitari. Alcune specie sono in grado di sopravvivere in condizioni estreme di temperatura, salinità, irraggiamento e disponibilità di nutrienti e si possono ritrovare quindi in luoghi

molto diversi come suoli desertici, sorgenti termali, laghi alcalini, pozze ipersaline e negli ambienti Artico e Antartico (Jungblut *et al.*, 2005; Taton *et al.*, 2006).

Per quanto riguarda l'*habitus vivendi*, fra i cianobatteri si distinguono forme pelagiche, sia di acqua dolce sia di acqua marina, e forme bentoniche. Le forme pelagiche vivono fluttuando in una colonna d'acqua e migrando verticalmente in base ai nutrienti, alla temperatura ed alla luce; grazie alla presenza di vescicole di gas intracellulare riescono a galleggiare e mantenere la posizione alla profondità desiderata della colonna d'acqua. Le forme bentoniche vivono aderendo, più o meno stabilmente, a diversi substrati, formando dei tappeti. Va inoltre segnalata la presenza di numerose forme terrestri epilittiche ed endolitiche in grado cioè di vivere all'interno e all'esterno di rocce. Infine, un'ulteriore distinzione va fatta fra i cianobatteri a vita libera e quelli endosimbionti che possono vivere in simbiosi con piante, alghe, animali, funghi e protisti (Nilsson *et al.*, 2006; Adams *et al.*, 2008).

In natura, le comunità di cianobatteri possono essere rappresentate da due principali tipi di aggregazioni: “*blooms*” (fioriture) e “*mats*” microbici (stratificazioni). I *blooms* sono costituiti da un elevato numero di cellule di microrganismi pelagici, dotati di vescicole gassose che ne permettono il galleggiamento, visibili a occhio nudo in mari e laghi (Sellsner *et al.*, 2003; De Figueiredo *et al.*, 2006). Le fioriture sono spesso monospecifiche e possono formare un superficiale e denso strato di cellule visibile ad occhio nudo. I *mats* microbici sono, invece, dense comunità bentoniche di microrganismi, in cui le differenti specie si trovano distribuite verticalmente a costituire strati distinti,

spesso riconoscibili ad occhio nudo per i diversi colori dovuti ai pigmenti degli organismi che li compongono. Lo spessore dei *mats* è generalmente limitato, in quanto la luce non riesce a penetrare troppo negli strati sottostanti, limitando notevolmente la capacità di effettuare la fotosintesi e quindi la crescita dei cianobatteri oltre una certa profondità, anche se molte specie possono vivere chemiotroficamente per dei periodi (Stal, 1995).

La formazione di fioriture di cianobatteri è controllata da fattori ambientali e la loro pericolosità è condizionata dalla capacità delle singole specie di produrre metaboliti tossici. Infatti, queste forme di aggregazione possono determinare conseguenze non solo di natura ecologica, come la moria di organismi marini (pesci *in primis*), ma anche gravi conseguenze sulla salute pubblica.

I fattori responsabili della distribuzione e sviluppo dei cianobatteri sono stati, e sono tutt'ora oggetto di numerosissime ricerche. E' parere comune che l'aumento della frequenza delle fioriture dovute allo sviluppo massivo di specie cianobatteriche sia associato a modifiche riconducibili all'attività umana. Di fatto, eutrofizzazione e riscaldamento climatico sono considerati i due principali fattori chiave responsabili dell'aumento dello sviluppo dei cianobatteri nei Paesi industrializzati e in via di sviluppo e, più in generale, in aree densamente popolate (O'Neil *et al.*, 2012; Paerl *et al.*, 2012). L'origine dell'eutrofizzazione delle acque superficiali deve essere ricercata prevalentemente nell'attività antropica che porta ad un aumento delle concentrazioni di nutrienti nel terreno e, nelle situazioni più gravi, all'inquinamento delle falde profonde. L'attività agricola fornisce un

contributo rilevante di nitrati all'acqua e, vista la loro solubilità, fino a metà dell'azoto utilizzato per i raccolti agricoli va a finire nelle acque.

Altri fattori importanti in grado di influenzare le fioriture di cianobatteri sono l'elevata temperatura (superiore ai 20 °C), il pH (valori di pH<8 ne favoriscono lo sviluppo) (Hans, 2006), i tempi di ricambio delle acque e i processi di mescolamento (Zohary *et al.*, 2010). Nei canali e nei corsi d'acqua caratterizzati da una considerevole velocità di spostamento delle masse d'acqua, le fioriture sono rare, in quanto l'eccessiva velocità non favorisce l'aggregazione mentre, in estate, quando le correnti d'acqua risultano più calme, la crescita può essere maggiore. Inoltre, la siccità porta ad una concentrazione dei nutrienti e alla riduzione dell'ossigenazione dell'acqua, condizioni queste che sono spesso associate ad ingenti fioriture di cianobatteri. Per di più, la diminuzione dei venti favorisce la cessazione del rimescolamento del corpo d'acqua e di conseguenza la formazione di schiume superficiali che si formano in gran parte durante la notte, quando i cianobatteri non regolano attivamente il loro galleggiamento (Pearson *et al.*, 1990).

Altri fattori considerati importanti nello sviluppo e dominanza dei cianobatteri comprendono i rapporti tra azoto e fosforo (N/P), il controllo del galleggiamento, l'elevata competizione per luce e CO₂, la tolleranza alle elevate temperature, la resistenza ai predatori (zooplancton), le elevate capacità di accumulo di riserve di nutrienti, l'azoto-fissazione, l'assimilazione di ammonio e la competizione per elementi in traccia (Hyenstrand *et al.*, 1998).

Un basso rapporto N/P favorisce lo sviluppo dei cianobatteri poiché sono maggiormente in grado, rispetto ad altri microrganismi, di competere quando la disponibilità di azoto è scarsa. Pertanto, di fronte ad un eccessivo carico di fosforo, l'azoto diventa relativamente scarso facendo sì che i cianobatteri diventino le specie dominanti (Smith *et al.*, 1999).

Attraverso il controllo del galleggiamento i cianobatteri possono migrare lungo i gradienti termici della colonna d'acqua, in risposta a stimoli luminosi ed esigenze nutritive. In questo modo, infatti, possono utilizzare i nutrienti intrappolati negli strati più freddi e profondi della colonna d'acqua.

Per quanto riguarda il fattore luce, in condizioni di bassa intensità luminosa i cianobatteri sono in grado di aumentare il contenuto dei pigmenti fotosintetici, mantenendo così un tasso di crescita relativamente più alto rispetto ad altri organismi fitoplanctonici competitori. I tempi di replicazione dei cianobatteri variano notevolmente sia all'interno della stessa specie che tra specie diverse, e dipendono, oltre che da fattori ambientali, anche dalla disponibilità di nutrienti. Il tempo medio di duplicazione per molte specie varia da 21 ore a 14,7 giorni. In condizioni ottimali, le cellule si replicano tanto velocemente da poter dare luogo in circa 2 giorni ad una fioritura, che può persistere per circa 5-7 giorni (Ressom *et al.*, 1994).

La formazione di fioriture cianobatteriche (*cyanobacterial blooms*) è regolata da tre importanti fattori. Il primo è la temperatura dell'acqua (superiore ai 25°C), fattore che aumenta la frequenza e l'ampiezza delle fioriture, favorendone lo sviluppo a discapito di altre specie di fitoplancton. Il secondo fattore è

l'esposizione alla luce, infatti, la maggior parte dei cianobatteri ha bisogno di un minimo di luce per poter effettuare la fotosintesi. Tuttavia, qualità, intensità e durata dell'esposizione alla luce è specie-specifica. Il terzo fattore è lo stato trofico del sistema idrico. Per lo sviluppo delle fioriture i cianobatteri devono trovarsi in serbatoi eutrofici con un rapporto N/P tra 10 e 15 (Mur *et al.*, 1999).

Lo sviluppo sempre più abbondante di fioriture cianoficee è diventato un problema molto serio, poiché molte specie di cianobatteri sono in grado di produrre come metaboliti secondari una grande varietà di cianotossine (**Tabella 1**). Una stessa specie di cianobatteri può essere associata sia a fioriture tossiche che non tossiche. Al di là dei fattori ambientali, è la variabilità genetica dei cianobatteri il fattore più importante in grado di determinare la produzione di cianotossine, infatti, in una singola specie ci possono essere genotipi diversi che possono esprimere o meno il gene che codifica la produzione delle tossine (Kurmayer *et al.*, 2002). Sembrerebbe, inoltre, che i cianobatteri siano in grado di attivare o disattivare i suddetti geni in relazione alle condizioni ambientali e che tale produzione tenda ad aumentare durante la fase di crescita esponenziale del microrganismo per diminuire gradualmente nella fase stazionaria (Watanabe *et al.*, 1988).

1.2 Cianotossine: classificazione, proprietà chimiche e tossicità

Le cianotossine, vengono tradizionalmente classificate in quattro diversi gruppi in base ai loro effetti tossici:

- **Epatotossine:** peptidi ciclici che causano tossicità a livello epatico inibendo le protein-fosfatasi 1 e 2A. Comprendono oltre 80 congeneri di microcistine (MC) e 7 congeneri noti di nodularine (NOD). Sono anche considerate promotori tumorali, soprattutto a livello epatico.

- **Neurotossine:** alcaloidi che agiscono bloccando la trasmissione neuronale attraverso diverse vie. Comprendono l'anatossina-a, l'omoanatossina-a, l'anatossina-a(s) e le saxitossine. Le anatossine-a e le omoanatossine-a sono dei potenti depolarizzanti e si legano ai recettori nicotinici per l'*acetilcolina* nel sistema nervoso centrale, periferico e nelle giunzioni neuromuscolari (Carmichael *et al.*, 1998). Queste tossine, mimano l'azione dell'*acetilcolina* ma non vengono degradate dall'*acetilcolinesterasi* causando una trasmissione continua dell'impulso nervoso e paralisi muscolare (Lilleheil *et al.*, 1997). L'anatossina-a(s), invece, agisce a livello delle giunzioni neuromuscolari inibendo irreversibilmente l'*acetilcolinesterasi* e bloccando, in tal modo, l'idrolisi dell'*acetilcolina* la quale si accumula determinando ipereccitabilità nervosa (Carmichael *et al.*, 1993). Le saxitossine, conosciute anche come PSPs (*Paralytic Shellfish Poisoning*), invece, bloccano il canale del sodio nelle cellule nervose ed i canali del calcio e potassio in quelle cardiache, interferendo con la propagazione del potenziale d'azione e causando morte per asfissia in seguito a paralisi dei muscoli respiratori.

- **Citotossine:** agiscono principalmente a livello epatico e renale producendo un'ampia varietà di sintomi. La cilindrospermopsina è un alcaloide guanidinico ciclico che agisce bloccando irreversibilmente la sintesi proteica determinando danni citogenetici mediante rottura del filamento del DNA e perdita di interi

cromosomi. Induce necrosi a livello epatico e renale. Svolge inoltre un'azione da interferente endocrino con alterazione del rapporto progesterone/estrogeni. Tale tossina risulta potenzialmente cancerogena.

- **Dermatotossine:** sono un'ampia varietà di tossine e lipopolisaccaridi (LPS) prodotte da diversi generi di cianobatteri marini che possono causare dermatiti da contatto, reazioni allergiche, disturbi gastroenterici ed oculari (Charmichael, 2001).

Infine, altri metaboliti secondari quali la microviridina J e la β -N-methylamino-L-alanina (BMAA) sono classificate come cianotossine, nonostante il profilo tossicologico ed ecotossicologico sia poco conosciuto. Recentemente, la BMAA è stata associata a malattie neurodegenerative come l'Alzheimer, la sclerosi laterale amiotrofica ed il Parkinson (Murch *et al.*, 2004).

Cianotossine	Cianobatteri
Microcistine	<i>Microcystis spp, Planktothrix spp, alcune Anabaena, Nostoc e Synechocystis , Cyanobium bacillare, Arthrospira fusiformis, Limnothrix redekei, Phormidium formosum, Hapalosiphon hibernicus</i>
Nodularine	<i>Nodularia spumigena</i>
Anatossina-a	<i>Anabaena spp., alcune Aphanizomenon (A. flosaquae, A. issatschenkoi), Cylindrospermum, Microcystis, Planktothrix spp.e Raphidiopsis mediterranea</i>

Omoanatotossina-a	<i>Oscillatoria formosa, Raphidiopsis mediterranea</i>
Anatossina a-(s)	<i>Anabaena flos-aquae</i> and <i>A. lemmermannii</i>
Saxitossina	<i>Aphanizomenon, Anabaena, Lyngbya</i> and <i>Cylindrospermopsis</i> spp.
LPS	Tutti i cianobatteri
Microviridina J	<i>Microcystis</i> spp
β -N-methylamino-Lalanine	<i>Microcystis, Anabaena, Nostoc</i> and <i>Planktothrix</i> spp

Tabella 1. Cianobatteri produttori di tossine.

Le cianotossine, prodotte dal metabolismo secondario dei cianobatteri, sono endotossine che vengono rilasciate principalmente a seguito di lisi cellulare (Kenefick, 1993) o applicazioni di algicidi piuttosto che per escrezione diretta (Babica, 2006).

Una volta rilasciate, permangono nell'ambiente per un tempo variabile, in base alla resistenza ai processi di degradazione (es. fotolisi, idrolisi e degradazione batterica) e possono accumularsi negli organismi acquatici costituendo un pericolo per gli animali superiori e per l'uomo. Quest'ultimo può essere esposto alle cianotossine attraverso diverse vie, la principale delle quali è la via orale, a seguito di ingestione di alcuni alimenti (prodotti ittici, prodotti agricoli), di integratori alimentari (capsule e pillole contenenti estratti/liofili di cianobatteri), di acque potabili o di ingestione accidentale o involontaria di acque ad uso ricreazionale. Inoltre, l'esposizione alle cianotossine può avvenire anche attraverso la via cutanea e inalatoria od anche attraverso la via parenterale, quando

acque provenienti da corpi idrici superficiali vengono utilizzate per emodialisi; questa via di esposizione, pur essendo meno frequente ed interessando un gruppo specifico e ristretto di individui (i pazienti sottoposti al trattamento terapeutico), rappresenta, per le sue caratteristiche, un rischio elevato per i soggetti esposti.

Il ruolo ecologico delle cianotossine per l'ambiente acquatico rimane aperto e a tutt'oggi non è ancora completamente noto. Una delle diverse ipotesi è che i cianobatteri utilizzino le tossine prodotte come un meccanismo di difesa nei confronti dello zooplancton e delle specie competitive anche se non ci sono prove su questo sistema di difesa chimica (Wilson, 2007; Tillmanns, 2008). Recenti studi hanno infatti dimostrato che, non solo alcune specie di zooplancton sono in grado di coesistere con i cianobatteri e di crescere in loro presenza, ma anche che alcune specie sensibili possono sviluppare una forma di tolleranza una volta esposti ai cianobatteri tossici (Gustafsson *et al.*, 2005; Guo *et al.*, 2006).

Le cianotossine sono state riscontrate in tutto il mondo ma nello specifico, le più diffuse sono le microcistine che rappresentano il 40-75% delle fioriture cianobatteriche (Sivonen *et al.*, 1999).

Tra le microcistine la maggior parte dei dati disponibili riguarda uno dei diversi congeneri, la microcistina LR che, sulla base dei risultati di tossicità acuta, è una delle più epatotossiche.

1.3 Microcistine

Le microcistine appartengono alla classe delle cianotossine epatotossiche. Esse hanno un peso molecolare molto variabile (da 500 a 4000 Da) e dal punto di vista

chimico sono peptidi ciclici: sono costituiti da una serie di 7 aminoacidi, cinque non proteici e due proteici legati da legame peptidico e disposti in maniera ciclica. La loro struttura chimica generale è costituita da tre D-aminoacidi (D-alanina, D-eritro- β -metilaspartato e D-glutammato), la *N*-metildiidroalanina (Mdha), l'Adda, un aminoacido aromatico tipico dei cianobatteri, e due L-aminoacidi variabili X e Y, la cui presenza identifica alcuni tra i diversi congeneri conosciuti (oltre 80 varianti) (Sivonen *et al.*, 1999; McElhiney *et al.*, 2005) (**Figura 1**).

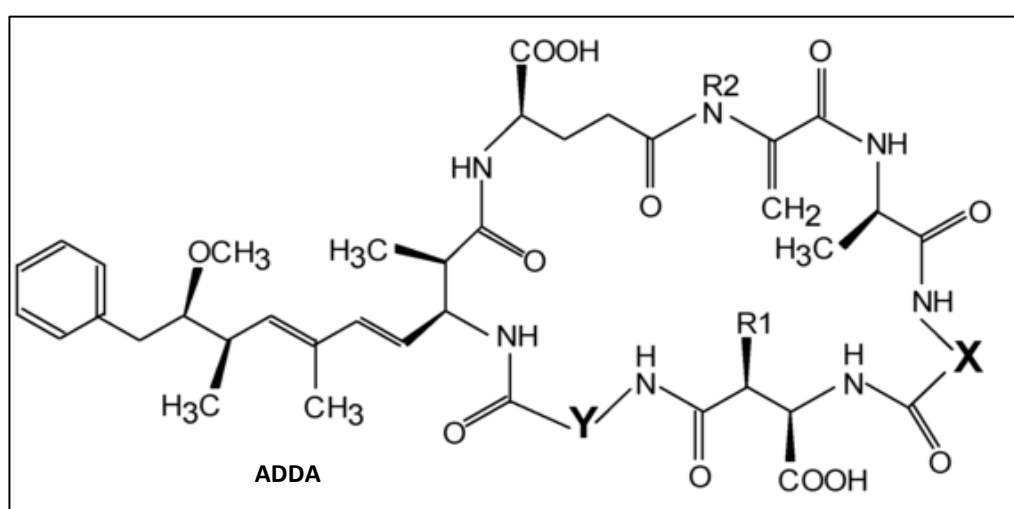


Figura 1. Struttura chimica generale delle microcistine; X e Y rappresentano i residui aminoacidici variabili

In genere il residuo *X* viene sostituito con leucina, arginina e tirosina ma anche con omotirosina, alanina, fenilalanina, omofenilalanina, metionina-*S*-ossido o triptofano mentre in *Y* si avvicendano l'arginina, l'alanina, il triptofano e la fenilalanina anche se non sono inconsueti l'acido amino-isobutirrico, l'omoarginina e la metionina-*S*-ossido. Sono inoltre possibili delle demetilazioni del residuo D-eritro- β -metilaspartato e Mdha (Carmichael *et al.*, 1988) (**Tabella**

2). In alcune varianti vi possono anche essere delle piccole modificazioni nel gruppo Adda o delle acilazioni del residuo glutammico e tali modifiche strutturali incidono a livello tossicologico diminuendone o addirittura annullandone la tossicità (Chorus *et al.*, 2000).

Nome	Aminoacido posizione X	Aminoacido posizione Y
Microcistina LA	Leucina (L)	Alanina (A)
Microcistina YR	Tirosina (Y)	Arginina (R)
Microcistina RR	Arginina (R)	Arginina (R)
Microcistina LR	Leucina (L)	Arginina (R)
Microcistina LW	Leucina (L)	Triptofano (W)
Microcistina LF	Leucina (L)	Fenilalanina (F)

Tabella 2. Esempi di alcune microcistine con i rispettivi aminoacidi sostituenti in posizione X e Y

Le microcistine sono solubili in acqua, metanolo ed etanolo mentre sono insolubili in acetone, etere, cloroformio e benzene. Sono molecole relativamente polari mentre il residuo Adda conferisce alla molecola una parziale idrofobicità.

Il nome microcistina è dato dal fatto che furono isolate per la prima volta dalla cianofitea *Microcystis aeruginosa*; tuttavia diversi generi di cianobatteri sono in grado di produrre le microcistine, quali *Microcystis* spp, *Planktothrix* spp, alcune *Anabaena*, *Nostoc*, *Synechocystis*, oltre ad alcune specie di *Cyanobium bacillare*, *Arthrospira fusiformis*, *Limnothrix redekei*, *Phormidium formosum*, *Hapalosiphon hibernicus*.

Studi condotti su *Microcystis aeruginosa* suggeriscono che le microcistine sono prodotte dai peptidi non ribosomiali (NPR), attraverso grandi complessi enzimatici multifunzionali comprendenti il peptide sintetasi non ribosomiale (PNR) e il polyketide sintasi (PKS) codificati dal gene mycS (microcistina) (Kaebernick *et al.*, 2002). Una volta prodotte, vengono rilasciate dalle cellule

cianobatteriche in seguito a morte cellulare. Sono tossine estremamente resistenti, in grado di resistere ad idrolisi ed ossidazione, che avvengono normalmente nei corpi idrici naturali, e possono persistere nell'acqua per un tempo relativamente lungo, compreso tra 21 giorni e 2-3 mesi e fino a 6 mesi nella schiuma secca (Jones *et al.*, 1995). Si può osservare una loro graduale diminuzione quando esiste una particolare combinazione di temperatura e pH: in condizioni di temperature elevate (40°C) e pH molto basso (<1) o molto alto (>10) la loro emivita è di circa 3 settimane (Harada *et al.*, 1996). Possono inoltre resistere a condizioni particolari quali la bollitura ma sono suscettibili alla degradazione da parte di batteri acquatici che si trovano normalmente nei fiumi e nei bacini (Jones *et al.*, 1994).

L'ingestione diretta di acqua potabile contaminata è la modalità di esposizione più frequente. Infatti, se l'acqua ingerita proviene da una riserva contenente fioriture cianobatteriche, è possibile che sia contaminata da tossine che vengono rilasciate durante la decomposizione cellulare (Chorus *et al.*, 1999). La presenza di tossine cianobatteriche è stata riscontrata in bacini idrici naturali di varie parti del mondo, costituendo un alto rischio per la salute umana legato sia ad un'esposizione di tipo acuto che cronico. Vari studi hanno infatti messo in luce la tossicità epatica della microcistina e una correlazione tra la sua assunzione e l'insorgenza di tumori epatici primari (Svirčev *et al.*, 2010).

Anche le piante coltivate per il consumo umano ed irrigate con acqua contaminata possono costituire un potenziale rischio per la salute legato al fatto che le microcistine vi si possono accumulare ed essere trasferite all'uomo attraverso la catena alimentare (Figueiredo *et al.*, 2004).

Un'altra importante via di esposizione è rappresentata dal consumo di prodotti della pesca. Cozze, gamberi e pesci possono infatti accumulare microcistine favorendo l'insorgenza di casi di tossinfezioni alimentari. Uno studio condotto su *Mytilus edulis* ha rilevato la capacità di accumulo nei tessuti dopo un trattamento per tre giorni con *M. aeruginosa* (Williams *et al.*, 1997). È stata inoltre rilevata la rapida capacità di accumulo della tossina da parte di *Mytilus galloprovincialis* ed una lentezza depurativa evidenziata dalla persistenza della contaminazione anche dopo la scomparsa della fioritura cianobatterica (Amorim *et al.*, 1999). In queste specie, la maggior parte delle microcistine (96%) si accumula nel tratto digestivo (Vasconcelos, 1995).

Anche i crostacei possiedono la capacità di accumulare microcistine provenienti da acque contaminate ed in tal caso gli organi maggiormente interessati nel processo di accumulo sono stomaco, epatopancreas, gonadi, muscoli e branchie (Chen *et al.*, 2005; Kankaanpaa *et al.*, 2005).

I pesci possono entrare in contatto con le microcistine tramite l'ingestione di Cianobatteri tossici, o alimenti contaminati ed, in minore misura, attraverso l'ingestione della tossina disciolta (Soares *et al.*, 2004). Gli studi eseguiti suggeriscono che il massimo accumulo delle microcistine avviene nel tratto digestivo dei pesci, ma una parte può essere riscontrata nelle branchie, nel fegato, nell'intestino, nei reni, nella cistifellea, nei muscoli e nel cervello (Baganz *et al.*, 1998; Magalhaes *et al.*, 2001). È noto che le microcistine tendono ad accumularsi maggiormente nell'intestino di specie planctofage e, a seguire, di specie onnivore e carnivore. La situazione si inverte per quanto riguarda l'accumulo nel fegato e

nel muscolo: i carnivori sono i maggiori accumulatori, seguiti da specie onnivore, planctofage ed erbivore, con una distribuzione all'apice della catena alimentare (Xie *et al.*, 2005; Cazenave *et al.*, 2005). Queste sono quindi le specie potenzialmente più pericolose considerando la pratica dell'eviscerazione prima del consumo umano.

Casi di tossicosi in seguito a contatto cutaneo con microcistine, sono stati segnalati nelle acque costiere del Giappone, Hawaii, Australia e Florida (Grauer *et al.*, 1961; Stewart *et al.*, 2006).

Per quanto riguarda la tossicosi per via inalatoria, in uno studio condotto da Fitzgeorge *et al.*, (1994), la somministrazione intranasale della microcistina LR (MC-LR) nei topi, ha determinato un'estesa necrosi dell'epitelio olfattivo e delle alte vie respiratorie e danni al fegato, dimostrando una maggiore sensibilità della via inalatoria rispetto alle altre.

Anche la via parenterale costituisce una possibile via di intossicazione da parte delle microcistine quando acque potenzialmente contaminate da cianobatteri vengono utilizzate per l'emodialisi. Un caso di intossicazione simile è avvenuto in Brasile, nella città di Caruaru nel 1996: un focolaio di intossicazione coinvolse 130 pazienti, 116 dei quali avvertirono disturbi visivi, nausea, vomito e debolezza muscolare; un centinaio di persone venne poi colpito da insufficienza epatica e 56 pazienti morirono a causa delle complicazioni (Azevedo *et al.*, 2002).

La tossicità delle microcistine è attribuita al gruppo Adda, il quale è in grado di legarsi covalentemente agli enzimi protein-fosfatasi, responsabili di una serie di processi regolatori essenziali per la cellula come la crescita, la sintesi proteica, il

metabolismo glicogenico e la contrazione muscolare (Falconer, 2005). Una volta all'interno delle cellule, le microcistine inibiscono gli enzimi serinatreonina proteinfosfatasi 1 e 2A (PP1 e PP2) alterando i processi di fosforilazione - defosforilazione, fondamentali per la regolazione dell'attività cellulare. Un ulteriore bersaglio delle microcistine, se presenti in alte concentrazioni, è la subunità β dell'ATP sintetasi, che determina apoptosi mitocondriale (van Apeldoorn *et al.*, 2007).

Infine è stato dimostrato che le microcistine aumentano lo stress ossidativo inducendo un aumento delle specie reattive dell'ossigeno con perdita di potenziale di membrana mitocondriale, permeabilità mitocondriale e attivazione della protein-chinasi II Ca^{2+} -calmodulina dipendente, tutti effetti che portano ad apoptosi cellulare (Mikhailov *et al.*, 2003).

1.4 Microcistina LR

La MC-LR viene prodotta principalmente da *M. aeruginosa* ma può essere prodotta anche da *M. viridis*, *Anabaena flos-aquae*, *Oscillatoria agardhii* e *Nostoc sp.* Ha un peso molecolare di 995.17 e i due L- aminoacidi variabili sono rappresentati da leucina e arginina. Nella **Tabella 3** sono illustrate le principali caratteristiche chimico-fisiche della MC-LR.

Proprietà	MC-LR
CAS (Chemical Abstract Service)	101043-37-2
Formula chimica	C ₄₉ H ₇₄ N ₁₀ O ₁₂
Peso molecolare	995
Stato fisico	Solido
Densità	1.29 g/cm ³
Solubilità in acqua	Elevata
Solubilità in altri solventi	Etanolo e metanolo

Tabella 3. Proprietà chimico-fisiche della microcistina LR.

La MC-LR è altamente idrofila, ed una volta ingerita per via orale non viene assorbita per trasporto passivo ma oltrepassa la mucosa intestinale grazie al sistema di trasporto degli anioni organici (OATP - Organic Acid Transporter Polypeptide), proteine transmembrana in grado di mediare il passaggio di una varietà di composti attraverso la membrana cellulare, come ad esempio sali biliari, steroidi, farmaci, peptidi e tossine (Cheng *et al.*, 2005; Fischer *et al.*, 2005;

Svoboda *et al* 2011]. Attraverso il circolo portale, la microcistina viene trasportata al fegato e veicolata all'interno degli epatociti dal sistema di trasporto degli acidi biliari. È stato dimostrato che la MC-LR interagisce con la subunità catalitica delle PP1 e PP2 attraverso un meccanismo a due fasi che prevede prima un rapido legame reversibile tra il gruppo Adda ed il gruppo glutamil-carbossilico delle PP ed inattivazione di queste ultime, poi, una lenta interazione di tipo covalente tra il gruppo Mdha della microcistina e il gruppo tiolico della cisteina 273 (PP1) o 266 (PP2A) (Fischer *et al.*, 2000; Martins *et al.*, 2009). L'inibizione dell'attività enzimatica causa l'iperfosforilazione delle proteine del citoscheletro, con conseguente alterazione della struttura intraepatica e compromissione della funzionalità organica.

Nonostante il meccanismo molecolare sia lo stesso, il danno prodotto da dosi elevate di esposizione si traduce in danni ai sinusoidi con conseguente emorragia intraepatica, mentre, a seguito di trattamenti ripetuti con piccole dosi di microcistina si dà inizio ad una cascata di eventi che porta a proliferazione cellulare ed ipertrofia epatica (Gehring, 2004).

Oltre agli effetti citotossici, la microcistina determina la deregolazione della divisione cellulare che sfocia in un'attività di promotore tumorale. Infatti, vari studi condotti sulla valutazione del possibile effetto cancerogeno della MC-LR, hanno dimostrato che quest'ultima non ha di per sé attività di iniziazione, ma presenta proprietà di promotore tumorale in alcuni modelli animali (Falconer, 1991; Nishiwaki *et al.*, 1992; Sekijima *et al.*, 1999).

Uno di questi studi è stato condotto su cellule derivate da embrioni di criceto trattate con microcistine estratte da *M. aeuruginosa*, dopo essere state esposte a basse dosi di 3-metilcolantrene (MCA), idrocarburo aromatico utilizzato come iniziatore tumorale. I risultati di questo studio hanno mostrato che le tossine aumentavano la trasformazione cellulare nelle cellule pretrattate con MCA ma non inducevano trasformazione in quelle non pretrattate, suggerendo un possibile ruolo per la MC-LR di promotore tumorale (Wanght *et al.*, 1996).

Sulla base dei dati disponibili, la International Agency for Research on Cancer (IARC) ha classificato la MC-LR come “possibile cancerogena per l’uomo” (gruppo 2B) a causa della sua provata attività di promotore tumorale (IARC, 2006).

In relazione a questo possibile effetto sulla salute umana, l’Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) ha predisposto una quantità limite di MC-LR nell’acqua da bere di 1 µg/L e stabilito una quantità di 0.04 µg/kg/die come dose giornaliera tollerata (TDI - “tolerable daily intake”) (WHO, 1998).

1.5 Aspetti tossicologici della MC-LR

La differente tossicità tra i congeneri delle microcistine dipende dalla composizione aminoacidica (Falconer, 2005). Le microcistine più tossiche sono quelle che possiedono uno o più L-aminoacidi idrofobici (MC-LA, MC-LR, MC-YM), mentre le meno tossiche sono quelle che possiedono uno o più aminoacidi idrofilici (MC-RR). Anche variazioni a carico del gruppo Adda possono

modificarne la tossicità, ad esempio la sua rimozione oppure la saturazione dei suoi doppi legami la rendono fortemente meno tossica (Gupta *et al.*, 2003). Tuttavia l'Adda di per se non è capace di inibire la PP1 e la PP2A e non mostra tossicità se iniettata per via intraperitoneale (i.p.) nei topi anche a dosi molto alte (Harada *et al.*, 2004).

I dati relativi alla LD₅₀ ottenuti mediante la somministrazione intraperitoneale di microcistine nel topo rivelano una tossicità acuta altamente variabile tra i diversi congeneri di microcistina (**Tabella 4**).

Tossina	LD50 i.p (µg/kg p.c.)	PM	Struttura
MC-LR	50	995	Cyclo-(D-Ala-L-Leu-D-MeAsp-L-Arg-Adda-D-Glu-Mdha-)
MC-RR	500	1037	Cyclo-(D-Ala- L-Arg -D-MeAsp-L-Arg-Adda-D-Glu-Mdha-)
MC-LA	50	909	cyclo-(D-Ala-L-Leu-D-MeAsp- L-Ala -Adda-D-Glu-Mdha-)
MC-YR	150-1200	1044	cyclo-(D-Ala- L-Tyr -D-MeAsp-L-Arg-Adda-D-Glu-Mdha-)
MC-YA	60-70	959	cyclo-(D-Ala- L-Tyr -D-MeAsp- L-Ala -Adda-D-Glu-Mdha-)

Tabella 4. Tossicità acuta in alcuni congeneri di microcistina (i differenti aminoacidi rispetto alla MC-LR sono indicati in grassetto (i.p.: intraperitoneale).

La DL50 di MC-LR, nel topo, dopo somministrazione per via intraperitoneale è di 50 µg/Kg di peso corporeo; tale valore aumenta notevolmente (5000 µg/Kg peso corporeo) quando la tossina viene somministrata per via orale e risulta essere ancora più elevato nel ratto (Fawell *et al.*, 1994; Fawell *et al.*, 1999). La minore tossicità della microcistina assunta per via orale è probabilmente da ricondurre alle caratteristiche tossicocinetiche della molecola. Tuttavia la via intraperitoneale non è pienamente rappresentativa delle reali condizioni di esposizione dell'uomo, ma ha solo un valore limitato ad una valutazione del rischio (Funari *et al.*, 2008).

Sono stati condotti vari studi volti all'individuazione della DL50 della MC-LR; tuttavia poiché una singola fioritura può contenere diverse microcistine, è difficile valutare la dose tossica di ciascun congenere. I dati riportati in letteratura indicano valori discordanti della DL50 della MC-LR, ottenuti nel ratto e nel topo, in seguito a somministrazione orale; in alcuni studi condotti sui topi si passa da un valore di 3000 mg/Kg p.c. (Fitzgeorg *et al.*, 1994) ad un valore di 5 mg/Kg p.c. (Fawell, 1999).

La tossicità delle microcistine è di tipo cumulativo, infatti, è stato osservato che una singola dose di microcistina somministrata per via orale non causa alcun incremento del peso del fegato, mentre, la stessa dose somministrata per una settimana determina un aumento del peso del fegato dell'84%, producendo un effetto 16 volte superiore ad una singola dose (Falconer *et al.*, 1991).

Tutti gli studi condotti sul topo hanno dimostrato che gli effetti tossici delle microcistine sono limitati quasi esclusivamente al fegato. Tuttavia, numerosi studi condotti sui pesci e su altri organismi acquatici esposti alle microcistine hanno rilevato che queste possono concentrarsi a diversi livelli determinando patologie a carico del fegato, dei reni e delle branchie. Tali patologie sono da mettere in relazione all'inibizione specifica delle proteinfosfatasi e ad altri effetti a cascata, come l'aumento dei valori degli enzimi epatici (Xie *et al.*, 2005). Altri studi, a seguito di immersione di pesci in acqua contenente microcistine, hanno evidenziato diminuzione dello sviluppo negli stadi giovanili (Malbrouck *et al.*, 2006) e cambiamenti comportamentali (Baganz, 2004), questi ultimi dovuti, probabilmente, all'abilità di queste tossine di attraversare la barriera emato-encefalica, veicolate da polipeptidi trasportatori di anioni. La tossicità delle microcistine nei pesci dipende dall'equilibrio tra accumulo e metabolismo, e le sensibilità specie-specifiche osservate sono state interpretate come il risultato di differenze anatomiche, fisiologiche e comportamentali tra i vari ordini ittici; anche le capacità di detossificazione attraverso la via della glutatione-S-transferasi dipendono da differenze specie-specifiche (Fischer *et al.*, 2000 ; Ito *et al.*, 2002; Cazenave *et al.*, 2005; Tencalla *et al.*, 1994).

Per quanto concerne la pericolosità delle microcistine, sia per l'uomo che per gli animali, sono stati riportati diversi incidenti nel tempo che hanno evidenziato la loro azione tossica.

Sicuramente, l'episodio più noto di esposizione umana alle microcistine è quello avvenuto a Caruaru (Brasile) nel 1996, già riportato in precedenza, dove morirono

diverse persone; analoga contaminazione, fortunatamente diagnosticata in tempo, è stata riscontrata nel 2001-2002 nei pazienti di quattro ospedali di Rio de Janeiro (Soares *et al.*, 2006).

Precedentemente, nel 1959 nella provincia di Saskatchewan (Canada), diverse persone, tra le quali 10 bambini, mostrarono segni di intossicazione con diarrea acuta e vomito a seguito di un bagno prolungato nelle acque di uno dei suoi laghi; successive analisi mostrarono una forte contaminazione cianobatterica. Nello stesso periodo morirono diverse vacche a seguito di un'ingestione acuta della stessa acqua (Dillenberg *et al.*, 1960).

In Inghilterra, nel 1989, due soldati mostrarono segni di pneumonia a seguito di un'uscita in canoa; successivamente altri 8 soldati presentarono diversi sintomi quali mal di gola, tosse secca, mal di testa, dolori addominali, vomito e vescicole alla bocca; successive indagini mostrarono nelle stesse acque la presenza di MC-LR (Turner *et al.*, 1990).

In Cina, negli anni 93-94, è stata messa in luce una correlazione tra la presenza di microcistine in uno stagno della città di Haimen e l'incidenza dei tumori primari al fegato (Yu *et al.*, 2001). Anche nella Serbia centrale, negli anni 80-90 prima ed in seguito negli anni 2000-2002, si osservò una fortissima incidenza di tumori primari al fegato a seguito di importanti fioriture nelle regioni di Toplicki, Niski e Sumadijski (Svircev *et al.*, 2009).

Nel 2007 in Argentina, si osservò un caso di uno sciatore d'acqua il quale manifestò una sintomatologia addominale con nausea, dolori colici, febbre e

problemi respiratori. Anche in questo caso venne riscontrata la presenza di MC-LR nelle acque (Giannuzzi *et al.*, 2011).

Tra il 2005 ed il 2009 uno studio condotto su 1332 bambini ha evidenziato una forte alterazione dei valori degli enzimi epatici. Dalle indagini risultò che questi bambini ingerivano normalmente acqua di pozzo e prodotti ittici provenienti da due laghi della regione di Three Gorges (China). Nelle acque oggetto di studio erano stati riscontrati alti livelli di microcistine. Inoltre è stato dimostrato che i bambini avevano assunto un totale di microcistine pari a 2.03 ug/kg/die (Li *et al.*, 2011).

Diversi incidenti sono stati segnalati anche per quanto riguarda gli animali domestici e selvatici. Tra i più recenti meritano di essere citati quelli avvenuti nel 2011 nello stato del Kansas (USA) e nei Paesi Bassi. Il primo caso riguardava un cane con insufficienza epatica, coagulopatia, necrosi epatica acuta, massiccia emorragia e necrosi tubulare renale (van de Merwe *et al.*, 2012), mentre, il secondo riguardava 3 cani, che a seguito di una nuotata nel lago Amstelmeer, presentarono vomito, letargia, difficoltà respiratorie, dolore addominale e morte entro le 24 ore (Lurling *et al.*, 2013). In tutti e due i casi venne accertata un'elevata presenza di microcistine nelle acque.

Anche in Spagna, nel 2004, si osservò una moria di uccelli acquatici erbivori, di migliaia di pesci e successivamente di migliaia di pesci piscivori appena due settimane dopo un'intensa fioritura di *M. aeruginosa* avvenuta nel Lago Los Ansaes. Gli studi eseguiti sugli animali morti evidenziarono un'abbondante

presenza di microcistine nel fegato dei pesci e degli uccelli e nelle piante (Lopez *et al.*, 2008).

Infine, nel Colorado del Sud, sono stati riscontrati diversi casi di intossicazioni anche nel bestiame: 24 manze morirono improvvisamente dopo aver mostrato segni di anoressia e ipersensibilità al rumore. Anche in questo caso è stata riscontrata la presenza di MC-LR nel fegato (Puschner *et al.*, 1998).

1.6 Epidemiologia

Come illustrato in **Figura 2** e nella **Tabella 5**, la presenza di fioriture di Cianobatteri è stata documentata in tutto il mondo (Zurawell *et al.*, 2005).



Figura 2. Luoghi in cui è stata accertata la presenza di microcistine.

Continente	Paese
------------	-------

Tiziana Sedda –“Ricerca di Microcystin LR in molluschi bivalvi e nel loro habitat in alcune zone della Sardegna” – Tesi di Dottorato in Scienze Veterinarie – Università degli Studi di Sassari

Europa	Belgio, Danimarca, Estonia, Finlandia, Francia, Germania, Gran Bretagna, Grecia, Ungheria, Irlanda, Italia, Lettonia, Norvegia, Olanda, Polonia, Portogallo, Repubblica Ceca, Russia, Slovacchia, Slovenia, Spagna, Svezia, Svizzera, Turchia, Ucraina
America	Argentina, Bermuda, Brasile, Canada, Cile, Messico, USA (27 Stati), Venezuela
Asia	Arabia Saudita, Bangladesh, Corea del Sud, Filippine, India, Israele, Giappone, Giordania, Malesia, Nepal, Cina, Sri Lanka, Thailandia, Vietnam
Australia	Australia, Nuova Caledonia, Nuova Zelanda
Africa	Botswana, Egitto, Etiopia, Kenia, Marocco, Sud Africa, Zimbabwe

Tabella 5. Paesi nei quali sono state segnalate fioriture cianobatteriche

In Italia ogni anno gli invasi di diciannove regioni su venti sono interessati da fioriture di Cianobatteri tossici con produzione di biotossine epatotossiche o neurotossiche (Bruno et al., 2009). La maggior parte dei laghi artificiali della Sardegna (circa 40), le cui acque sono destinate al consumo umano, è interessata da un elevato stato trofico (eutrofia e ipertrofia) e dalla presenza di massicce fioriture di cianobatteri potenzialmente tossici che si ripetono soprattutto nei mesi estivi. Per esempio, fioriture di *Microcystis aeruginosa* avvenute nel 1991, nel Lago Liscia in Sardegna, furono causa di morie di pesci; le stesse fioriture sono state riscontrate nuovamente nel 2000 nella stessa zona e nel 1998 sempre in

Sardegna nel Lago Cedrino, nelle Marche nel Lago Polverina e nel lago Liscione in Molise nel 1991.

Studi limnologici condotti dal 1978 sui laghi artificiali siciliani hanno permesso di individuare una serie di corpi idrici nei quali si sono manifestate fioriture di specie potenzialmente tossiche.

Anche nell'Italia settentrionale sono stati riscontrati casi di fioriture di Cianobatteri tossici. Nel lago di Iseo, a metà agosto del 1997, si verificò un'importante fioritura di *Anabaena flos-aquae* durata fino alla fine di settembre. Due anni dopo, un'estesa fioritura di *Planktothrix rubescens* si è sviluppata nel mese di giugno fino ad estate inoltrata ed a fine agosto è stata in parte sostituita da *Anabaena flos-aquae* che dalla superficie del lago è stata poi spinta dai venti lungo la riva.

Inoltre, dalla metà degli anni novanta il Lago di Massaciuccoli (Toscana) è interessato dalla presenza di *Microcystis aeruginosa*. Nello stesso lago, nel 2003, sono stati registrati livelli di microcistine fino a 160 µg/L in acqua, mentre valori ben più elevati sono stati riscontrati nell'epatopancreas di esemplari appartenenti alla specie *Mugil cephalus* e nella porzione cefalica del gambero di acqua dolce *Procambrus clarkii* (Mattei *et al.*, 2008).

In **Figura 3** (Mattei *et al.*, 2008) viene riportata la distribuzione dei Cianobatteri nelle varie regioni italiane, secondo le segnalazioni riportate in letteratura nei diversi anni.

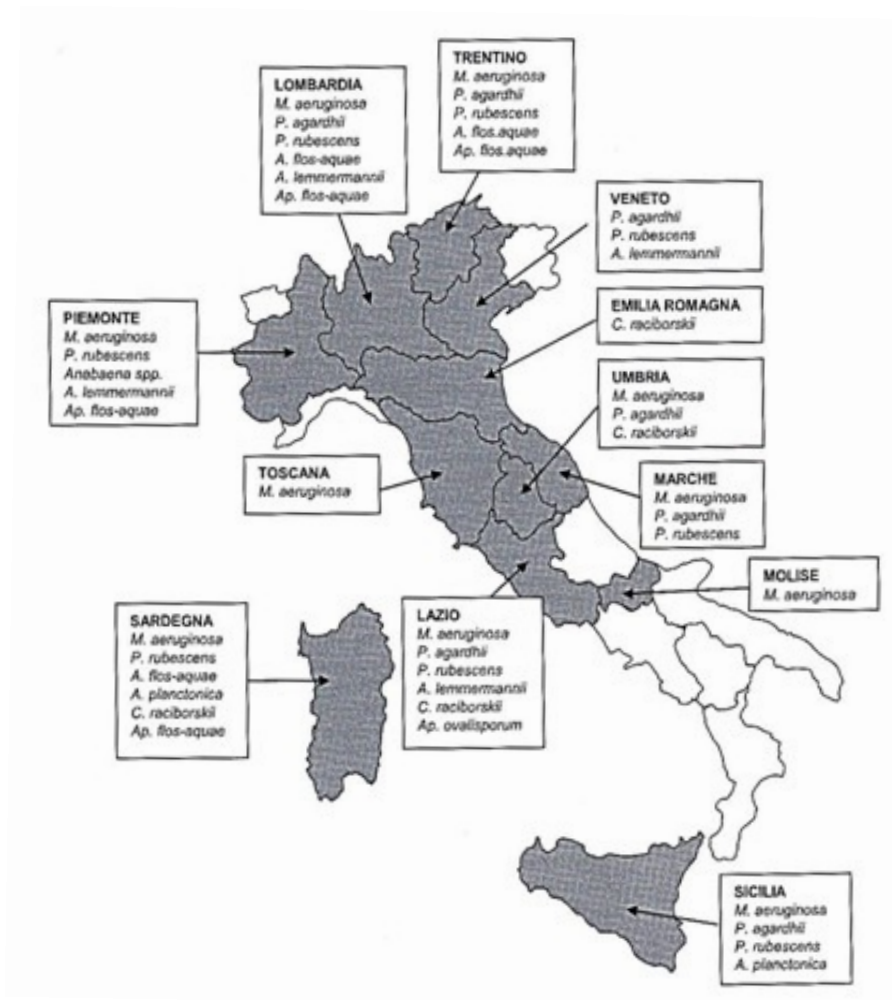


Figura 3. Distribuzione dei cianobatteri nelle varie regioni italiane

1.7 Aspetti normativi

La contaminazione da cianobatteri è un valido esempio di come un problema tipicamente ambientale possa diventare anche un problema di sicurezza alimentare, sia per la presenza delle cianotossine nell'acqua potabile, sia per la loro capacità di accumulo negli alimenti.

Tiziana Sedda –“Ricerca di Microcystin LR in molluschi bivalvi e nel loro habitat in alcune zone della Sardegna” – Tesi di Dottorato in Scienze Veterinarie – Università degli Studi di Sassari

Nell'attuale normativa nazionale ed europea non vengono indicati valori soglia che definiscono la qualità delle acque destinate al consumo umano sulla base della densità di cellule cianobatteriche per volume d'acqua o sulla base delle tossine da esse prodotte.

Tuttavia, vari Paesi europei e non, hanno focalizzato la propria attenzione sulle microcistine prodotte da *M. aeruginosa* e *P. agardhii* in quanto considerate come la più importante causa di possibili danni per la salute umana causati da Cianobatteri adottando come valore di riferimento il valore guida provvisorio di 1 µg/L per la microcistina LR nell'acqua potabile, valore fissato nel 1998 dall'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS).

Per quanto riguarda invece l'esposizione alle microcistine attraverso il consumo di alimenti (es. prodotti ittici), non esistono ad oggi limiti di riferimento .

In Italia, il decreto legislativo 31/2001 del 2 febbraio recepisce la direttiva europea 98/83/CE e stabilisce i parametri di qualità per le acque destinate al consumo umano. Il decreto non include in maniera diretta i cianobatteri e le cianotossine tra i microrganismi da ricercare nelle acque, tuttavia nell'articolo 4 è sancito che tali acque *“non devono contenere microrganismi e parassiti, né altre sostanze, in quantità o concentrazioni tali da rappresentare un potenziale pericolo per la salute umana”*. Nel decreto si specifica, comunque, che le autorità sanitarie competenti, devono assicurare *“una ricerca supplementare, caso per caso, delle sostanze e dei microrganismi per i quali non sono stati fissati valori di parametro a norma, qualora vi sia motivo di sospettare la presenza in quantità o concentrazioni tali da rappresentare un potenziale pericolo per la salute umana”*.

Il campo applicativo del decreto si estende quindi anche a microrganismi potenzialmente pericolosi che non sono specificati per taxa o genere, come nel caso dell'eterogeneo gruppo dei cianobatteri e delle loro tossine.

2. SCOPO DEL LAVORO

Tiziana Sedda –“Ricerca di Microcystin LR in molluschi bivalvi e nel loro habitat in alcune zone della Sardegna” – Tesi di Dottorato in Scienze Veterinarie – Università degli Studi di Sassari

È parere comune che lo sviluppo massivo e la diffusione crescente dei cianobatteri negli ambienti acquatici è un fenomeno fortemente legato anche a fattori riconducibili all'attività umana che, con i suoi interventi, ha favorito il processo di eutrofizzazione delle acque.

La pericolosità dei cianobatteri è da ricercarsi *in primis* nella loro capacità, in particolari situazioni climatiche ed ambientali, di produrre metaboliti secondari che possono rivelarsi estremamente tossici per l'uomo unitamente alla possibilità che queste molecole possano entrare all'interno della catena alimentare sfruttando il proprio potenziale di accumulo nelle acque e nei prodotti della pesca.

Tra le cianotossine è sicuramente la microcistina-LR a rivestire un ruolo importante sia per diffusione che per tossicità in quanto gli studi condotti su questa molecola hanno rivelato la sua pericolosità in seguito ad un'esposizione sia di tipo acuto che cronico rivelando, inoltre, un potenziale effetto cancerogeno a livello epatico.

Alcuni studi recenti effettuati sia a livello nazionale che regionale, hanno messo in luce la ricorrente e sempre maggiore proliferazione dei cianobatteri nei bacini idrici della Sardegna con una prevalenza del genere *Microcystis* spp., *Planktothrix* spp e *Anabaena* spp (Mattei *et al.*, 2008), tutte specie produttrici di microcistine.

Scopo dello studio è stato quello di valutare l'eventuale presenza di microcistina LR in alcuni molluschi bivalvi e nel loro habitat in alcune zone lagunari della Sardegna. In particolare, la ricerca è stata effettuata in *Mytilus galloprovincialis*, in *Tapes decussatus* ed in acque provenienti dallo stagno di Calich, dallo Stagno di Cabras e dallo Stagno di Tortoli. La scelta dei tre siti lagunari è legata al loro

importante ruolo sia dal punto di vista naturalistico sia per la produzione e la commercializzazione dei prodotti ittici a livello locale e regionale. Nei tre siti oggetto dello studio sono presenti banchi naturali o allevamenti di molluschi bivalvi vivi i quali, oltre ad essere un importante risorsa economica locale, possono essere validi bioindicatori della qualità ambientale.

Lo stagno di Calich, è situato in un'area di notevole interesse naturalistico che però negli anni ha subito un crescente processo di eutrofizzazione delle acque, legato in parte ad un aumento dei nutrienti provenienti dalle aree urbane ed agricole localizzate intorno al sito.

Lo stagno di Cabras, la più estesa superficie stagnale della Sardegna, ricopre un ruolo fondamentale nella vita quotidiana della zona in quanto la tradizionale attività di pesca è un'importante fonte di sostentamento per un'intera comunità che popola l'area circostante. Il sito presenta un elevato livello trofico, sfociato in una drammatica crisi distrofica verificatasi a partire dal 1999 e che puntualmente si manifesta ancora oggi con la riscontrata presenza delle *Cyanophyceae*.

Lo stagno di Tortoli, tra i più produttivi della Sardegna, non è stato direttamente coinvolto da significative fioriture, tuttavia nelle acque dolci di bacini idrici circostanti è stata riscontrata una comunità cianobatterica ricca ed estremamente variabile ed in particolare è stata rilevata la presenza di *M. botrys*, specie produttrice di MC-LR.

Questo progetto è nato a seguito di un periodo di studio condotto negli Stati Uniti presso la UC Davis University of California Davis ed in particolare presso

l'Institute of Aquatic Toxicology of Veterinary Medicine. Durante tale periodo, sono stati effettuati una serie di campionamenti di acque in specifiche aree del Sacramento-San Joaquin River Delta, un bacino idrico di fondamentale importanza per il territorio, poiché rappresenta il 60% della fornitura idrica dell'intero Stato californiano, spesso oggetto di intense fioriture cianobatteriche soprattutto del genere *Microcystis*. I campioni d'acqua prelevati, sono stati utilizzati per effettuare delle prove di tossicità su embrioni di pesci appartenenti alla specie *Oryzias latipes*, al fine di valutare eventuali effetti tossicologici *in vivo*. A tale scopo sono state valutate sia la mortalità che le anomalie fenotipiche degli embrioni esposti alle *Microcystis* spp.

3. PARTE I

Studi condotti negli Stati Uniti

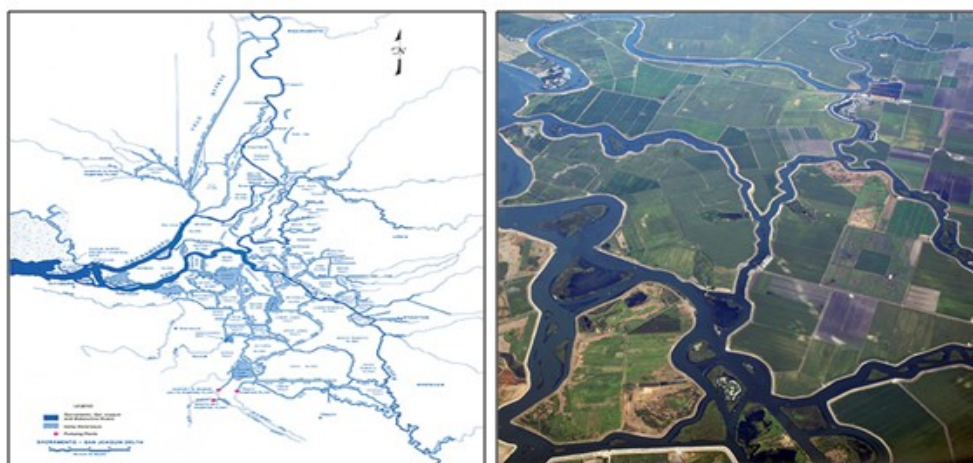
3.1 Premessa

Da alcuni anni nello Stato della California si assiste ad una carenza d'acqua dovuta ad un drastico calo dei fenomeni piovosi. In particolar modo, nel 2014, si è manifestata la più grande siccità mai registrata nella zona. Tra le gravi conseguenze che una situazione così critica può comportare, si è verificato un fortissimo incremento delle fioriture cianobatteriche. La relazione tra lo sviluppo dei cianobatteri e la diminuzione della quantità d'acqua nei bacini idrici, è da attribuire al lento ricambio delle acque e ad una maggiore concentrazione dei nutrienti disciolti; inoltre, la presenza di correnti d'aria sempre più calde, come conseguenza del surriscaldamento globale, favorisce sia la stratificazione dei nutrienti che la riduzione della miscelazione verticale delle acque. A partire dal 1999, il Sacramento-San Joaquin River Delta uno tra i più importanti bacini idrici è stato interessato da ripetute fioriture di *M. aeruginosa* che hanno avuto un andamento crescente negli anni raggiungendo il loro massimo sviluppo nel 2014 (Lehman *et al.*, 2014). Ciò ha determinato un significativo aumento di microcistine con un fortissimo impatto sulla salute pubblica e sull'equilibrio ecologico di una vasta area.

3.1.1 Fioriture del genere *Microcystis* in California (USA): il caso del Sacramento – San Joaquin River Delta

Il Sacramento-San Joaquin River Delta è un esteso estuario situato nell'estremità occidentale della California Central Valley, a poche miglia a sud di Sacramento, formato dalla confluenza dei fiumi Sacramento e San Joaquin. Il Delta, la cui superficie totale è di 2800 Km², ha un'importanza notevole per la popolazione e per le attività agricole della zona in quanto più di 20 milioni di persone e 4,5 milioni di acri di terreno ricevono le sue acque come fonte di approvvigionamento idrico (Jassby, 2008).

Si tratta di un mosaico di circa 60 isole (**Figura 4**), circondate da canali naturali, artificiali e da paludi. Ospita circa 750 specie diverse di animali e piante. Rappresenta, inoltre, il collegamento più importante nel sistema di approvvigionamento idrico della California: due grandi progetti idrici, il the State Water Project (SWP) ed il Central Valley Project (CVP), hanno permesso di trasportare le sue acque verso le aride zone del sud della California.



Tiziana Sedda –“Ricerca di Microcystin LR in molluschi bivalvi e nel loro habitat in alcune zone della Sardegna” – Tesi di Dottorato in Scienze Veterinarie – Università degli Studi di Sassari

Figura 4. Sacramento-San Joaquin River Delta (California, USA)

Il Delta ha subito negli anni un imponente eutrofizzazione delle acque con ricorrenti ed abbondanti fioriture cianobatteriche a seguito delle quali si sono verificati frequenti casi di intossicazione umana ed imponenti morie di pesci.

Considerata la notevole importanza del sito, il governo californiano finanzia numerosi enti che attuano un sistema continuo di monitoraggio e di studio della zona. L'University of California Davis nell'ambito dell'Aquatic Health Program ed in collaborazione con il California Department of Water Resource effettua periodici campionamenti d'acqua provenienti dal Sacramento-San Joaquin River Delta con lo scopo di tutelare la salute pubblica e quella degli organismi viventi che popolano l'area.

Nell'ambito di questo progetto l'acqua campionata, e già sottoposta ad indagini specifiche volte alla ricerca della *Microcystis aeruginosa* (Kurobe *et al.*, 2015) , è stata utilizzata per condurre delle prove di tossicità *in vivo* sui Medaka andando a valutare la mortalità e le anomalie fenotipiche sull'accrescimento embrionario a seguito dell'esposizione.

3.1.2 I Medaka (*Oryzias latipes*) come modello di tossicità

Il Medaka (**Figura 5**) o Japanese Ricefish (*Oryzias latipes*) è un piccolo pesce appartenente alla famiglia *Adrianichthyidae*. E' diffuso nelle risaie, nelle paludi e in molti stagni del Giappone, della Cina, della Corea e del Vietnam. Si presenta con un corpo snello e allungato, minuto, con occhi grandi, profilo dorsale

Tiziana Sedda –“Ricerca di Microcystin LR in molluschi bivalvi e nel loro habitat in alcune zone della Sardegna” – Tesi di Dottorato in Scienze Veterinarie – Università degli Studi di Sassari

orizzontale e ventre poco pronunciato. La pinna dorsale è molto arretrata, così come le pinne ventrali e la pinna anale di forma trapezoidale. La pinna caudale è a forma di delta e raggiunge una lunghezza massima di poco superiore ai 3 cm. È un pesce molto resistente, in grado di adattarsi ad ampi intervalli di temperatura (6-40°C). Viene ampiamente utilizzato in molti settori della ricerca biologica, in particolare in studi di tipo tossicologico per le sue particolari caratteristiche tra le quali il breve periodo di gestazione, la prolificità (una femmina può deporre fino a 40 uova), la resistenza ad ampie variazioni ambientali e la brevità del suo genoma che è notevolmente ridotto rispetto a quello dello Zebrafish (*Danio rerio*), altro modello ampiamente utilizzato ai fini della ricerca scientifica.



Figura 5. Medaka (*Oryzias latipes*)

3.2 Materiali e metodi

3.2.1 Medaka Toxicity Test

Tiziana Sedda –“Ricerca di Microcystin LR in molluschi bivalvi e nel loro habitat in alcune zone della Sardegna” – Tesi di Dottorato in Scienze Veterinarie – Università degli Studi di Sassari

Durante lo stage svolto presso la UC Davis-University of California sono stati prelevati 9 campioni di acqua da altrettanti siti appartenenti al Sacramento-San Joaquin River Delta. Le stazioni di prelievo con le relative abbreviazioni sono indicate nella **Figura 6**.

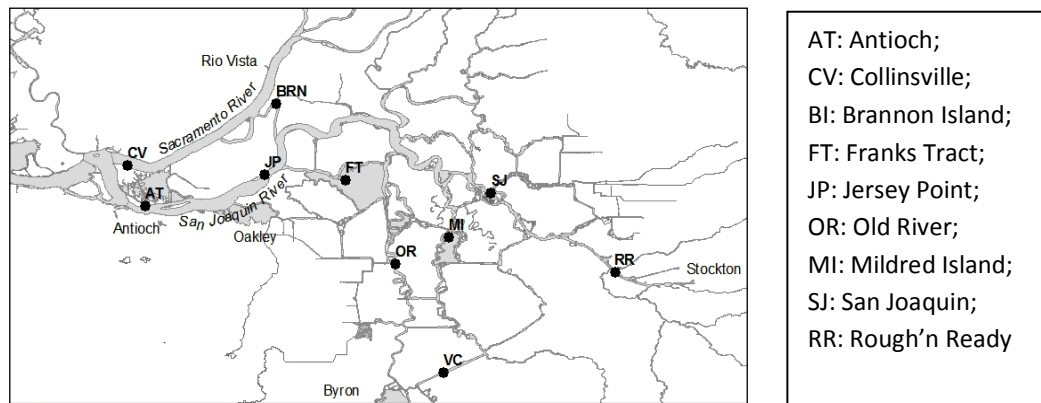


Figura 6. Siti di campionamento delle acque.

L'acqua veniva filtrata utilizzando filtri in fibra di vetro (diametro di 0,22 micron) in modo da separare la componente cellulare da quella acquosa. Dopo la filtrazione i campioni, opportunamente etichettati, venivano conservati in appositi contenitori di vetro dotati di chiusura a vite e conservati ad una temperatura < 10 °C in attesa di effettuare la raccolta delle uova di Medaka per poter effettuare il test tossicologico. Come controllo veniva utilizzata la Reconstituted Water preparata secondo le linee guida della US Environmental Protection Agency (US EPA).

Circa 700 uova di Medaka venivano raccolte dai tank di allevamento (**Figura 7a**) attraverso l'utilizzo di un sifone a maglie strette in grado di trattenere le uova e far scorrere l'acqua (**Figura 7b**).

Tiziana Sedda –“Ricerca di Microcystin LR in molluschi bivalvi e nel loro habitat in alcune zone della Sardegna” – Tesi di Dottorato in Scienze Veterinarie – Università degli Studi di Sassari

Le uova, subito dopo la raccolta venivano prima sciacquate con acqua salata (1% NaCl, 30~40 ml) al fine di eliminare eventuali parassiti o funghi, quindi colorate.

La colorazione prevedeva l'utilizzo di una soluzione contenente 0.10 g NaCl, 0,03 g KCl, 0.04 g CaCl, 0.16 g MgSO₄, alcune gocce di blu di metilene e 100 ml di acqua deionizzata; qualche minuto dopo l'applicazione si poteva notare una netta differenza tra le uova non fertili (colorate di blu) e quelle fertili (brillanti e trasparenti) (**Figura 7c-7d**).

200 µl di ciascun campione di acqua filtrata, venivano collocati all'interno dei pozzetti di una piastra per microtitolazioni (**Figura 7e**). I pozzetti restanti, venivano riempiti con acqua di controllo. Successivamente, in ciascun pozzetto veniva collocato un embrione (**Figura 7f**). L'esperimento veniva ripetuto su 4 piastre per un totale di 32 embrioni per filtrato.

L'esperimento è stato condotto per 14 giorni consecutivi e quotidianamente sono state annotate l'eventuale schiusa delle uova, mortalità ed anomalie fenotipiche.

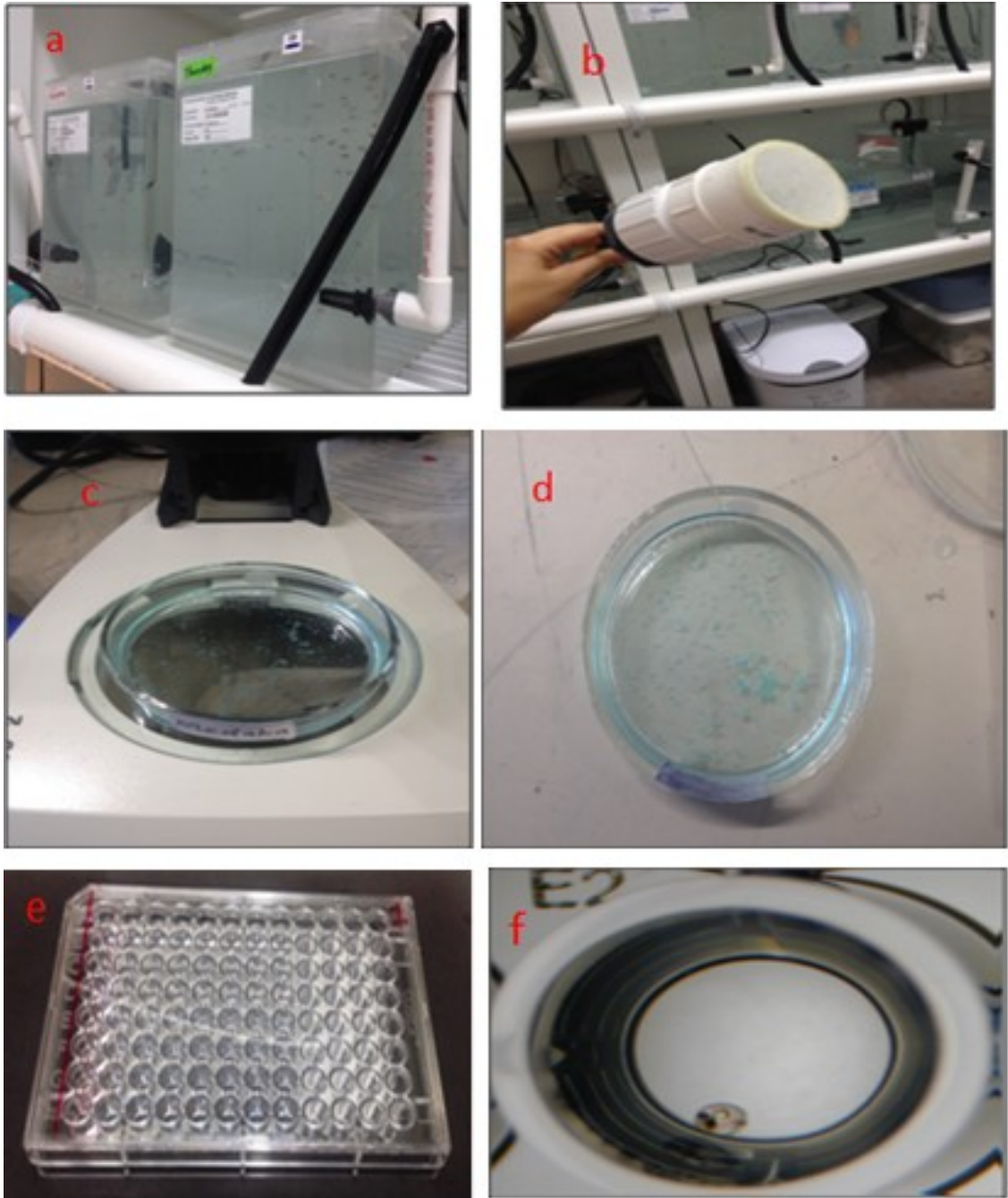


Figura 7: a, tank contenenti i Medaka; b, sifone per la raccolta delle uova; c-d aspetto delle uova in seguito alla colorazione; e, piastra per micro titolazioni; f, pozzetto contenente un uovo di Medaka.

Tiziana Sedda –“Ricerca di Microcystin LR in molluschi bivalvi e nel loro habitat in alcune zone della Sardegna” – Tesi di Dottorato in Scienze Veterinarie – Università degli Studi di Sassari

3.3 Risultati

I risultati sulla mortalità dei pesci esposti all'acqua dei nove siti presi in esame sono stati espressi in percentuale (**Tabella 6**). Nel mese di Agosto 2014 l'acqua proveniente da quattro siti dei nove analizzati induceva una mortalità $> 90\%$ (JP, OR, SJ, RR) mentre i campioni provenienti da altri tre siti causavano una mortalità $> 80\%$ (BI, FT, MI). I pesci esposti all'acqua dei restanti due siti oggetto di campionamento (AT, CV) mostravano, invece, un mortalità \leq al 10%.

Nel mese di Settembre la percentuale di mortalità riscontrata era $> 90\%$ nei Medaka esposti all'acqua proveniente dai siti siglati BI, OR ed MI con un incremento del 3% della mortalità nel sito OR rispetto al mese di agosto e del 9% e 10% nei siti BI ed MI rispettivamente. Due siti (FT, SJ) su nove causavano una percentuale di mortalità $> 80\%$ con un leggero aumento rispetto ai dati registrati nel mese di Agosto per il sito FT (4%) ed una diminuzione del 10% per il sito SJ. Le acque provenienti dai siti JP e RR causavano una mortalità superiore al $>70\%$, con una diminuzione rispetto al mese precedente del 20% e 19% rispettivamente. Infine, i campioni dei siti AT e CV presentavano dei dati in linea con la precedente somministrazione con una percentuale di mortalità $< 10\%$ (6% per i pesci esposti alle acque del sito AT e 3% per quelli esposti alle acque del sito CV).

Sito di campionamento (sigla)	Agosto 2014 Mortalità %	Settembre 2014 Mortalità %
AT	10	6
CV	3	3
BI	88	97
FT	84	88
JP	97	77
OR	94	97
MI	87	97
SJ	94	84
RR	97	78
Controllo	0	3

Tabella 6. Mortalità degli *Oryzias latipes* esposti ad acque contenenti fioriture di *Microcystis spp*

Le anomalie fenotipiche riscontrate negli embrioni erano varie e diversamente distribuite. L'alterazione maggiormente riscontrata (90% dei casi), nei trattati rispetto ai controlli, è stata una modificazione della colorazione dell'embrione e del guscio dell'uovo (**Figura 8a**) che da un aspetto tipicamente trasparente e brillante (**Figura 8f**) passava ad una colorazione giallastra.

Alcune uova mostravano, con una frequenza relativamente bassa (<3%) l'estrusione dell'intero corpo embrionale dall'uovo (**Figura 8b**) prima del completamento dello sviluppo embrionale, evento probabilmente riconducibile ad una maggiore sottigliezza del guscio dell'uovo. Probabilmente sempre a causa

dell'assottigliamento del guscio, si osservava l'estrusione del solo tuorlo (<5%) **(Figura 8c)**.

In meno della metà dei trattati si osservava la crescita di batteri intorno al guscio dell'uovo **(Figura 8d)** mentre, con una frequenza molto bassa (<1%) si osservava una mancata differenziazione dei tessuti ad eccezione del cuore **(Figura 8e)**. Gli embrioni di controllo mostravano invece un accrescimento nella norma, con una colorazione delle uova brillante e trasparente tipica di questa specie **(Figura 8f)**.

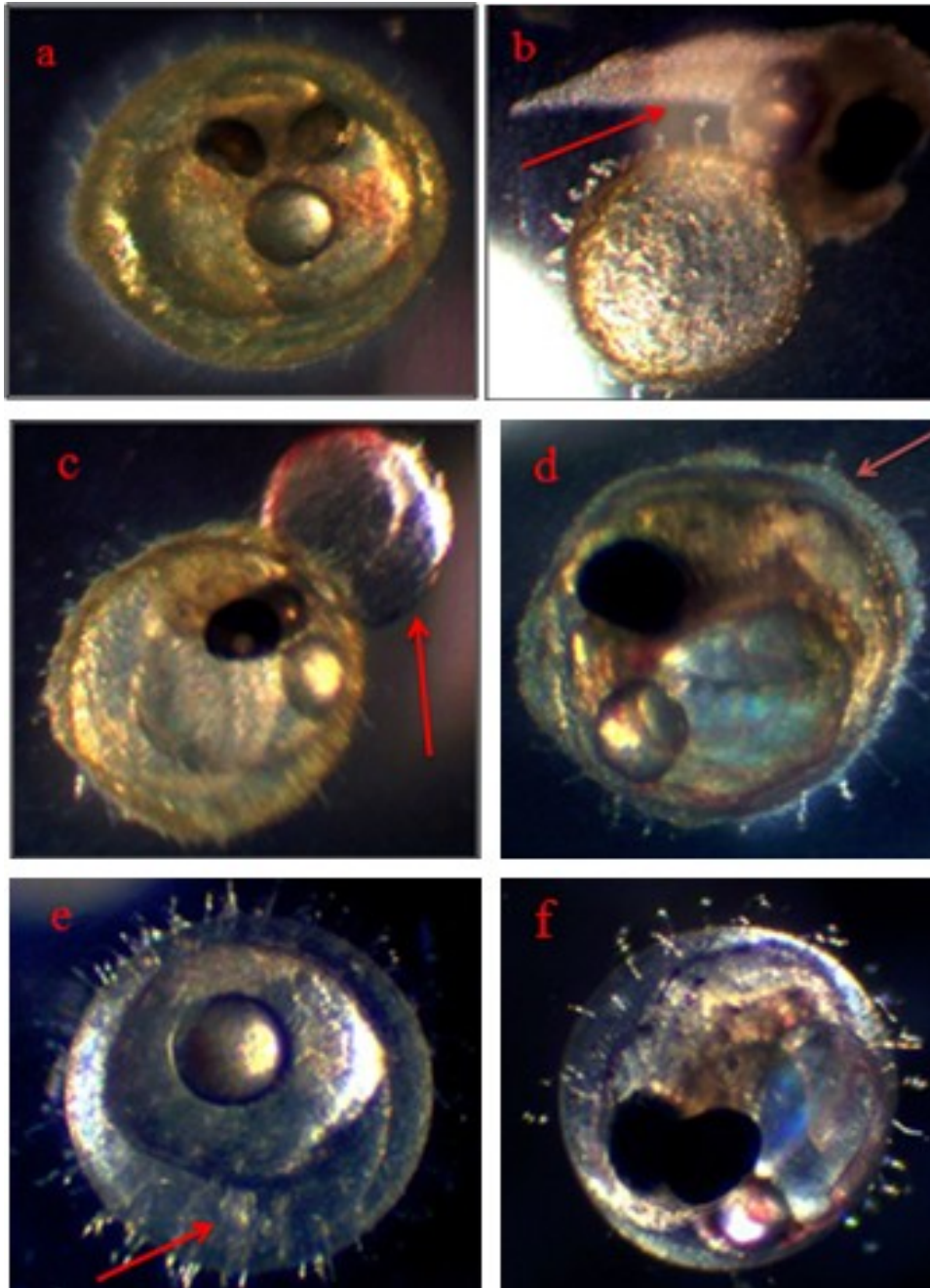


Figura 8. Anomalie fenotipiche nelle uova di Medaka esposte ai campioni di acqua prelevati nei diversi siti del Sacramento-San Joaquin River Delta.

a 5° giorno sito BI; **b** 5° giorno sito JP; **c** 5° giorno sito SJ; **d** 8° giorno sito SJ; **e** 8° giorno sito SJ; **f** 8° giorno embrione di controllo.

4. PARTE II

Studi condotti in Sardegna

4.1 Premessa

Il commercio ed il consumo di molluschi bivalvi vivi ha registrato un sostanziale incremento, sia a livello regionale che nazionale. Di fatto questa attività rappresenta un'importantissima linea produttiva dell'acquacoltura regionale, nella quale trovano grande spazio l'allevamento e la produzione di *Mytilus galloprovincialis* e *Tapes decussatus*. Uno studio della Regione Sardegna ha stimato una produzione di 7000 T/anno di molluschi di cui i mitili rappresentano il 5% della produzione nazionale (LAORE, 2009). Oltre all'importanza dal punto di vista economico e produttivo, i molluschi bivalvi comprendono specie che frequentemente vengono scelte come indicatori di qualità ambientale con il ruolo di organismi sentinella. Infatti, proprio per le loro caratteristiche fisiologiche sono in grado di filtrare grandi volumi d'acqua e concentrare nei propri tessuti una varietà di sostanze riflettendo così le caratteristiche qualitative dell'ambiente in cui vivono.

Generalmente i luoghi più idonei per le attività di allevamento e di produzione dei molluschi sono le zone intertidali, gli estuari e le zone costiere poco profonde.

La scelta di lagune costiere è da ricondursi al fatto che sono degli ecosistemi altamente sensibili alle modificazioni ambientali, il cui equilibrio ecologico è basato sui continui scambi che avvengono tra acqua dolce ed acqua salata, scambi in grado di influire su una grande varietà di parametri ambientali quali

temperatura, salinità, pH ed ossigeno disciolto; questi parametri, unitamente agli interventi antropici, possono promuovere lo sviluppo di specie cianobatteriche.

4.1.1 Molluschi oggetto di studio: *M. galloprovincialis* e *T. decussata*

I molluschi bivalvi, animali a simmetria bilaterale, appartengono al *Phylum Mollusca* che annovera il più alto numero di specie, circa 100.000 secondo gli esperti. Comprende sette classi: *Monoplacophora*, *Aplacophora*, *Polyplacophora*, *Scaphopoda*, *Cephalopoda*, *Gastropoda*, *Bivalvia* di cui le ultime tre sono quelle che interessano i prodotti della pesca commercializzati, comunemente denominati Molluschi Cefalopodi, Molluschi Gasteropodi e Molluschi Bivalvi (o Lamellibranchi Eduli).

Di queste diverse classi, quella dei Molluschi Bivalvi assume una particolare importanza per quanto riguarda gli studi sull'interazione organismo-ambiente acquatico in quanto comprende specie prevalentemente bentoniche o comunque generalmente sedentarie.

I bivalvi sono caratterizzati dalla costante presenza di una conchiglia composta da due valve, da cui il nome, le quali si articolano tra loro in una zona detta cerniera, fiancheggiata da ciascun lato dall'umbone, area rilevata che costituisce la parte più vecchia di ciascuna valva. La cerniera, o articolazione delle valve, è un sistema a ingranaggio nel quale i denti di una delle valve penetrano in un incavo dell'altra. Nei mitili, la cerniera è molto ridotta e le valve sono unite quasi esclusivamente dal legamento, che ha l'aspetto di una banda brunastra che corre lungo la cerniera. Il legamento, è fissato ai bordi dorsali delle valve e grazie alla

sua elasticità e alla sua posizione intercalare consente l'apertura delle valve. Le valve si aprono e si chiudono grazie all'azione dei muscoli adduttori, normalmente in numero di due. Essi agiscono in antagonismo con il legamento elastico: mentre la chiusura delle valve è attiva, dovuta alla contrazione dei muscoli adduttori, l'apertura della conchiglia è determinata passivamente dal legamento elastico, per cui dopo la morte gli animali rimangono generalmente con le valve aperte.

Il mantello o pallio è formato da un tessuto a struttura molle che avvolge i visceri del mollusco (**Figura 9**). I margini ventrali possono essere più o meno fusi a seconda della specie, presentando però sempre una apertura inalante, attraverso la quale entra l'acqua, e un orifizio esalante. In molti casi i bordi del mantello si prolungano formando dei sifoni uno per l'entrata dell'acqua e l'altro per l'uscita. La locomozione avviene attraverso un organo, chiamato piede, che si dilata per effetto della pressione sanguigna e attraverso contrazioni ritmiche permette l'infossamento nel terreno. Il piede raggiunge il suo massimo sviluppo nei bivalvi escavatori, ai quali serve appunto da apparato scavatore e locomotore grazie alle sue spasmodiche contrazioni.

Le branchie, situate tra la massa viscerale ed il mantello, sono fortemente sviluppate, hanno una forma lamellare e sono ricoperte di muco il quale trattiene le particelle presenti nell'acqua, per cui in queste specie le branchie assumono un ruolo anche nella nutrizione.

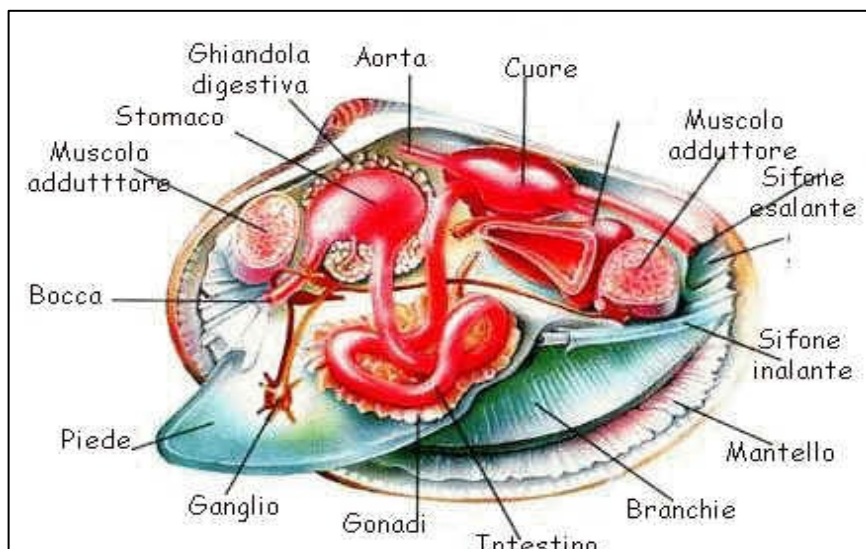


Figura 9. Anatomia dei molluschi bivalvi.

I molluschi bivalvi si nutrono di fitoplancton e di microrganismi animali vivi o morti presenti in sospensione o sul fondale. Il cibo viene introdotto attraverso la filtrazione di grandi volumi d'acqua e penetra all'interno della cavità palleale tramite il sifone inalante, passa attraverso le branchie e viene espulso all'esterno tramite il sifone esalante. In condizioni normali un mitile di media dimensione, filtra dai 4 ai 5 litri di acqua all'ora, ed è in grado di trattenere il 90% delle particelle in essa contenute (Mengoli 1998). La grande capacità di filtrazione consente loro di concentrare e accumulare nei tessuti una varietà di sostanze disciolte nell'acqua rendendoli modelli ideali allo studio sulla contaminazione ambientale. Inoltre, rispetto a pesci e crostacei, i bivalvi presentano una minore capacità metabolizzante per cui le concentrazioni di inquinanti nei loro tessuti riproducono l'entità della contaminazione ambientale (Widdow *et al.*, 1992).

Il *Mytilus galloprovincialis* (Fig. 10) è il mitile più rappresentativo, caratterizzato da una conchiglia equivalve con forma allungata a contorno generalmente triangolare. Le valve hanno un bordo inferiore rettilineo e posteriore rotondeggiante, di colore nero-violaceo. Il bordo del mantello è generalmente color porpora. La lunghezza varia tra i 4 ed i 7 cm.



Figura 10. Esempio di *Mytilus galloprovincialis*

La distribuzione naturale del mitile mediterraneo comprende tutto il Mar Mediterraneo, il Mar Nero e la fascia costiera dell'Atlantico orientale, dal Marocco alle Isole Britanniche. Tuttavia, oggi ha una vasta distribuzione nelle zone temperate di tutto il mondo.

La *Tapes decussatus* (o *Venerupis decussata*) (Figura 11) chiamata volgarmente vongola verace, è caratterizzata da una solida conchiglia di colore bianco giallastro, bianco-grigiastro, bruno-verdastro, con macchie e striature irregolari più scure. Il colore interno è biancastro-ocra. Ha una forma ovoidale e

la valva, nella parte interna, si presenta liscia, con una striatura che forma un'ansa con un angolo orientato verso l'alto. Questa specie può raggiungere una dimensione massima di circa 6 cm, ma generalmente la dimensione media degli esemplari si aggira attorno ai 3-4 cm.

Molto diffusa nelle lagune è la specie target dell'alto-medio Adriatico.



Figura 11. Esempio di *Tapes decussatus*

Secondo quanto stabilito dal Regolamento (CE) n. 853/2004, che fissa norme specifiche in materia di igiene per gli alimenti di origine animale, e dalle Linee Guida Nazionali sui molluschi bivalvi, i produttori possono raccogliere ed immettere sul mercato solo molluschi bivalvi, echinodermi, tunicati e gasteropodi marini vivi provenienti da zone classificate.

Il Regolamento CE 854/04 prevede che gli Stati membri provvedano a classificare le zone di produzione dei molluschi bivalvi vivi e ad istituire un Sistema di Sorveglianza sulle zone di classificazione e sugli impianti di produzione che permetta un costante monitoraggio della salubrità di tali prodotti e della qualità

Tiziana Sedda –“Ricerca di Microcystin LR in molluschi bivalvi e nel loro habitat in alcune zone della Sardegna” – Tesi di Dottorato in Scienze Veterinarie – Università degli Studi di Sassari

igienico-sanitaria delle acque. Le zone di produzione sono quelle aree marine, lagunari o di estuario dove si trovano banchi naturali di molluschi bivalvi oppure sono quei luoghi utilizzati per l'allevamento di molluschi bivalvi, dove questi ultimi vengono raccolti vivi.

La classificazione sanitaria delle acque per la produzione dei molluschi bivalvi è definita dallo stesso Regolamento (CE) 854/04 ed avviene in base all'appartenenza ad una delle seguenti tre categorie in funzione del livello di contaminazione microbiologica di *Escherichia coli* e *Salmonella* spp.:

ZONE DI CLASSE A: sono zone in cui i molluschi bivalvi vivi raccolti possono essere direttamente destinati al consumo umano poiché soddisfano i requisiti sanitari stabiliti dalla normativa vigente, ossia, livelli di *E. coli* minori di 230 MPN (Most Probable Number) per 100 g di polpa e di liquido intervalvare ed assenza di *Salmonella* spp. in 25 g di polpa. Rientrano in questa classe anche le zone di stabulazione, ovvero quelle aree marine, lagunari o di estuario, chiaramente delimitate e segnalate mediante boe, paletti o qualsiasi altro strumento fisso e destinate esclusivamente alla depurazione naturale dei molluschi bivalvi vivi.

ZONE DI CLASSE B: sono zone in cui i molluschi bivalvi vivi possono essere raccolti ed essere immessi sul mercato ai fini del consumo umano solo dopo aver subito un trattamento in un centro di depurazione o previa stabulazione. I molluschi bivalvi vivi che provengono da queste zone non devono superare i livelli di 4.600 MPN di *E. coli* per 100 g di polpa e di liquido intervalvare.

ZONE DI CLASSE C: sono zone in cui i molluschi bivalvi vivi possono essere raccolti ed immessi sul mercato ai fini del consumo umano solo previa stabulazione di lunga durata. I molluschi bivalvi vivi provenienti da queste zone non devono superare i livelli di 46.000 MPN di *E. coli* per 100 g di polpa e di liquido intervalvare.

4.1.2 Siti di campionamento: generalità

La distribuzione spaziale dei cianobatteri ed i conseguenti livelli di tossicità possono essere soggetti a cambiamenti repentini che dipendono dalle caratteristiche delle specie e dei ceppi, dalle caratteristiche morfometriche e idrologiche dei corpi idrici e dalle condizioni climatiche.

Le lagune costiere sono degli ecosistemi altamente sensibili alle modificazioni ambientali, il cui equilibrio ecologico è basato sui continui scambi che avvengono tra acqua dolce ed acqua salata in grado di influire su una grande varietà di parametri ambientali quali temperatura, salinità, pH ed ossigeno disciolto.

Gli stagni costieri della Sardegna sono riconosciuti per la ricchezza della flora e della fauna come ambienti umidi di elevato pregio naturalistico, a livello nazionale e comunitario. Sono ambienti di confine tra terra e mare e rappresentano ecosistemi con elevata biodiversità. Sono generalmente caratterizzati da fondali fangosi e profondità modeste. Il turnover, ossia il tempo di ricambio delle acque, è molto variabile e ne condiziona sensibilmente la qualità. Molti sistemi lagunari, a causa della difficoltà di conciliare diverse esigenze di natura economica, soffrono sulle loro sponde di una forte presenza di attività umane che possono determinare

conflitti con la destinazione d'uso rivolta alla produzione primaria e alla conservazione ambientale.

- **Stagno del Calich**: si trova nel borgo di Fertilia, comune di Alghero (Sassari).

L'area ha un'estensione di 97 ettari, una profondità massima di 4 m e riceve le acque di tre corsi d'acqua appartenenti a tre bacini differenti, ovvero:

- Canale Urune

- Rio Barca

- Rio Calvia.

Dei tre immissari, il Rio Barca risulta essere il più importante, fornendo un apporto di acqua dolce stimato in 80-90 milioni m³/anno.

Lo stagno comunica col mare attraverso un unico largo canale lungo 260 m, situato nell'estremità occidentale, usato come porticciolo per numerose imbarcazioni da pesca e da diporto.

La comunicazione con il mare influisce notevolmente sulla salinità a causa degli intensi e discontinui apporti d'acqua dolce e degli elevati ricambi marini, presentando ampie oscillazioni spazio-temporali che variano dal 5 % nella stagione invernale al 38 % nei mesi estivi. Inoltre, i fenomeni di piovosità eccezionale che interessano quest'area possono causare un'ampia dolcificazione delle acque (**Figura 12**).

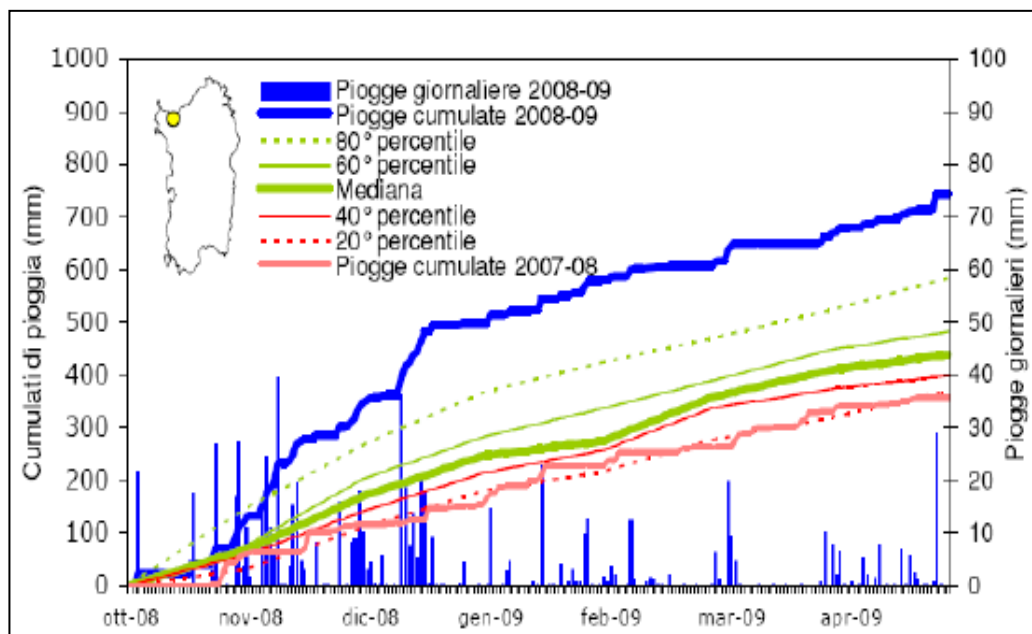
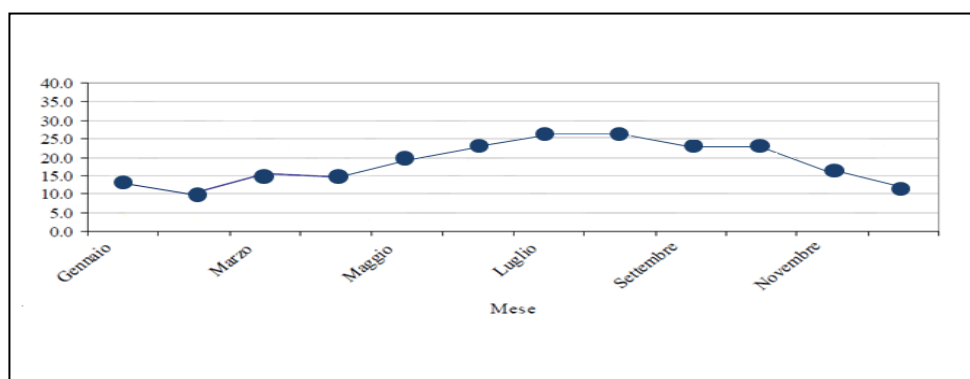


Figura 12. Valori giornalieri e cumulati delle precipitazioni misurate nel periodo ottobre 2008 –aprile 2009, stazione di Olmedo (SS). Raffronto con la precedente stagione piovosa e con i percentili dei cumulati calcolati sulla serie storica 1961-1990. (Arpas, 2009).

La temperatura delle sue acque presenta un andamento stagionale con picchi nei mesi di luglio-agosto e forti abbassamenti in quelli di dicembre-febbraio (**Figura 13**).



Tiziana Sedda –“Ricerca di Microcystin LR in molluschi bivalvi e nel loro habitat in alcune zone della Sardegna” – Tesi di Dottorato in Scienze Veterinarie – Università degli Studi di Sassari

Figura 13. Andamento della temperatura nelle acque dello stagno del Calich, anno 2007 (CEDOC Regione Sardegna).

L'area ha un forte interesse naturalistico ed è collocata in una zona abbondantemente coltivata ed edificata e, negli anni, è stata interessata da un progressivo incedere di processi eutrofici conseguentemente ad un ampio apporto di nutrienti che si sono riversati nelle sue acque a seguito del dilavamento del terreno.

A partire dal 1994, la concessione per la pesca è affidata in maniera esclusiva ad una cooperativa di pescatori. È stato calcolato che la precedente gestione avesse una resa quantificabile in 200 kg/ha/anno circa di pescato. Relativamente all'allevamento e alla raccolta dei mitili, le acque dello stagno del Calich non sono state oggetto di classificazione sanitaria come previsto dal Reg. CE 854/2004, tuttavia, nonostante i divieti, lungo il Calich si effettua sia la raccolta che la vendita di molluschi in maniera totalmente abusiva.

-Stagno di Cabras: è lo stagno più esteso della Sardegna ed è alimentato da alcuni corsi d'acqua dolce, di cui il più importante è il Rio Mare'e Foghe, mentre un sistema di quattro canali lo mettono in comunicazione col mare. Questa rilevante zona umida ha una profondità molto variabile che va dai 40 cm a livello delle sponde ai 3 m nelle aree centrali. La parte meridionale dello stagno risente maggiormente della comunicazione con il mare e le acque presentano un grado di salinità maggiore.

Lo stagno di Cabras, un tempo il più pescoso della Sardegna, attualmente mostra un notevole decremento della produttività imputabile alla mancanza di una

regolamentazione della pesca e di un'adeguata manutenzione. Il territorio mostra dei caratteri orografici abbastanza costanti, un'omogeneità di ambiente che si riflette sui parametri meteo-climatici. Le principali variazioni climatiche rilevate nello stagno di Cabras sono illustrate nella **Figura 14a** e **14b**. Ad oggi qualsiasi attività di pesca o di raccolta di molluschi presso questo sito è in concessione straordinaria ad una cooperativa locale.

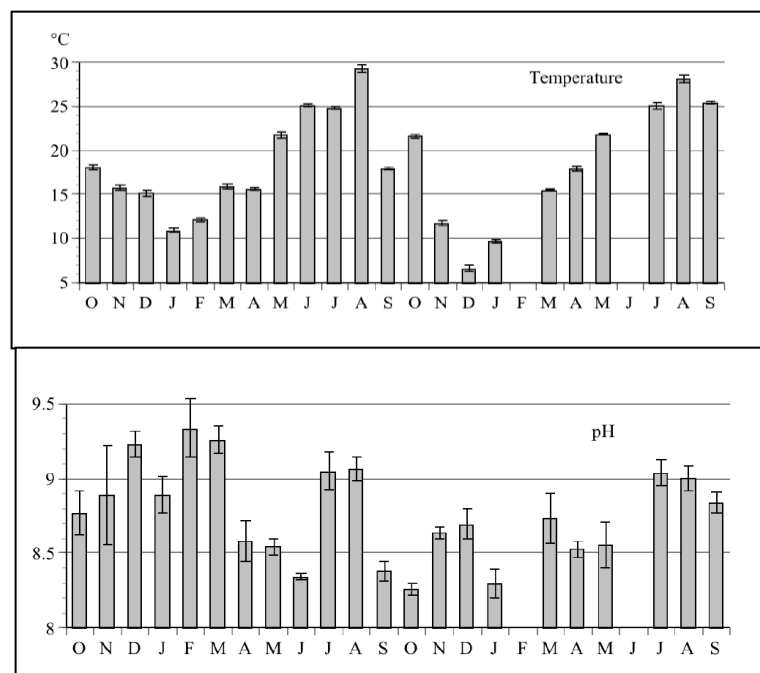


Figura 14 a. Temperatura e pH rilevate nello stagno di Cabras negli anni 2001-2002 (Padedda *et al.*, 2012).

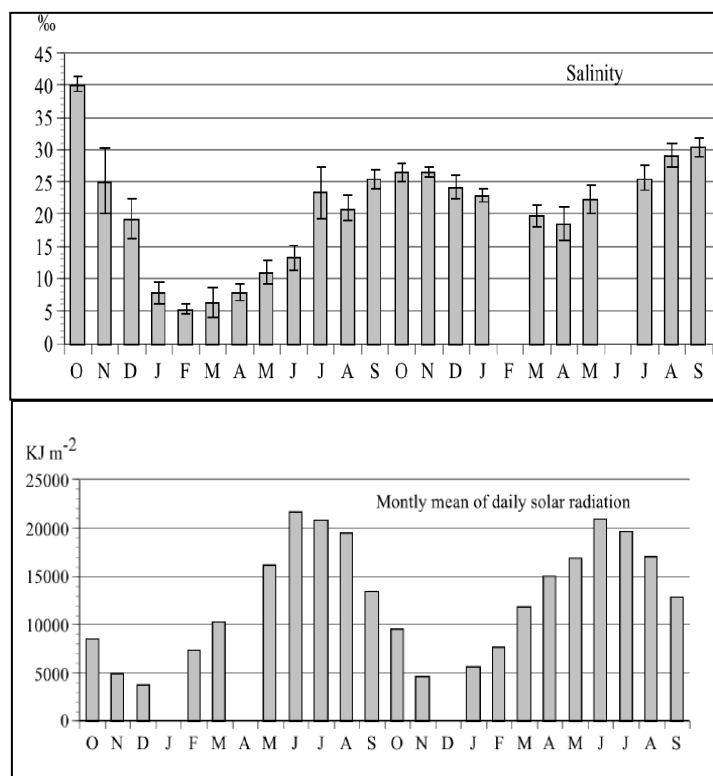


Figura 14 b. Salinit  e radiazione solare rilevate nello stagno di Cabras negli anni 2001-2002 (Padedda *et al.*, 2012).

-Stagno di Tortoli:   un bacino di forma ovale che nasce su una piana di origine alluvionale le cui acque vengono alimentate da quelle dolci del Rio Girasole a nord e da quelle salate del mare, a sud, tramite il Canale Baccasara.

Ha una superficie totale di 250 ettari e la sua profondit  varia tra 1 e 2 metri. Grazie alla confluenza del Rio Girasole e alla comunicazione con il mare, le acque dello stagno risultano essere salmastre.

La profondit    variabile: il canale Baccasara   stato scavato a - 4 m, mentre nel bacino propriamente detto, originariamente profondo meno di un metro, sono stati realizzati canali circondariali e centrali ed   stata approfondita una vasta area,

Tiziana Sedda –“Ricerca di Microcystin LR in molluschi bivalvi e nel loro habitat in alcune zone della Sardegna” – Tesi di Dottorato in Scienze Veterinarie – Universit  degli Studi di Sassari

situata tra la bocca a mare settentrionale ed il Rio Mannu, nella quale esiste un allevamento flottante di molluschi, mitili e ostriche.

Lo stagno, di proprietà demaniale, è in concessione dal 1944 ad una cooperativa di pescatori. Nei pressi delle bocche a mare, sono stati allestiti due punti di rilevamento automatici per il monitoraggio di pH, conducibilità, temperatura e torbidità. La salinità varia dall'11% al 38% mentre la temperatura media dell'acqua si attesta sui 18 °C con estremi di 12 e 29 °C.

4.1.3 Tecniche utilizzate per la quantificazione della microcistina LR:

-Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

- Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS)

Varie tecniche analitiche sono state utilizzate nel corso degli anni per la quantificazione delle microcistine in varie matrici quali acqua, alghe, pesci, molluschi e altri campioni biologici (Mekebri *et al.*, 2009; Beltrán *et al.*, 2012; Kohoutek *et al.*, 2010). Le tecniche maggiormente utilizzate sono il dosaggio immunoenzimatico ELISA (Chu *et al.*, 1990), la gas cromatografia associata alla spettrometria di massa (GC-MS) (Kaya *et al.*, 1999), la cromatografia liquida con rivelatore UV (HPLC-UV) (Lawton *et al.*, 1994), l'elettroforesi capillare (CE) (Martinez *et al.*, 2003) e la cromatografia liquida associata alla spettrometria di massa (LC-MS) (Hormazábal *et al.*, 2000). Il dosaggio ELISA, permette di effettuare un rapido screening e presenta una notevole sensibilità. Tuttavia, il maggiore inconveniente di tale tecnica, è rappresentato dalla sua bassa selettività; infatti, i kit Elisa presenti in commercio, sono in grado di quantificare le microcistine totali, ma non sono in grado di identificarle e quantificarle singolarmente. La tecnica LC-MS e ancor meglio la cromatografia liquida associata ad uno spettrometro di massa tandem (LC-MS/MS), è la tecnica maggiormente utilizzata per quantificare la microcistina LR nelle varie matrici; infatti, essa è in grado di identificare e quantificare in maniera selettiva, accurata e precisa tale tossina anche a concentrazioni molto basse. Per migliorare il limite di quantificazione (LOQ) del metodo analitico, è spesso necessario sottoporre il

campione ad una fase preparativa che spesso include l'estrazione in fase solida (SPE) mediante la quale è possibile estrarre e concentrare l'analita oggetto dello studio.

Nel presente lavoro di tesi per la ricerca e la quantificazione della MC-LR sono stati utilizzati dosaggi ELISA e LC-MS/MS.

- L'ELISA è una tecnica immunoenzimatica molto utilizzata soprattutto in ambito biochimico per rilevare la presenza di un determinato analita. Essa combina la specificità di un anticorpo con la sensibilità di un semplice saggio enzimatico. Esistono due varianti di test ELISA: il metodo competitivo (che a sua volta può essere diretto o indiretto) ed il metodo non competitivo (anch'esso suddiviso in diretto ed indiretto). Tale tecnica di tipo qualitativo e/o semiquantitativo è considerata di screening ed è solitamente seguita da una tecnica di conferma quale la cromatografia liquida accoppiata alla spettrometria di massa tandem.

- L'analisi cromatografica interfacciata con un rivelatore a spettrometria di massa è una delle tecniche maggiormente utilizzate negli ultimi anni per analisi di tipo qualitativo e quantitativo di xenobiotici in varie matrici. Viene solitamente utilizzata una fase mobile costituita da una miscela di solventi aventi la giusta affinità per l'analita di interesse. L'analita viene solitamente disciolto nella fase mobile ed, iniettato nel sistema HPLC, viene trascinato sino alla colonna cromatografica. L'eluato in uscita dalla colonna raggiunge quindi lo spettrometro di massa dove, grazie all'interfaccia a ionizzazione elettrospray viene nebulizzato molto finemente. Le piccole particelle vengono quindi ionizzate da una scarica a corona a pressione atmosferica e trascinate dal flusso continuo delle particelle

stesse e da un basso potenziale elettrico che spinge le particelle cariche positivamente, attraverso un piccolo orifizio, verso lo spettrometro di massa che lavora sotto vuoto. Si ottiene quindi uno spettro massa su carica (m/z) caratterizzato solitamente dal picco dello ione molecolare e da caratteristici frammenti della molecola originaria. Lo spettrometro di massa tandem a triplo quadrupolo è in grado di lavorare in diverse modalità:

- Single Ion Monitoring (SIM): viene analizzato lo ione molecolare dell'analita;
- Product Ion Scan: il primo quadrupolo seleziona uno ione di rapporto m/z fisso, dopo la frammentazione il terzo quadrupolo effettua una scansione in un range di massa;
- Parent Ion Scan: il primo quadrupolo effettua una scansione in un range di massa mentre il terzo quadrupolo seleziona uno ione di rapporto m/z fisso;
- Neutral Loss Scan: entrambi i quadrupoli lavorano in scansione;
- Multiple Reaction Monitoring (MRM): in questo caso l'identità della molecola è nota a priori e il primo quadrupolo è fissato su un determinato valore di m/z mentre il terzo su quello di un frammento.

4.2. Materiali e metodi

4.2.1 Sostanze utilizzate

I solventi di grado HPLC e i filtri in fibra di vetro GF/F utilizzati in questo lavoro sono stati acquistati dalla ditta Sigma Aldrich (Milano, Italia). Lo standard della MC-LR utilizzato è stato acquistato dalla ditta 3V Chimica S.r.l. (Roma, Italia) e il kit ELISA dalla ditta ECOTOX (Cornaredo-Mi, Italia). L'acqua Milli Q deionizzata e bidistillata è stata preparata con un apparecchio Milli Q system (Millipore, Bedford, MA, USA). Le colonnine CHROMABOND C18 (500mg/6mL) usate per l'estrazione in fase solida (SPE) sono state acquistate dalla ditta Exacta Optech Labcenter (S. Prospero-MO-Italia) e montate su un sistema da vuoto Vacuum Manifold Set (Phenomenex, Castelmaggiore, Italia).

4.2.2 Campionamento

I prelievi di acqua sono stati effettuati in linea con quanto indicato dalle linee guida fornite dall'Istituto Superiore di Sanità e nello specifico:

- prelievo del campione a circa 5-10 cm di profondità;
- immersione lenta del contenitore dalla parte dell'apertura;
- immersione della bottiglia alla profondità desiderata, possibilmente nella direzione della corrente in modo tale da favorire l'entrata dell'acqua fino al riempimento della bottiglia;
- chiusura rapida del contenitore.

Per il campionamento delle acque, sono stati utilizzati dei contenitori di polietilene (PE) dotati di doppia chiusura, in cui il campione veniva conservato fino al trasporto in laboratorio e mantenuto ad una temperatura non superiore ai 4°C.

I campioni di molluschi (*M. galloprovincialis* e *T. decussatus*) sono stati in parte acquistati ed in parte forniti dall'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sardegna (IZS); in particolare sono stati prelevati dai Servizi Veterinari della Asl N. 4 di Lanusei e Tortolì nell'ambito del piano regionale per la vigilanza ed il controllo sanitario della produzione e commercializzazione dei molluschi bivalvi

La matrice acquistata è stata immediatamente collocata all'interno di buste monouso e conservate ad una temperatura < ai 10 °C per tutta la durata del trasporto mentre, quella proveniente dall'IZS, è stata collocata all'interno di contenitori opportunamente climatizzati (9 ± 1 °C) al fine di garantire il mantenimento della catena del freddo.

Il campionamento ha avuto una durata di 10 mesi, da Gennaio 2015 ad Ottobre 2015, con cadenza bimensile, in modo tale da includere un *range* temporale che potesse contenere un gran numero di variazioni dei parametri ambientali e climatici.

4.2.3 Siti di campionamento: punti di prelievo

Stagno di Calich: in base ai possibili apporti di carichi inquinanti (attività agricole e impianti di depurazione) sono stati scelti i punti di campionamento riportati in **Tabella 7** e **Figura 15**.

Da ciascun sito venivano prelevati un totale di 2 litri d'acqua/punto e ciascun contenitore veniva opportunamente etichettato con nome del sito, numero del punto e data del prelievo.

I campioni di mitili (*M. galloprovincialis*) sono stati in parte prelevati ed in parte acquistati da pescatori locali. Per quanto riguarda i primi, i campionamenti sono stati effettuati nel punto 2 mentre per i mitili acquistati, ovviamente, non è stato possibile classificare il sito di prelievo. Per quanto riguarda le vongole (*T. decussatus*), invece, non è stato possibile reperire un'adeguata quantità di campioni tale da poter effettuare le successive analisi.

PUNTO PRELIEVO	COORDINATE GEOGRAFICHE	
Punto1–Calich foce canale Urune (CHU)	Nord:40°36' 04''	Est: 008°17'24''
Punto2–Calich foce molo (CHM)	Nord: 40°35'50''	Est: 008°17'19''

Tabella 7. Coordinate geografiche del punto di prelievo dell'acqua e dei mitili (Punto 2)



Figura 15. Stagno del Calich con relativi punti di prelievo dell’acqua e dei mitili (Punto 2).

-Stagno di Cabras: il campionamento dell’acqua è stato effettuato nell’area del canale scolmatore (**Tabella 8, Figura 16**), punto di comunicazione tra stagno e mare ed area altamente pescosa. I campioni di mitili (*M. gallusprovincialis*) e vongole (*T. decussatus*) sono stati, anche in questo caso, acquistati da pescatori locali e, per questo motivo, non si è provveduto ad una classificazione del sito di prelievo all’interno dello stagno.

PUNTO PRELIEVO	COORDINATE GEOGRAFICHE	
Canale scolmatore	Nord: 9°54’51.3’’	Est: 8°29’44.7’’

Tabella 8. Coordinate geografiche del punto di prelievo dell’acqua



Figura 16. Canale scolmatore e punto di prelievo di acqua.

-**Stagno di Tortoli:** è una delle zone sulle quali l'IZS e la Asl effettuano un piano di sorveglianza e controllo con periodici piani di campionamento eseguiti secondo metodica ufficiale. I campioni di molluschi, oggetto dell'analisi, sono stati in parte acquistati presso la cooperativa di pescatori locali ed in parte sono stati forniti dall'IZS.

I campioni pervenuti dall'IZS provenivano da aree ben definite, all'interno delle quali venivano identificati specifici punti di prelievo denominati:

- Punto N°1 (Tabella 9, Figura 17)
- Punto N°2 (Tabella 10, Figura 18)
- Punto N°3 (Tabella 11, Figura 19)
- Punto N°IV (Tabella 12, Figura 20)

PUNTO PRELIEVO	COORDINATE GEOGRAFICHE	
N1	Nord: 39°56'51.1''	Est: 9°41'09.5''

Tabella 9. Coordinate geografiche del punto di prelievo dei mitili (IZS)



Figura 17. Punto di prelievo N1

PUNTO PRELIEVO	COORDINATE GEOGRAFICHE	
N2	Nord: 39°56'57.1''	Est: 9°40'56.6''

Tabella 10 Coordinate geografiche del punto di prelievo dei mitili (IZS)



Figura 18. Punto di prelievo N2

PUNTO PRELIEVO	COORDINATE GEOGRAFICHE	
N3	Nord: 39°56'48.6''	Est: 9°40'35.6''

Tabella 11. Coordinate geografiche del punto di prelievo dei mitili (IZS)

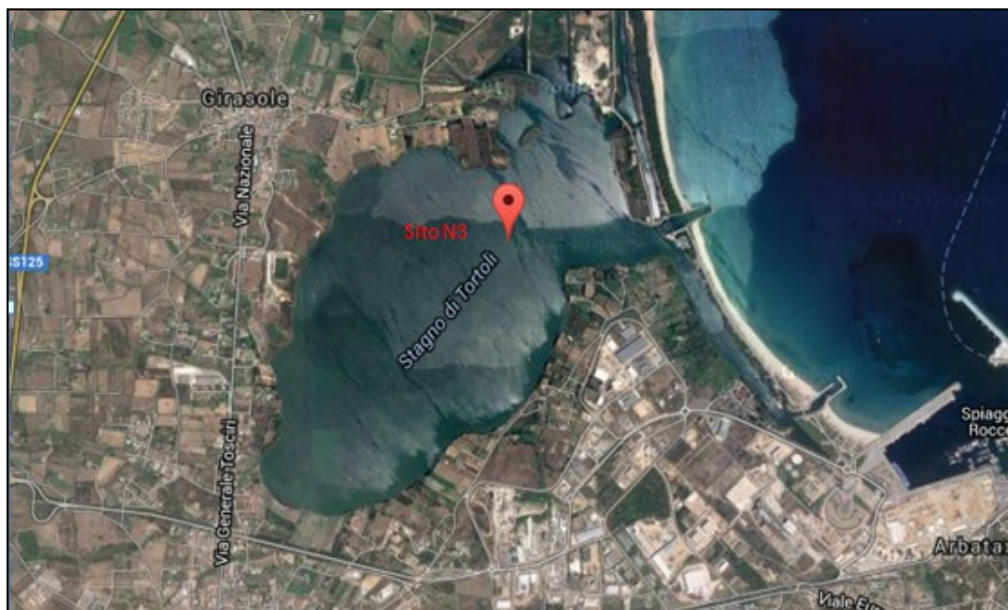


Figura 19. Punto di prelievo N3

PUNTO PRELIEVO	COORDINATE GEOGRAFICHE	
N1V	Nord: 39°56'48.6''	Est: 9°40'35.6''

Tabella 12. Coordinate geografiche del punto di prelievo delle vongole (IZS)



Figura 20. Punto di prelievo N1V

4.2.4 Preparazione dei campioni

La preparazione dei campioni da analizzare è stata eseguita seguendo il protocollo riportato nel Notiziario dei Metodi Analitici dell' Istituto Superiore di Sanità del 2010 (Guzzella *et al.*, 2010). I campioni di acqua, prelevati in contenitori di vetro scuro, sono stati conservati refrigerati fino all'arrivo in laboratorio dove sono stati sottoposti a filtrazione su filtri in fibra di vetro entro le 48 ore dal campionamento. La filtrazione è stata effettuata a partire da 1 L di campione ed è risultata necessaria per separare la componente cellulare dalla fase acquosa. Il filtrato è stato conservato in bottiglie di vetro scuro a 4°C fino alla successiva fase di concentrazione mediante estrazione in fase solida (SPE).

Per quanto riguarda i campioni di cozze e vongole, invece, sono stati prelevati sia la polpa che il liquido intervalvare, omogeneizzati e congelati a -4°C. Successivamente, l'omogeneizzato è stato scongelato, prelevati 5g e trasferiti in falcon da centrifuga a cui sono stati aggiunti 10 mL di una soluzione contenente metanolo e acqua acidificata con lo 0,2% di acido formico 9:1 v/v. La miscela è stata quindi vortexata e sottoposta ad estrazione in bagno ultrasuoni per 1 ora a temperatura ambiente. I campioni sono stati quindi centrifugati a 3500 rpm per 30 minuti. Il surnatante è stato prelevato, portato a un minimo volume sotto corrente di azoto e ripreso con 500 µL di una soluzione acquosa contenente lo 0,2% di acido formico. I campioni ottenuti sono stati sottoposti ad estrazione in fase solida prima di essere analizzati mediante ELISA ed LC-MS/MS.

4.2.5 Estrazione in fase solida (SPE) della MC-LR da campioni di acqua

L'estrazione della MC-LR dalla fase acquosa è stata effettuata utilizzando colonnine C₁₈ contenenti 500 mg di fase adsorbente. La colonnina è stata attivata con 3 mL di metanolo seguiti da 6 mL di acqua. 1 litro di acqua è stato quindi caricato sulla colonnina attivata, utilizzando un sistema automatico di caricamento del campione (**Figura 21**). Successivamente è stato effettuato il lavaggio della colonnina con 3mL di acqua seguiti da 3 mL di una miscela contenente acqua e metanolo in rapporto 80:20. Dopo aver fatto andare a secco la colonnina, l'analita è stato eluito con 5 mL di metanolo contenente acido formico allo 0,1% e 5 mL di una soluzione contenente 0,1% di acido formico in metanolo e acqua in rapporto 75:25. L'eluato è stato raccolto in appositi vials di vetro scuro e portato a secco sotto un flusso di azoto. Gli estratti sono stati poi ripresi con due diversi solventi a seconda della procedura analitica a cui sono stati sottoposti. Per l'analisi mediante LC-MS/MS i campioni sono stati ripresi con 500 µL di fase mobile, mentre i campioni da analizzare mediante ELISA sono stati ripresi con 500 µL di acqua acidificata in quanto il metanolo poteva interferire andando a ridurre la sensibilità del test. In entrambi i casi, il fattore di concentrazione è di 2000.



Figura 21. Sistema automatico per il caricamento su colonnina di 1L di acqua

4.2.6 Estrazione in fase solida (SPE) della MC-LR da campioni di molluschi

Per l'estrazione in fase solida della MC-LR dai campioni di cozze e vongole sono state utilizzate le stesse colonnine C18 e la stessa procedura estrattiva utilizzata per i campioni di acqua. I campioni estratti sono stati ripresi con 500 μ L di fase mobile per l'analisi in LC-MS/MS e con 500 μ L di acqua acidificata per il test ELISA.

4.2.7 Dosaggio ELISA

Le analisi ELISA sui campioni di acqua e molluschi, sono state effettuate utilizzando un kit ELISA “EnviroGard Microcystins “7” Plate Kit” acquistato dalla ditta Ecotox Lds. Il kit conteneva un surrogato non tossico della microcistina

Tiziana Sedda –“Ricerca di Microcystin LR in molluschi bivalvi e nel loro habitat in alcune zone della Sardegna” – Tesi di Dottorato in Scienze Veterinarie – Università degli Studi di Sassari

LR a sei diverse concentrazioni, un controllo negativo, il substrato, la stop solution e otto strips contenenti gli anticorpi policlonali cotti nei pozzetti. Il dosaggio si basa sulla competizione di legame. Il protocollo del dosaggio utilizzato sfrutta il metodo di tipo competitivo diretto. Nel dettaglio, 100µL di controllo negativo, calibratore e campione sono stati caricati nei rispettivi pozzetti prima di venire incubati al buio a temperatura ambiente per 30 minuti. 100 µL di coniugato microcistina-enzima sono stati quindi aggiunti a ciascun pozzetto. Il contenuto è stato poi miscelato e lasciato incubare per altri 30 minuti a temperatura ambiente. Dopo aver lavato i pozzetti per quattro volte successive, 100 µL di substrato sono stati aggiunti a ciascun pozzetto, seguiti da un incubazione di 30 minuti a temperatura ambiente ed al riparo dalla luce. Infine 100 µL di soluzione Stop sono stati aggiunti a ciascun pozzetto e la lettura è stata effettuata entro 30 minuti utilizzando un lettore di piastre ELISA a 450 nm.

4.2.8 Dosaggio LC-MS/MS

I campioni di acqua e dei molluschi estratti, sono stati sottoposti all'analisi per la quantificazione della microcistina LR. Le analisi LC-MS/MS sono state effettuate utilizzando un sistema HPLC ProStar TM 300 (Varian, Palo Alto, CA, USA) interfacciato con uno spettrometro di massa triplo quadrupolo Varian 310-MS (**Figura 22**). E' stata utilizzata una precolonna SecurityGuard C₁₈ (4x2 mm ID) e una colonna Luna C₁₈, 5 µm, 100 x 2,0 mm. L'eluizione della MC-LR è stata effettuata in gradiente con l'utilizzo di due solventi: acqua con acido formico allo 0,2% (solvente A) e acetonitrile con acido formico allo 0,2% (solvente B). Il

Tiziana Sedda –“Ricerca di Microcystin LR in molluschi bivalvi e nel loro habitat in alcune zone della Sardegna” – Tesi di Dottorato in Scienze Veterinarie – Università degli Studi di Sassari

gradiente utilizzato è il seguente: dopo 1 min di solvente B al 20%, in 2 min si passa dal 20 all' 80% e si mantiene costante per 2,5 minuti. In seguito il solvente B ritorna dall'80 al 20% in 6 secondi e rimane costante per 2,54 minuti. La durata totale della corsa è di 8,30 minuti con un flusso di 0,2 mL/min. Il detector è accoppiato al cromatografo HPLC mediante un'interfaccia elettrospray (ESI) che lavora in modalità ESI positiva. I parametri ottimizzati per la microcistina sono i seguenti: voltaggio del capillare, 80 V; temperatura e pressione dell'azoto rispettivamente 200°C e 50 PSI; detector, 1900 V. Per operare in modalità MS/MS, è stato utilizzato l'argon come gas di collisione ad una pressione di 2 mTorr nella cella di collisione. Per l'ottimizzazione dei parametri dello spettrofotometro è stata fatta un'infusione diretta della soluzione standard di MC-LR alla concentrazione di 500 ng/mL. Analizzando lo spettro di massa, il picco molecolare a m/z 996 era ben visibile e, sottoposto a frammentazione, dava come ioni figlio lo ione 213 m/z e 235 m/z. Sono state quindi scelte tre transizioni: una in sim 996→996 e due in SRM, rispettivamente 996→213 e 996→135. La transizione 996→213 è risultata la transizione migliore ed è quindi stata scelta per la quantificazione, mentre le altre due sono state utilizzate come transizioni di conferma dell'identità dell'analita. La retta di taratura è stata costruita nel range da 5 ng/mL a 500 ng/mL con il metodo dello standard esterno. Solitamente, per l'analisi quantitativa in LC-MS/MS è opportuno l'utilizzo di uno standard interno per prevenire un eventuale effetto matrice e per minimizzare un eventuale errore operativo di iniezione; tale composto deve avere struttura chimica e comportamento analitico il più possibile simile all'analita che deve essere

analizzato. Gli analoghi marcati sono i più adatti a tale scopo. Tuttavia, non essendo attualmente presente in commercio l'analogo marcato della microcistina LR, si è ritenuto opportuno utilizzare il metodo dello standard esterno. Lo stesso approccio è stato utilizzato in vari lavori riportati in letteratura [b]. Il limite di determinazione (LOD) e il limite di quantificazione (LOQ) sono rispettivamente di 10 ng/mL e 20 ng/mL.

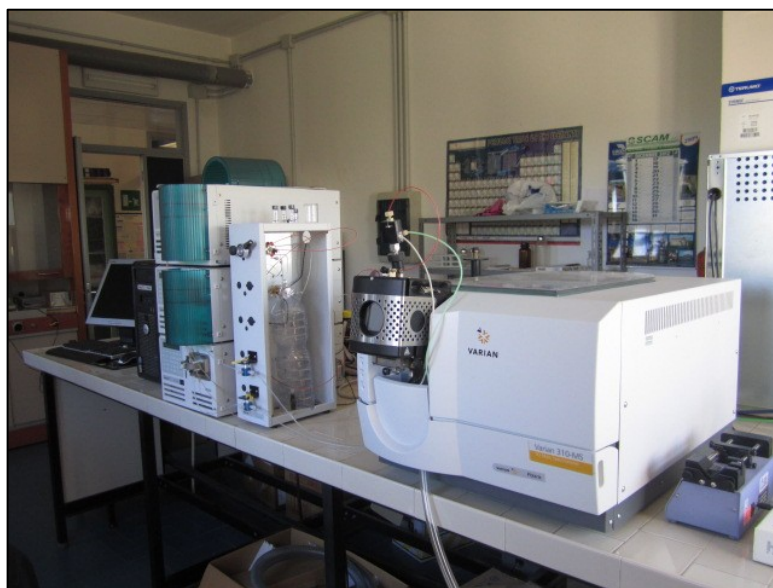


Figura 22. Strumento utilizzato per il dosaggio LC-MS/MS

4.3. Risultati

4.3.1 Scelta del metodo estrattivo

La scelta dei metodi per estrarre la microcistina LR e le microcistine in generale da diverse matrici, riveste una grande importanza, anche in relazione ai limiti imposti dalle normative vigenti e dall'OMS. Un metodo estrattivo deve essere

Tiziana Sedda –“Ricerca di Microcystin LR in molluschi bivalvi e nel loro habitat in alcune zone della Sardegna” – Tesi di Dottorato in Scienze Veterinarie – Università degli Studi di Sassari

infatti efficiente al maggior grado possibile e rapido. I passaggi in cui si ottiene la distruzione cellulare ad esempio devono essere seguiti attentamente per assicurare la rottura delle cellule senza danneggiare le tossine extracellulari o intracellulari, in modo da evitare una stima falsata. Inoltre è necessario effettuare tutti i passaggi con estrema attenzione in modo da minimizzare la perdita dell'analita. A questo scopo, è stato fatto un attento studio dei tanti metodi presenti in letteratura per l'estrazione e la purificazione della microcistina LR a partire dalle matrici tissutali e dall'acqua. E' stato quindi individuato il metodo che, riprodotto nei nostri laboratori, era in grado di dare dei risultati ottimali in termini di recupero e ripetibilità. In base a tali considerazioni sono state seguite le linee guida riportate nel Notiziario dei Metodi Analitici dell'Istituto Superiore di Sanità del 2010 (Guzzella *et al.*, 2010).

4.3.2 Analisi ELISA della Microcistina LR

I campioni reali sono stati sottoposti inizialmente ad un metodo semiquantitativo immunoenzimatico (ELISA) utilizzando il kit della ditta Ecotox che, come tutti i kit ELISA presenti sul mercato per la quantificazione della microcistina LR, non è in grado in realtà di differenziare tra la microcistina LR e i congeneri. Ciò è dovuto al fatto che, i saggi immunologici ELISA basano il loro funzionamento sul riconoscimento del gruppo funzionale ADDA, caratteristico delle microcistine e delle nodularine. Poiché sono molto veloci e facili da eseguire, risultano comunque il metodo ideale per effettuare programmi di *screening*. L'analisi ELISA condotta nel presente studio ha dato dei risultati positivi sia in campioni di

acqua che di molluschi. In particolare, si è osservato l'andamento delle microcistine totali e/o nodularine nel periodo in cui sono stati effettuati i campionamenti. Sono stati analizzati campioni di acqua provenienti dallo stagno di Calich e di Cabras. Dall'analisi di questi campioni è risultata la presenza di microcistine e/o nodularine nei mesi di Aprile, Luglio e Agosto in entrambi gli stagni. Nell'acqua dello stagno di Calich la concentrazione delle tossine passa da 0,8 pg/mL ad Aprile a 0,06 pg/mL nel mese di Agosto. Nell'acqua dello stagno di Cabras, invece, la concentrazione maggiore è stata individuata nel mese di Luglio con un valore di 0,7 pg/mL (**Figura 23**).

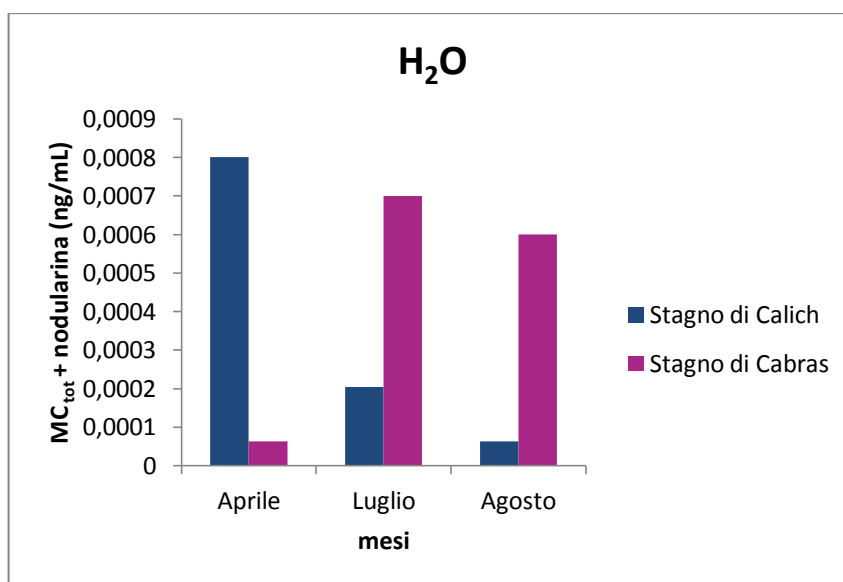


Figura 23. Concentrazione di microcistine totali e/o nodularina nell'acqua degli stagni di Calich e Cabras

Nei campioni di cozze provenienti dallo stagno di Calich è stata riscontrata la presenza di microcistine e/o nodularine nei mesi di Luglio (0,6 ng/g) e Agosto

(0,06 ng/g). Per quanto riguarda i campioni di cozze provenienti dallo stagno di Tortoli, come si può vedere in **Figura 24**, sono state riscontrate tracce di microcistine ed analoghi nei mesi di Luglio (0,47 ng/g), Agosto (0,34 ng/g) e Settembre (0,22 ng/g). Nei campioni di cozze provenienti dallo stagno di Cabras è stata rilevata la presenza di tali tossine solo nel mese di Luglio (0,12 ng/g).

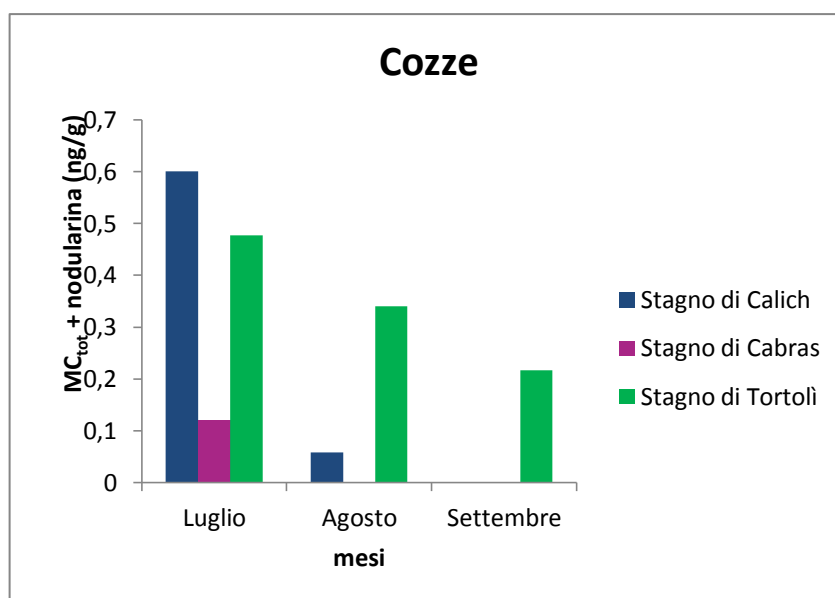


Figura 24. Concentrazione di microcistine totali e/o nodularina nei campioni di cozze degli stagni di Calich, Cabras e Tortoli

I campioni di vongole provenivano invece solo dallo stagno di Cabras e Tortoli. In questi due siti, la presenza delle tossine indagate è stata riscontrata nei mesi di Giugno (0,37 ng/g a Cabras e 0,02 ng/g a Tortoli), Luglio (0,35 ng/g a Cabras e 0,18 ng/g a Tortoli), Agosto (0,55 ng/g a Cabras e 0,51 ng/g a Tortoli) e Settembre (0,29 ng/g a Cabras e 0,85 ng/g a Tortoli) (**Figura 25**).

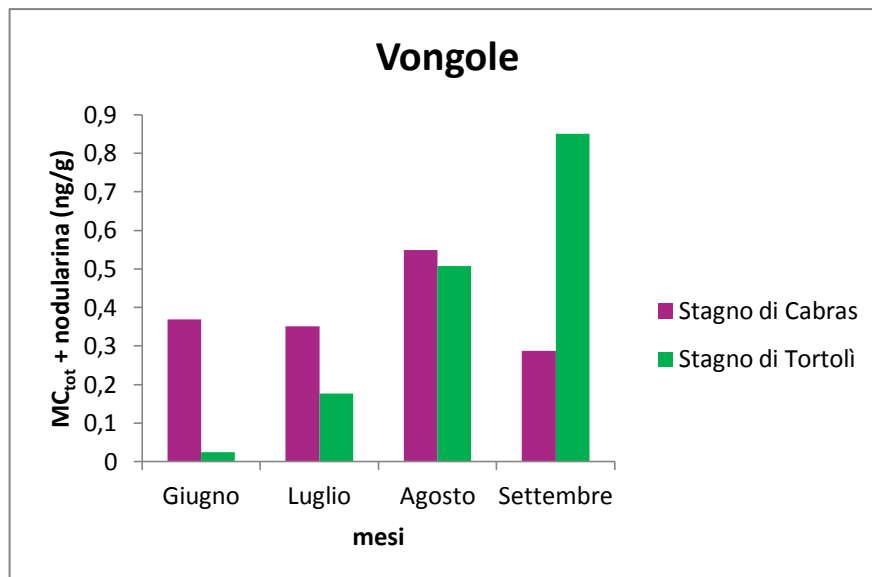


Figura 25. Concentrazione di microcistine totali e/o nodularina nei campioni di vongole degli stagni di Cabras e Tortoli

4.3.3 Analisi LC-MS/MS della microcistina LR

Anche per quanto riguarda l'analisi cromatografica e la successiva analisi degli spettri di massa, sono stati confrontati e riprodotti vari lavori presenti in letteratura apportando le modifiche necessarie al fine di ottenere i migliori risultati con lo strumento LC-MS/MS a nostra disposizione. Per quanto riguarda gli spettri di massa l'acquisizione è stata fatta sia in modalità ESI positiva che ESI negativa, ottenendo come risultato una migliore frammentazione in ESI positiva. Una volta ottimizzato, il metodo è stato utilizzato per la quantificazione della microcistina LR in campioni di acqua e molluschi provenienti dagli stagni di Calich, Cabras e Tortoli. La **Figura 26** mostra il cromatogramma di una soluzione standard di

microcistina LR alla concentrazione di 500 ng/mL. Le **Figure 27 e 28** mostrano rispettivamente i cromatogrammi dei campioni di acqua e di cozze prelevati dai siti oggetto dello studio. Come si può notare, con il metodo LC-MS/MS sviluppato, non si è evidenziata la presenza di MC-LR in nessuno dei campioni reali analizzati. Per quanto riguarda i campioni di acqua, considerato che il limite di quantificazione del metodo è di 20 ng/mL e che i campioni di acqua sono stati concentrati prima dell'analisi di un fattore pari a 2000, significa che, nei campioni analizzati, non è presente la microcistina LR al di sotto di 0,01 ng/mL (10 pg/mL). Tale valore è 100 volte inferiore al limite 1 µg/L imposto per l'acqua destinata al consumo umano dalla WHO. I campioni di molluschi, come spiegato precedentemente, sono stati a loro volta sottoposti a purificazione e concentrazione (fattore di concentrazione pari a 20) per cui, in tal caso, non sono stati rilevati tracce di MC-LR nei campioni di tessuto, al di sotto di 2ng/g.

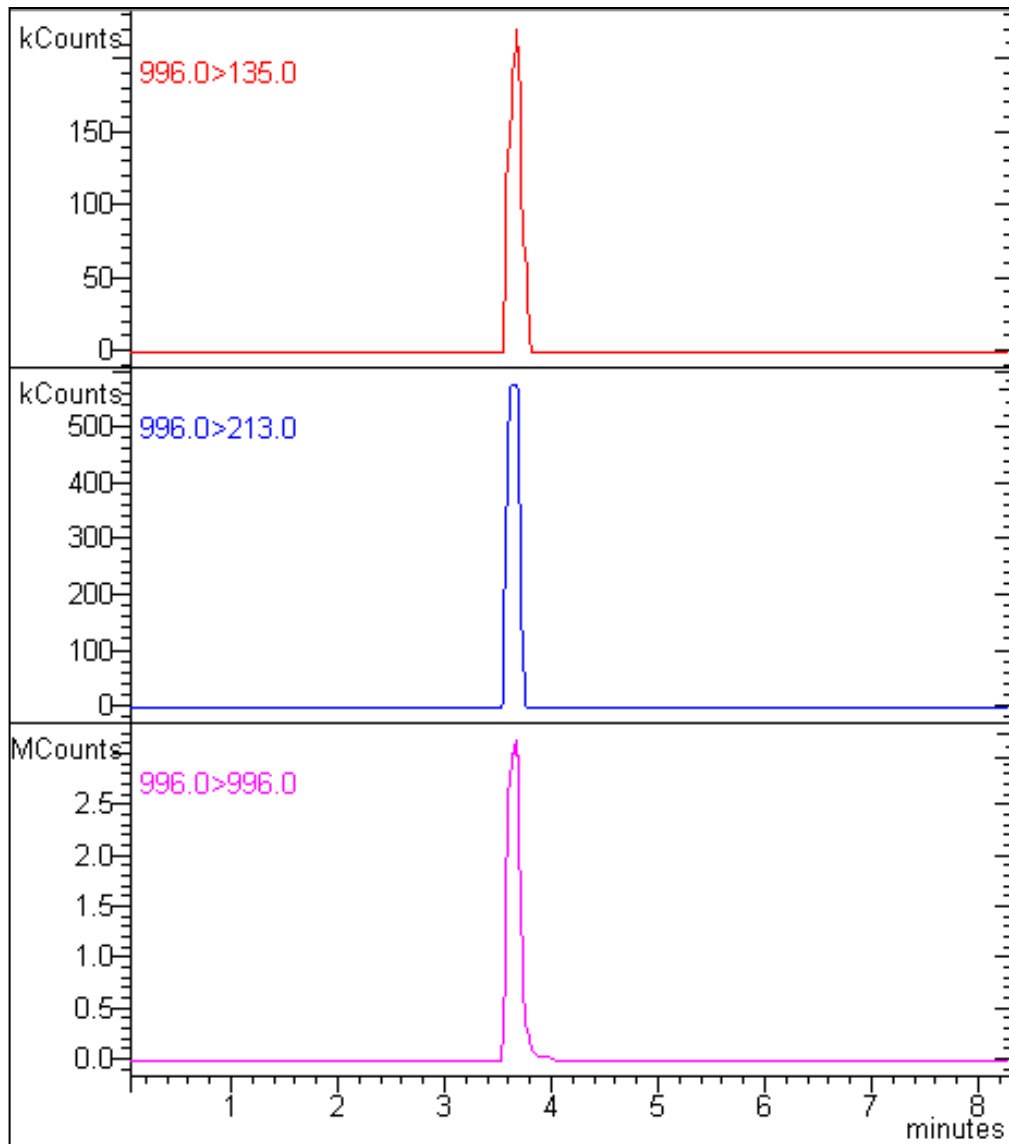


Figura 26. Cromatogramma di una soluzione standard di microcistina LR alla concentrazione di 500 ng/mL

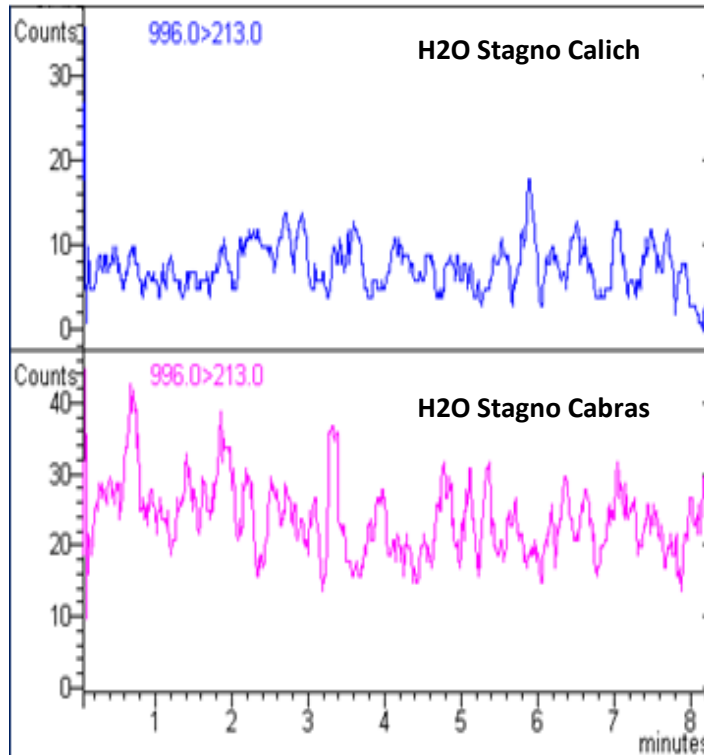


Figura 27. Cromatogramma di campioni di acqua proveniente dagli stagni oggetto dello studio nel mese di Luglio

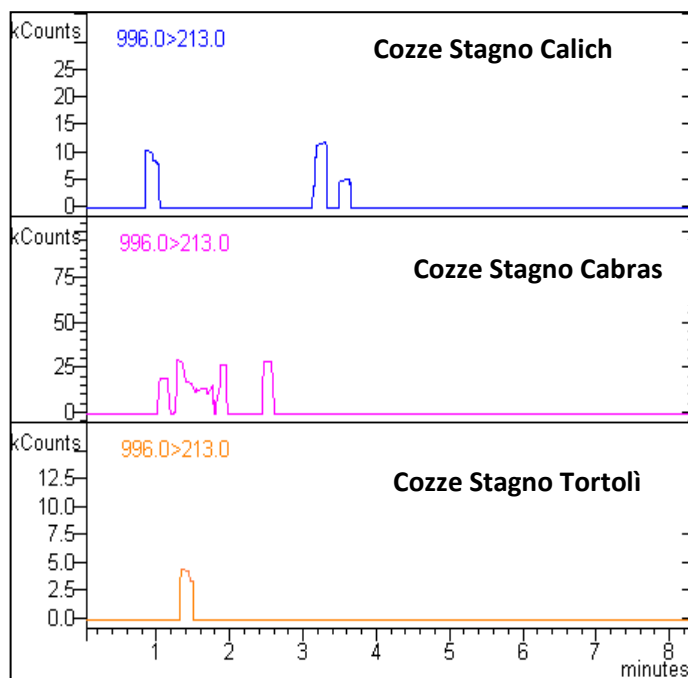


Figura 28. Cromatogramma di campioni di cozze proveniente

dagli stagni oggetto dello studio nel mese di Luglio

5. DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Nel presente lavoro è stata valutata l'eventuale presenza della microcistina-LR in campioni di acqua e molluschi bivalvi vivi provenienti da tre diversi siti lagunari della Sardegna.

Le analisi sono state effettuate utilizzando due tipologie di tecniche analitiche. Inizialmente è stata utilizzato il test immunoenzimatico ELISA e successivamente la cromatografia liquida accoppiata alla spettrometria di massa tandem. Il test ELISA ha rilevato la positività di alcuni campioni reali prelevati in alcuni mesi dell'arco temporale preso in esame. Tuttavia tale risultato non permette di poter affermare che i valori ottenuti siano dovuti alla presenza della MC-LR, considerata la non specificità del test ELISA che riconoscendo il gruppo chimico ADDA evidenzia sia le microcistine che le nodularine, non differenziando i congeneri.

La cromatografia liquida accoppiata alla spettroscopia di massa tandem è stata utilizzata come tecnica di conferma della presenza di MC-LR nei campioni risultati positivi con la tecnica ELISA. L'analisi LC-MS/MS effettuata, non ha rilevato la presenza di microcistina LR nei campioni analizzati al di sopra del limite di quantificazione del metodo.

I valori di microcistine totali e/o nodularine ottenuti con la tecnica ELISA sono estremamente bassi. Basti considerare che il limite imposto dalla WHO di $1\mu\text{g/mL}$ nell'acqua destinata al consumo umano è 100 volte superiore all' LOQ del metodo LC-MS/MS e 10.000.000 volte superiore alla più bassa concentrazione rilevata nei campioni reali di acqua analizzata.

I risultati ottenuti non possono che essere accolti con positività e rappresentano un valore aggiunto per queste zone che rivestono un importante ruolo nel sistema economico sia locale che regionale così come turistico ed ambientale.

Lo stagno del Calich è da sempre al centro di dibattiti, confronti ed analisi incentrati sul suo precario stato di salute. Il sito subisce, infatti, da lungo tempo una fortissima pressione eutrofica che deriva in parte dai molteplici scarichi di acque reflue, sia di origine urbana che agricola, ed in parte dall'assenza di un piano di riqualificazione degli afferenti all'ecosistema lagunare. Questo si riflette in maniera negativa sull'attività produttiva. Come descritto in precedenza, ad oggi le acque di questo stagno non sono state classificate dal punto di vista sanitario, ragion per cui qualsiasi attività inerente la molluschicoltura è severamente vietata. Nonostante i divieti, i molluschi bivalvi vivi ed in particolar modo i mitili, possono essere facilmente reperiti attraverso un sistema di vendita locale da parte di abusivi. Anche se la ricerca di MC-LR non rientra tra i parametri necessari richiesti per ottenere il nullaosta sanitario che autorizza la produzione e la raccolta di molluschi, i risultati del nostro studio possono contribuire al processo di graduale riqualifica dell'area.

Lo stagno di Cabras è una delle zone lagunari più importanti d'Europa che è riconosciuta dalla convenzione di Ramsar (convenzione sulle zone umide di importanza internazionale). Lo stagno ha segnato in maniera decisiva la storia del territorio circostante da tutti i punti di vista, a partire da quello economico fino a quello culturale. Negli anni il suo stato eutrofico è andato peggiorando e questa problematica si è manifestata in maniera frequente negli ultimi venti anni

attraverso periodiche crisi distrofiche che si sono tradotte in bruschi cali della produzione. Gli studi condotti su questa zona hanno rilevato anche la presenza di varie specie cianobatteriche, condizione in grado di mettere a rischio un intero sistema produttivo. Il risultato ottenuto può quindi arricchire, in maniera utile e concreta, i dati relativi alla salubrità dell'intera area contribuendo così a tutelare sia la salute pubblica che l'economia di questo importante sito.

Lo stagno di Tortoli viene considerato uno tra i più organizzati e produttivi della Sardegna grazie alla modernità degli impianti che si riflette sul sistema di allevamento e di pesca. Tuttavia, le notizie riguardanti lo stato eutrofico di questo sito sono scarse. Gran parte degli studi si concentrano infatti sui bacini di acqua dolce dell'area circostante nei quali tra il 2011 ed il 2013 si sono verificate intense fioriture cianobatteriche. Questo studio può quindi andare ad ampliare la rete di informazioni rendendo più completo il quadro conoscitivo di un'area di notevole importanza economica e naturalistica.

Nel complesso si può affermare che questo lavoro può essere considerato come un contributo reale alle informazioni riguardanti lo stato di salute degli stagni sardi presi in esame e dei loro prodotti, relativamente al parametro microcistine. I risultati del nostro studio possono essere interpretati in duplice modo: da un lato possono rappresentare un valore aggiunto per la valorizzazione dei prodotti locali e del territorio sardo che da anni è alla ricerca di un riscatto economico e turistico e dall'altro possono integrare ed arricchire la rete di dati ed informazioni volti alla tutela del consumatore e alla salvaguardia della salute pubblica.

Lo studio condotto negli Stati Uniti non fa che confermare i dati sulla tossicità delle microcistine abbondantemente riscontrabili in letteratura. Quello delle fioriture cianobatteriche è un problema emergente, in cui l'attività umana ha un ruolo di primo piano, come dimostra la situazione riscontrabile in California, relativamente allo stato trofico del Sacramento-San Joaquin River Delta.

È auspicabile che il presente lavoro sia considerato un punto di partenza per ulteriori indagini e che in futuro possa essere ampliato, perfezionato ed esteso ad altri siti territoriali, con la ricerca di altre cianotossine ed il coinvolgimento di altre specie ittiche e non solo.

6. BIBLIOGRAFIA

Adams D.G., Duggan P.S. (2008). “Cyanobacteria–bryophyte symbioses”. *J. Exp. Bot.* 59: 1047-1058 pp.

Amorim A., Vasconcelos V. (1999). “Dynamics of microcystins in the mussel *Mytilus galloprovincialis*”. *Toxicon* 37 (8), 1181–1185 pp.

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

Babica, P., Blaha, L., Maršalek, B., (2006). “Exploring the natural role of microcystins—a review of effects on photoautotrophic organisms”. *J. Phycol.* 42, 9–20 pp.

Baganz D., Staaks G.B.O., Steinberg C. (1998). “Impact of the cyanobacteria toxin, Microcystin-LR on behavior of Zebrafish, *Danio rerio*”. *Water Research* 32(3):948-952 pp.

Baganz D., Staaks G., Pflugmacher S., Steinberg CEW. (2004). “A comparative study on microcystin-LR induced behavioural changes of two fish species (*Danio rerio* and *Leucaspius delineatus*). *Environ. Toxicol.* 19:564-70 pp.

Beltrán E., Ibáñez M., Sancho J.V, Hernández F. (2012). “Determination of six microcystins and nodularin in surface and drinking waters by on-line solid phase extraction–ultra high pressure liquid chromatography tandem mass spectrometry”. *Journal of Chromatography A*, (1266)61–68 pp.

Tiziana Sedda –“Ricerca di Microcystin LR in molluschi bivalvi e nel loro habitat in alcune zone della Sardegna” – Tesi di Dottorato in Scienze Veterinarie – Università degli Studi di Sassari

Bruno M., Serenelli F., Germozzi R., Scagnetti V., Leoni T., Antonelli B., Melchiorre S., Messineo V. (2009). “L'eutrofizzazione tossica in un complesso artificiale multilacuale: i laghi del Fiastrone (1998-2007)”. Rapporti ISTISAN 08/6, Istituto Superiore Sanità.

Carmichael W.W., Beasley V., Bunner D.L, Eloff J.N, Falconer I., Gorham P., Harada K.I., Krishnamurthy T., Yu M.J., Moore R.E., Rinehart K., Runnegar M., Skulberg O.M., Watanabe.M. (1988). “Naming of cyclic heptapeptide toxins of cyanobacteria (blue-green algae)”. *Toxicon* 26(11):971-3 pp.

Carmichael, W.W., Falconer, I.R., (1993). “Diseases related to freshwater blue-green algal toxins, and control measures”. *Algal Toxins in Seafood and Drinking Water*. Academic Press, London, UK, 187–209 pp.

Carmichael,W.W. (1998). “Toxins of freshwater algae. In: Handbook of Natural Toxins, Vol. 3: Marine Toxins and Venoms” pp. 121–147 pp.

Carmichael W.W.(2001). “Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal”. Volume 7, Issue 5, 1393-1407 pp.

Cazenave J., Wunderlin D.A., de Los Angeles Bistoni M., Amé M.V., Krause E., Pflugmacher S., Wiegand C.(2005). “Uptake, tissue distribution and accumulation of Microcystin-RR in *Corydoras paleatus*, *Jenynsia multidentata* and *Odontesthes bonariensis*. A field and laboratory study”. *Aquat. Toxicol.* 75(2):178-90 pp.

Chen J., Xie P. (2005). “Seasonal dynamics of the hepatotoxic microcystins in various organs of four freshwater bivalves from the large eutrophic lake Taihu of subtropical China and the risk to human consumption”. *Environ Toxicol.* (6):572-84 pp.

Cheng X., Maher J., Dieter M. Z., Klassen C.D. (2005). “Regulation of mouse organic anion-transporting polypeptides (OATPs) in liver by prototypical microsomal enzyme inducers that activate transcription factor pathways”. *Drug Metabolism and Disposition*, 33: 1276-1282 pp.

Tiziana Sedda –“Ricerca di Microcystin LR in molluschi bivalvi e nel loro habitat in alcune zone della Sardegna” – Tesi di Dottorato in Scienze Veterinarie – Università degli Studi di Sassari

Chorus I., Bartram J. (1999). "Toxic cyanobacteria in water: a guide to their public health consequences, monitoring, and management". Published on behalf of WHO, New York.

Chorus, I., Falconer, I., Salas, H.J., and Bartram, J. (2000). "Health risks caused by freshwater cyanobacteria in recreational waters". *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B, Critical Reviews*. 4: 323-347 pp.

Chu F.S., Huang X., Wei R.D. (1990). "Enzyme-linked immunosorbent assay for microcystins in blue-green algal bloom". *Journal - Association of Official Analytical Chemists*, 73:451-6 pp.

De Figueiredo D.R., Reboilera A., Antunes S.C., Abrantes N., Azeiteiro U., Goncalves F., Pereira M.J. (2006). "The effect of environmental parameters and cyanobacterial blooms on phytoplankton dynamics of a Portuguese temperate Lake". *Hydrobiologia* 568, Issue 1, 145-157 pp.

Dillenberg H.O., Dehnel M.K. (1960). "Toxic waterbloom in Saskatchewan, 1959". *Can. Med. Assoc. J.* 83: 1151–1154 pp.

Falconer, I.R. (1991). "Tumor promotion and liver injury caused by oral consumption of cyanobacteria". *J. Environ. Toxicol. Water Qual.* 6:177–184 pp.

Falconer, I. R. (2005). "Cyanobacterial toxins of drinking water supplies: Cylindrospermopsins and Microcystins". CRC Press Boca Raton, FL, 263 pp.

Fawell, J.K., James H.A. (1994). "Toxins from blue-green algae: Toxicological assessment of anatoxin-a and a method for its determination in reservoir water". FWR Report No. FR0434/DoE 3728, Foundation of Water Research, Marlow, UK.

Fawell, J.K., Mitchell R.E., Everett D.J., Hill R.E. (1999). "The toxicity of cyanobacterial toxins in the mouse: I. Microcystin-LR". *Human & Experimental Toxicology*, 18(3): 162-167 pp.

Tiziana Sedda –"Ricerca di Microcystin LR in molluschi bivalvi e nel loro habitat in alcune zone della Sardegna" – Tesi di Dottorato in Scienze Veterinarie – Università degli Studi di Sassari

Figueiredo D.R., Azeiterio U.M., Esteves S.M., Goncalves F.J.M., Pereira M.J. (2004). "Microcystin producing blooms. A serious global public health issue". *Ecotoxicology and Environmental Safety* 59 151–163 pp.

Fischer W.J., Hotzfeld B.C., Tencalla F., Eriksson J.E., Mikhailov A., D. Dietrich D.(2000). "Microcystin-LR toxicodynamics, induced pathology, and immunohistochemical localization in livers of blue-green algae exposed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)". *Toxicol. Sci.* 54:365-373 pp.

Fischer W. J., Altheimer S., Cattori V. Meier P.J., Dietrich D.R., Hagenbuch B.(2005). "Organic anion transporting polypeptides expressed in liver and brain mediate uptake of microcystin". *Toxicology and Applied Pharmacology*, 203: 257-263 pp.

Fitzgeorge R.B., Clark S.A., Keevil C.W (1994). "Routes of intoxication. Detection methods for cyanobacterial toxins". Cambridge: The Royal Society of Chemistry 69-74 pp.

Flores E., Herrero A. (1994). "Assimilatory nitrogen metabolism and its regulation". *The molecular biology of cyanobacteria*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht pp. 487-517 pp.

Funari E., Testai E.(2008). "Human Health Risk Assessment Related to Cyanotoxins Exposure". *Critical Reviews in Toxicology*, 38:97–125 pp.

Gehring M.M. (2004). "Microcystin-LR and okadaic acid-induces cellular effects: a dualistic response". *FEBS Lett.* 557: 1-8 pp.

Giannuzzi L., Sedan D., Echenique R., Andrinolo D. (2011). "An acute case of intoxication with cyanobacteria and cyanotoxins in recreational water in Salto Grande Dam, Argentina". *Mar. Drugs* 9(11): 2164–2175 pp.

Grauer F.H., Arnold H.L.(1961). "Seaweed dermatitis: first report of dermatitis-producing marine algae". *Arch Dermatol* 84:720-32 pp.

Tiziana Sedda –"Ricerca di Microcystin LR in molluschi bivalvi e nel loro habitat in alcune zone della Sardegna" – Tesi di Dottorato in Scienze Veterinarie – Università degli Studi di Sassari

Guo N., Xie P.(2006). “Development of tolerance against toxic *Microcystis aeruginosa* in three cladocerans and the ecological implications”. Environ. Pollut. 143 513–518 pp.

Gupta N., Pant S.C., Vijayaaraghavan R., Lakshmana Rao P.V. (2003).”Comparative toxicity evaluation of cyanobacterial cyclic peptide toxin microcystin congeners (LR, RR, YR) in mice”. Toxicology, 188(2): 285-296 pp.

Gustafsson S., Rengefors K., Hansson L.A. (2005). “Increased consumer fitness following transfer of toxin tolerance to offspring via maternal effects”. Ecology. 86 2561–2567 pp.

Guzzella L., Ghislanzoni L., Pozzoni F., Cerasino L., Salmaso N. (2010). “Determinazione di tossine algali (microcistine e nodularina) nelle acque superficiali”. Notiziario dei Metodi Analitici 1.

Hans W.P. (2006) “A comparison of cyanobacterial bloom dynamics in freshwater. Estuarine and marine environments” . Phycologia 35 (supplement) 25-35 pp.

Harada, K., Tsuji K., Watanabe M.F.,(1996).“Stability of microcystins from cyanobacteria III. Effect of pH and temperature”. Phycologia 35(6): 83-88 pp.

Harada K., Imanishi S., Kato H., Mizuno M., Ito E., Tsuji K.(2004). “Isolation of ADDA from microcystin- LR by microbial degradation”. Toxicon, 44:107-9 pp.

Hoiczuk E., Hansel A., 2000. “Cyanobacterial cell walls: news from an unusual prokaryotic envelop”. J. Bacteriol. 182: 1191-1199 pp.

Hormazábal V., Østensvik Ø, Underdal B., O. Skulberg O.M. (2000). “Simultaneous determination of cyanotoxins anatoxin a, microcystin desmethyl-3, lr, rr, and yr in fish muscle using liquid chromatography-mass spectrometry”. Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies, 23:185-96 pp.

Tiziana Sedda –“Ricerca di Microcystin LR in molluschi bivalvi e nel loro habitat in alcune zone della Sardegna” – Tesi di Dottorato in Scienze Veterinarie – Università degli Studi di Sassari

Hyenstrand P., Blomquist P., Pettersson A. (1998). "Factors determining cyanobacterial success in aquatic systems – a literature review". Arch Hydrobiol, Spec Issues Advanc. Limnol. 51:41-62 pp.

IARC-International Agency for Research on Cancer (2006). "Cyanobacterial peptide toxins". www.iarc.fr.

Ito E., Takai A., Kondo F., Masui H., Imanishi S., Harada K. (2002) "Comparison of protein phosphatase inhibitory activity and apparent toxicity of microcystins and related compound". Toxicon 2002;40:1017-25 pp.

Jassby A.D. (2008). "Phytoplankton in the upper San Francisco Estuary: recent biomass trends, their causes and their trophic significance". San Fran Est Watershed Sci. 2008;6:1–24 pp.

Jones, G.J., Orr P.T. (1994). "Release and degradation of microcystin following algicide treatment of a *Microcystis aeruginosa* bloom in a recreational lake, as determined by HPLC and protein phosphatase inhibition assay". Water Res. 28:871–876 pp.

Jones, G.J., Falconer, I.F., and Wilkins, R.M. (1995). "Persistence of cyclic peptide toxins in dried cyanobacterial crusts from lake Mokoan, Australia". Environ. Toxicol. Water Qual. 10:19–24 pp.

Jungblut A., Hawes I., Mountfort D., Hitzfeld B., Dietrich D.R., Burns B.P. & Neilan B.A. (2005). "Diversity within cyanobacterial mat communities in variable salinity meltwater ponds of McMurdo Ice Shelf, Antarctica". Environ. Microbiol. 7: 519-529 pp.

Kaebernick M., Dittmann E. (2002). "Multiple alternate transcripts direct the biosynthesis of microcystins, a cyanobacterial". Appl. Environ. Microbiol. 68(2):449-55 pp.

Kankaanpaa H.T., Holliday J., Schroder H., Goddard T.J., Fister R., Carmichael W.W., (2005). "Cyanobacteria and prawn farming in Northern New South Wales,

Tiziana Sedda –"Ricerca di Microcystin LR in molluschi bivalvi e nel loro habitat in alcune zone della Sardegna" – Tesi di Dottorato in Scienze Veterinarie – Università degli Studi di Sassari

Australia. A case study on cyanobacteria diversity and hepatotoxin bioaccumulation”. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 203:243-256 pp.

Kaya K., Sano T. (1999). “Total microcystin determination using erythro-2-methyl-3-(methoxy-d3)-4-phenylbutyric acid (MMPB-d3) as the internal standard”. *Analytica Chimica Acta*, (386) 107-112 pp.

Kenefick S.L., Hrudey S.E., Peterson H.G., Prepas E.E. (1993). “Toxin release from *Microcystis aeruginosa* after chemical treatment”. *Water Sci. Technol.* 27 433–440 pp.

Kohoutek J., Adamovský O., Oravec M., Šimek Z., Palíková M., Kopp R., Bláha L. (2010). “LC-MS analyses of microcystins in fish tissues overestimate toxin levels—critical comparison with LC-MS/MS,”. *Analytical and bioanalytical Chemistry* 398: 1231–1237 pp.

Kurmayer R., Dittman E., Fastner J., Chorus I. (2002). “Diversity of microcystin genes within population of the toxic cyanobacterium *Microcystis* spp. in Lake Wannsee (Berlin, Germany)”. *Microb Ecol.* 43: 107-118 pp.

Kurobe T., Lehman P., Lam C., Alice Tung A., Dolores Baxa D., The S. (2015). “Drought enhances abundance and biodiversity of cyanobacteria in the Sacramento-San Joaquin Delta”. *San Francisco Estuary Conference*.

Lawton L.A., Edwards C., Codd G.A. (1994). “Extraction and high-performance liquid chromatographic method for the determination of microcystins in raw and treated waters”. *Analyst*, 119:1525-30 pp.

Lehman P., Kurobe T., Mizel M., Alice Tung A., Teh S., The Impact of the 2014 Severe Drought on *Microcystis* Blooms in the San Francisco Estuary”. *San Francisco Estuary Conference*.

Li Y., Chen J.A., Zhao Q., Pu C., Qiu Z., Zhang R., Shu W. (2011). “A cross-sectional investigation of chronic exposure to microcystin in relationship to

Tiziana Sedda –“Ricerca di Microcystin LR in molluschi bivalvi e nel loro habitat in alcune zone della Sardegna” – Tesi di Dottorato in Scienze Veterinarie – Università degli Studi di Sassari

childhood liver damage in the Three Gorges Reservoir Region, China”. *Environ. Health Perspect.* 119(10): 1483–1488 pp.

Lilleheil G., Andersen R.A., Skulberg O.M., Alexander J., (1997). “Effects of a homoanatoxin-a-containing extract from *Oscillatoria formosa* (cyanophyceae/cyanobacteria) on neuromuscular transmission”. *Toxicon* 35, 1275–1289 pp.

Lopez-Rodas V., Maneiro E., Lanzarot M.P., Perdigonés N., Costas E. (2008). “Mass wildlife mortality due to cyanobacteria in the Donana National Park, Spain”. *Vet. Rec.* 162(10): 317–318 pp.

Lurling M., Faassen E.J. (2013). “Dog poisonings associated with a *Microcystis aeruginosa* bloom in the Netherlands”. *Toxins* 5(3): 556–567 pp.

Magalhães V.F., Soares R.M., Azevedo S.M. (2001). “Microcystin contamination in fish from the Jacarepaguá Lagoon (Rio de Janeiro, Brazil): ecological implication and human health risk”. *Toxicon* 39(7):1077-85 pp.

Malbrouck C., Kestemont P. (2006) “Effect of microcystins on fish”. *Environmental Toxicology and Chemistry* 25(1):72-86 pp.

Martinez G., Pineiro N., Agüete E.C, Vaquero E., Nogueiras M., Leão J.M, Rodríguez-Vázquez J.A, Dabek-Zlotorzynska E. Further. (2003). “Improvements in the application of high-performance liquid chromatography, capillary electrophoresis and capillary electrochromatography to the analysis of algal toxins in the aquatic environment”. *Journal of Chromatography A*, 992:159-68 pp.

Martins J., Vasconcelos V.M. (2009) “Microcystin dynamics in aquatic organism”. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B: Critical Reviews*, 12:1, 65-82 pp.

Tiziana Sedda –“Ricerca di Microcystin LR in molluschi bivalvi e nel loro habitat in alcune zone della Sardegna” – Tesi di Dottorato in Scienze Veterinarie – Università degli Studi di Sassari

Mattei D., Stefanelli M. (2008). “Distribuzione e fisiologia dei ciano batteri potenzialmente tossici in Italia”. Rapporti ISTISAN 08/6, Istituto Superiore Sanità.

McElhiney J., Lawton L. (2005). “Detection of the cyanobacterial hepatotoxin microcystin”. *Toxicol Appl Pharmacol.* 203: 215-230 pp.

Mengoli A. (1998). Aspetti morfo funzionali di mitili. *Laguna* 4 12-19 pp.

Mekebri A., Blondina G.J., Crane D.B., Method validation of microcystins in water and tissue by enhanced liquid chromatography tandem mass spectrometry, *Journal of Chromatography A*, 1216 (2009) 3147-55 pp.

Mikhailov A., Harmala-Brasken A.S., Hellman J.M., Eriksson J.E. (2003). “Identification of ATP-synthase as a novel intracellular target for microcystin-LR”. *Chem. Biol. Interact.* 142(3):223-37 pp.

Mur L.R., Skulberg M.O., Utkilen H. (1999). “Cyanobacteria in the environment”. *Toxic cyanobacteria in water: a guide to their public health consequences, monitoring and management.* London, UK: E & FN Spon; p. 15–40 pp.

Murch S.J., Cox P.A., Banack S.A.(2004). “A mechanism for slow release of biomagnified cyanobacterial neurotoxins and neurodegenerative disease in Guam”. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101:12228–12231 pp.

Nilsson M., Rasmussen U. & Bergman B. (2006). Cyanobacterial chemotaxis to extracts of host and non-host plants. *FEMS Microbiol. Ecol.* 55: 382-390 pp.

Nishiwaki R., Ohta, T., Nishiwaki, S. (1992). “Liver tumor promotion by the cyanobacterial cyclic peptide toxin Microcystin-LR”. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 118:420–424 pp.

O’Neil J.M., Davis T.W., Burford M.A., Gobler C.J. (2012). “The rise of harmful cyanobacteria blooms: The potential roles of eutrophication and climate change”. *Harmful Algae* 14:313-34 pp.

Tiziana Sedda –“Ricerca di Microcystin LR in molluschi bivalvi e nel loro habitat in alcune zone della Sardegna” – Tesi di Dottorato in Scienze Veterinarie – Università degli Studi di Sassari

Paerl H.W., Paul V.J. (2012). "Climate change: links to global expansion of harmful cyanobacteria." *Water Res.* 46(5):1349-63 pp.

Pearson M.J., Ferguson A.J.D., Codd G.A., Reynolds C.S., Fawell J.K., Hamilton R.M., Howard S.R., Attwood M.R. (1990). "Toxic Blue-Green Algae". National Rivers Authority, Water Quality Series, No. 2, London England.

Puschner B., Galey F.D., Johnson B., Dickie C.W., Vondy M., Francis T., Holstege D.M. (1998). "Blue-green algae toxicosis in cattle". *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 213(11): 1605–1607 pp

Ressom R., Soong F.S, Fitzgerald J., Turczyonowicz L., El Saadi O., Roder D., Maynard T., Falconer I. (1994). "Health effects of toxic cyanobacteria (blue-green algae)". National Health and Medical Research Council, Looking Glass Press. Canberra, Australia.

Sekijima M., Tsutsumi T., Yoshida T., Harada T., Tashiro F., Chen G., Yu S., Ueno Y. (1999). "Enhancement of glutathione S-transferase placental-form positive liver cell foci development by Microcystin-LR in Aflatoxin B1-initiated rats". *Carcinogenesis.* 20:161-165 pp.

Sellner K.G., Doucette G.J., Kirkpatrick G.J. (2003). "Harmful algal blooms: causes, impacts and detection". *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 30(7) : 383-406 pp.

Sivonen K., Jones G. (1999). "Cyanobacterial toxins" *Toxic cyanobacteria in water: a guide to their public health consequences, monitoring and management*" London, Spon press, pp. 41-111 pp.

Smith, V.H., Bennett, S.J., (1999). Nitrogen:phosphorus supply ratios and phytoplankton community structure in lakes. *Archiv. fur Hydrobiologie* 146 37–53 pp.

Soares R.M., Magalhaes V.F., Azevedo S.M.F.O. (2004). "Accumulation and depuration of microcystins (cyanobacteria hepatotoxins) in *Tilapia rendalli* (Cichlidae) under laboratory conditions". *Aquatic Toxicology* (70)1–10 pp.

Tiziana Sedda –"Ricerca di Microcystin LR in molluschi bivalvi e nel loro habitat in alcune zone della Sardegna" – Tesi di Dottorato in Scienze Veterinarie – Università degli Studi di Sassari

Soares R.M., Yuan M., Servaites J.C., Delgado A., Magalhães V.F., Hilborn E.D., Charmichael W.W., Azevedo S.M.F.O. (2006) . “Sub-lethal exposure from microcystins to renal insufficiency patients in Rio de Janeiro – Brazil” *Environ Toxicol.* 21:95-103 pp.

Stal L.J. (1995). “Physiological ecology of cyanobacteria in microbial mats and other communities”. *New Phytologist* 131(1):1-32 pp.

Stewart I., Webb P.M., Schluter P.J., Shaw G.R. (2006). “Recreational and occupational field exposure to freshwater cyanobacteria - a review of anecdotal and case reports, epidemiological studies and the challenges for epidemiologic assessment”. *Environ Health: a Global Access Science Source* 5:6.

Svirčev Z., Krstic S., Miladinov-Mikov M., Baltic V., Vidovic M. (2009). “Freshwater cyanobacterial blooms and primary liver cancer epidemiological studies in Serbia”. *J. Environ. Sci. Health C* 27: 36–55 pp.

Svirčev Z., Baltić V., Gantar M., Juković M., Stojanović D. (2010). “Molecular Aspects of microcystin-induced hepatotoxicity and hepatocarcinogenesis”. *J Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev.* 28:39-59 pp.

Svoboda M., Riha J., Wlcek K., Jaeger W., Thalhammer T. (2011). “Organic Anion Transporting Polypeptides (OATPs): regulation of expression and function”. *Current Drug Metabolism*, 12(2): 139-153 pp.

Taton A., Grubisic S., Balthasart P., Hodgson D.A., Laybourn-Parry J.& Wilmotte A. (2006) “Biogeographical distribution and ecological ranges of benthic cyanobacteria in East Antarctic lakes”. *FEMS Microbiol. Ecol.* 20: 1-18 pp.

Tencalla F.G., Dietrich D.R., Schlatter C. (1994). “Toxicity of *Microcystis aeruginosa* peptide toxin to yearling rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)”. *Aquat Toxicol.* 30:215-24 pp.

Tiziana Sedda –“Ricerca di Microcystin LR in molluschi bivalvi e nel loro habitat in alcune zone della Sardegna” – Tesi di Dottorato in Scienze Veterinarie – Università degli Studi di Sassari

Tillmanns A., Wilson A.E., Pick F.R., Sarnelle O. (2008). “Meta-analysis of cyanobacterial effects on zooplankton population growth rate: species-specific responses”. *Fundam. Appl. Limnol. Arch. Hydrobiol.* 171:285–295 pp.

Turner P.C., Gammie A.J., Hollinrake K., Codd G.A.. (1990). “Pneumonia associated with contact with cyanobacteria”. *BMJ* 300(6737): 1440–1441 pp

Van Apeldoorn M.E., van Egmond H.P., Speijers G.J.A., Bakker G.J.I. (2007) “Toxins of cyanobacteria”. *Mol. Nutr. Food Res.* 51:7–60 pp.

Van den Hoek C., Mann D.G. and Jahns H.M.,1995. “Algae: an introduction to phycology”. Cambridge University Press, Cambridge 627 pp.

Van der Merwe D., Sebbag L., Nietfeld J.C., Aubel M.T., Foss A., Carney E. (2012). “Investigation of a *Microcystis aeruginosa* cyanobacterial freshwater harmful algal bloom associated with acute microcystin toxicosis in a dog”. *J. Vet. Diagn. Invest.* 24(4): 679–687 pp.

Vasconcelos V.M. (1995). “Uptake and depuration of the heptapeptide toxin Microcystin-LR in *Mytilus galloprovincialis*”. *Aquat. Toxicol.* 32:227-237 pp.

Wangth H.B., Zhuth H.G. (1996). “ Promoting activity of microcystins extracted from water blooms in SHE cell trasformation assay”. *Biomed Environ Sci.* 9: 46-51 pp.

Watanabe M.F., Oishi S., Harada K.L., Matsura K., Kawai H., Suzuki M. (1988) “Toxins contained in *Microcystis* specie of cyanobacteria (blue-green algae)”. *Toxicon* 26:1017-25 pp.

WHO (World Health Organization), <http://www.who.int/>

Widdow S., Donkin P. (1992). “Mussels and environmental contaminants: bioaccumulation and physiological aspects. In *The mussel Mytilus: ecology, physiology, genetics and culture.* Gosling, Elsevier Amsterdam 383-398 pp.

Tiziana Sedda –“Ricerca di Microcystin LR in molluschi bivalvi e nel loro habitat in alcune zone della Sardegna” – Tesi di Dottorato in Scienze Veterinarie – Università degli Studi di Sassari

Williams, D.E., Dawe, S.C., Kent, M.L., Andersen, R.J., Craig, M., Holmes, C.F.B. (1997). “Bioaccumulation and clearance of microcystins from salt water mussels, *Mytilus edulis*, and in vivo evidence for covalently bound microcystins in mussel tissues”. *Toxicol.* 35 (11) 1617–1625 pp.

Wilson A.E., Hay M.E. (2007). “A direct test of cyanobacterial chemical defense: variable effects of microcystin-treated food on two *Daphnia pulicaria* clones”. *Limnol. Oceanogr.* 52:1467–1479 pp.

Wolk C.P, 1973. “Physiology and cytological chemistry of blue-green algae” *Bacteriol. Rev.* Vol. 37 (1)32-101 pp.

Xie L., Xie P., Guo L., Li L., Miyabara Y., Park H. (2005).”Organ distribution and bioaccumulation of microcystins in freshwater fish at different trophic levels from the eutrophic Lake Chaohu, China”. *Environ Toxicol.* 20(3):293-300 pp.

Yu S., Zhao N., Zi X. (2001). “The relationship between cyanotoxin (microcystin, MC) in pond-ditch water and primary liver cancer in China”. *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi* 23(2): 96–99 pp.

Zohary T., Padisák J., Naselli-Flores L. (2010). “Phytoplankton in the physical environment: papers from the 15th workshop of the International Association for Phytoplankton Taxonomy and Ecology”. *Hydrobiologia* 639(1).

Zurawell R.W., Chen H., Burke J.M., Prepas E. E., (2005) “Hepatotoxic cyanobacteria: a review of the biological importance of microcystins in freshwater environments”. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B*, 8:1–37 pp.

RINGRAZIAMENTI

Giunta al termine di questi tre anni di Dottorato desidero ringraziare tutte le persone che, in ambito lavorativo e non, mi sono state vicine durante la realizzazione e la stesura di questo lavoro.

Ringrazio la Prof.ssa Demontis e la Dott.ssa Varoni per il supporto datomi in questi anni e per avermi dato la possibilità di realizzare questo lavoro.

Tiziana Sedda –“Ricerca di Microcystin LR in molluschi bivalvi e nel loro habitat in alcune zone della Sardegna” – Tesi di Dottorato in Scienze Veterinarie – Università degli Studi di Sassari

Ringrazio la Dott.ssa Baralla e la Dott.ssa Pasciu per l'indispensabile sostegno, i preziosi consigli ed il fondamentale contributo nella parte analitica.

Ringrazio il Prof. Moniello per i preziosi consigli ed il sostegno in vista della mia partenza negli Stati Uniti ed il Dott. Tomofumi Kurobe della UC Davis University of California Davis- Institute of Aquatic Toxicology of Veterinary Medicine per l'ospitalità ed i validi insegnamenti

Ringrazio la Dott.ssa Lorenzoni e tutto il Dipartimento di Igiene degli alimenti dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sardegna per avermi fornito gran parte dei campioni.

Ringrazio il Prof. Boatto, la Dott.ssa Nieddu , la Dott.ssa Burrai del Dipartimento di Chimica e Farmacia e tutta la Sezione di Tecnologie Ambientali e Alimentari (STAA) del Dipartimento di Agraria per la disponibilità e cortesia durante la fase analitica.

Ringrazio il Prof. Nicola Sechi , la Prof.ssa Lugliè del Dipartimento di Scienze Naturali ed il Dott. Floris per i consigli durante la prima fase di campionamento