

Tecniche di estrazione ed analisi di tossine algali in ambiente acquatico: rilevanza ecologica e rischio sanitario

Licia Guzzella

CNR-IRSA, Brugherio (MB)

guzzella@irsa.cnr.it



Le cianoficee

Le *cianoficee o cianobatteri o alghe azzurre* sono una delle più importanti classi algali presenti nelle acque superficiali. Sono organismi *ubiquitari e cosmopoliti*, che presentano notevole tolleranza a condizioni estreme di *temperatura, intensità luminose, siccità e nutrienti*, ma soprattutto possiedono una grande *capacità di adattamento* alle varie condizioni.

Le *cianoficee* sono caratterizzate da una grande *variabilità morfologica*, con forme unicellulari e coloniali, queste ultime globali o filamentose

Cenni di sistematica

È un raggruppamento variegato costituito da organismi unicellulari **procarioti**

La **classe delle cianoficee** si divide in due ordini:

Chroococcales

Generi

Aphanotheche

Coelosphaerium

Gloeocapsa

Gloeotheca

Gomposphaeria,

Microcystis

Synechococcus

Cellule solitarie (es. *Synechococcus*)

Cellule riunite in colonie ad organizzazione coccale (es. *Microcystis*)



Nostocales

Generi

Anabaena

Anabaenopsis

Aphanizomenon

Gloeotrichia

Lyngbya

Nodularia

Nostoc

Planktothrix

Pseudoanabaena

Schizothrix

Spirulina

Trichodesmium

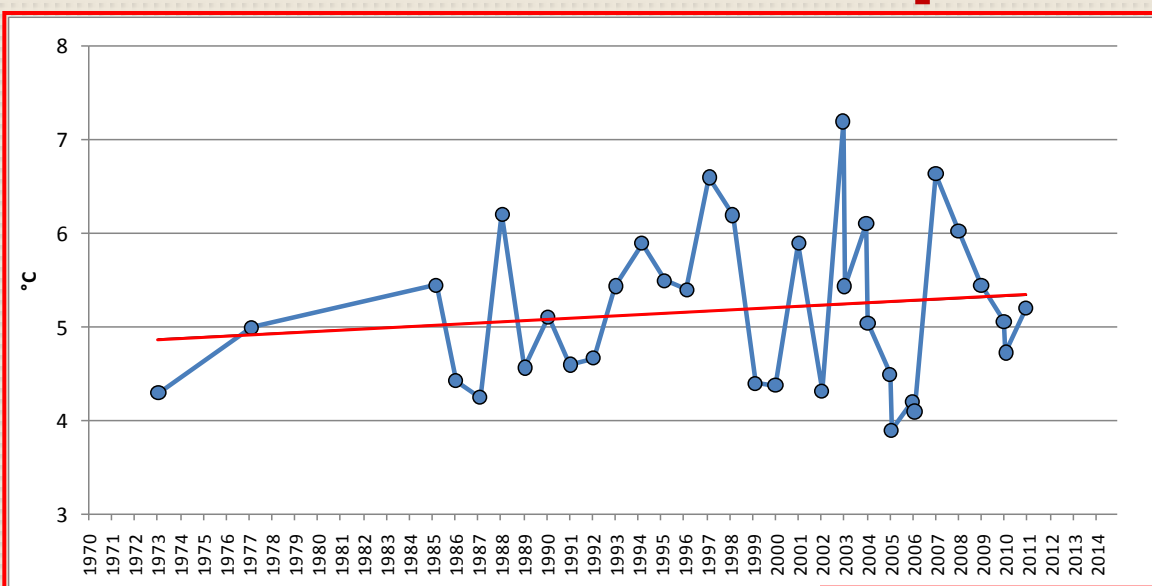
formano colonie filamentose (es. *Aphanizomenon*)



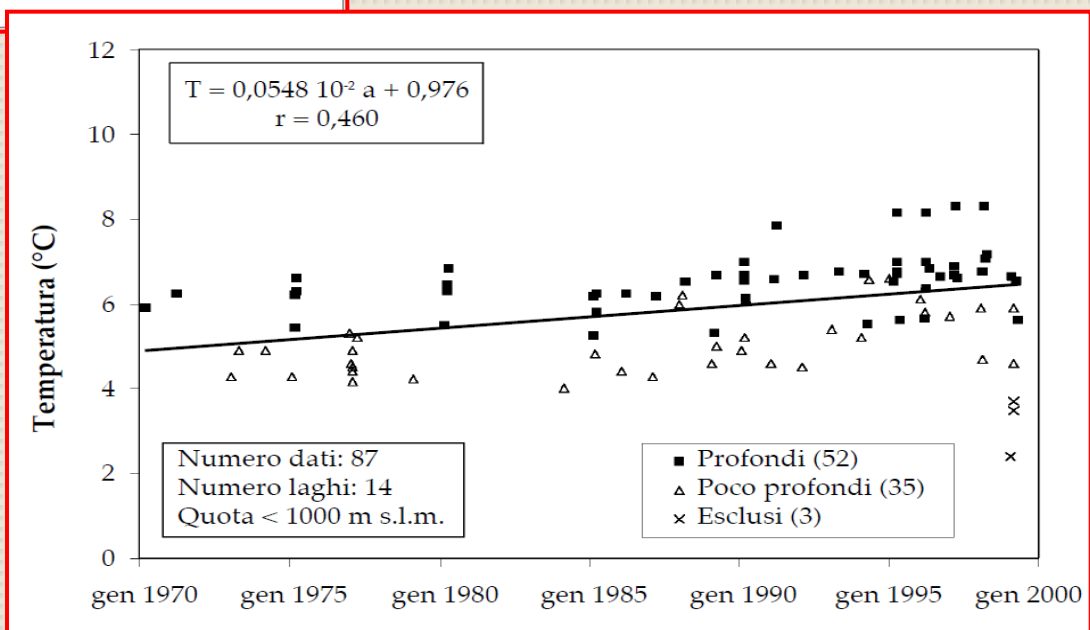
Fioriture di cianobatteri

Alcuni autori mettono in relazione *l'aumento della presenza di cianobatteri* agli *effetti dei cambiamenti climatici*, in particolare al *riscaldamento globale*, che agiscono come catalizzatori per le fioriture di cianobatteri. *Alcuni cianobatteri sono caratteristici delle acque eutrofiche*, *altri* (tra cui *Planktothrix rubescens*) *hanno intensificato la loro fioritura* durante neil processo di riduzione dei carichi di nutrienti l bacino e allo stesso tempo, durante *la riduzione dello stato trofico* in diversi ambienti europei. Il problema ha ormai una dimensione notevole e numerose istituzioni nazionali ed internazionali sono interessati al problema.

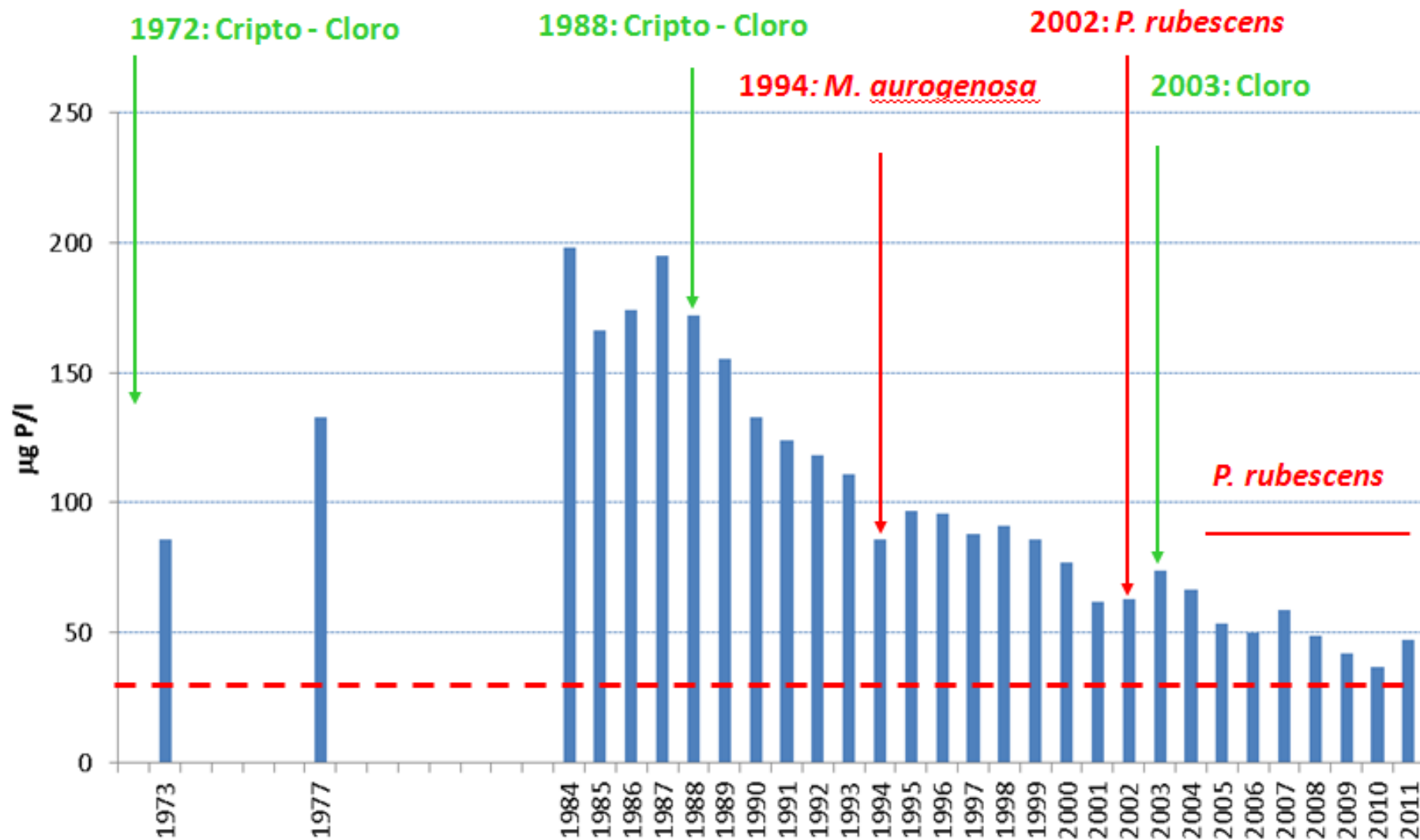
L'aumento della temperatura nel Pusiano



La temperatura alla circolazione del lago di Pusiano mostra un aumento medio di circa *0,2°C per decennio* in linea con l'andamento di altri laghi sud alpini e con simulazioni modellistiche



Un caso di studio: il Lago di Pusiano



Le cianotossine

Lo sviluppo sempre più abbondante di fioriture di cianoficee è diventato un problema molto serio, poichè molte specie sono in grado di produrre come *metaboliti secondari* una grande varietà di *cianotossine*. Nel 50-75% dei casi, la tossicità delle fioriture di cianobatteri è dovuta alla presenza contemporanea di *diverse tossine*, la cui percentuale relativa e distribuzione spaziale può subire variazioni, determinando differenze di tossicità della fioritura.

Fattori che determinano la produzione di tossine

Variabilità genetica

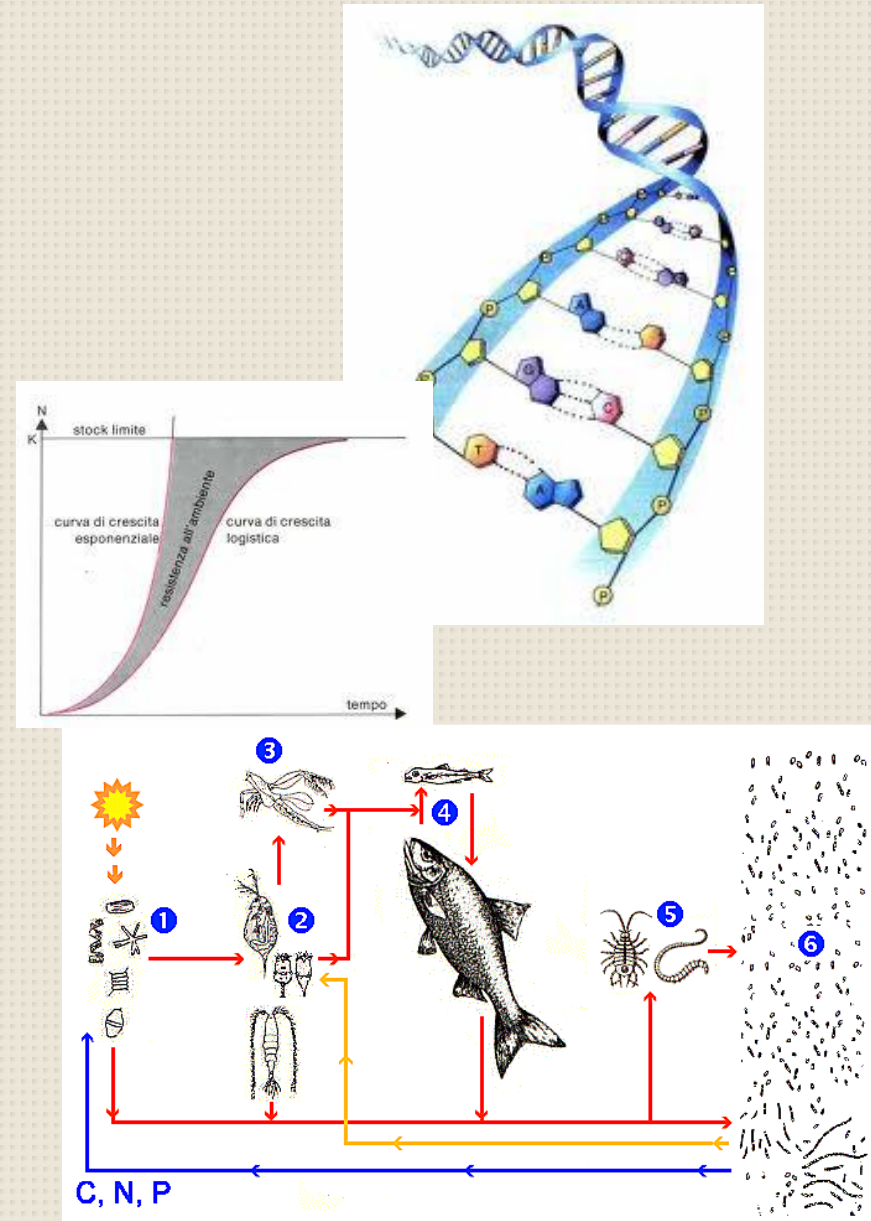
Sono infatti tossiche solo le popolazioni che contengono genotipi in grado di produrre tossine algali

Dinamica della popolazione

In generale si osserva una maggiore produzione di tossine durante la fase di crescita esponenziale verso lo stadio finale della fioritura

Fattori ambientali

La produzione di tossine è infine influenzata da diversi fattori abiotici (nutrienti, luce, temperatura) e biotici (predazione, competizione)



Le cianotossine

Neurotossine

Epatotossine



Sassitossine

Anatossine

Cilindrospermopsina

Microcistine

Nodularine

Alcaloidi

Peptidi ciclici

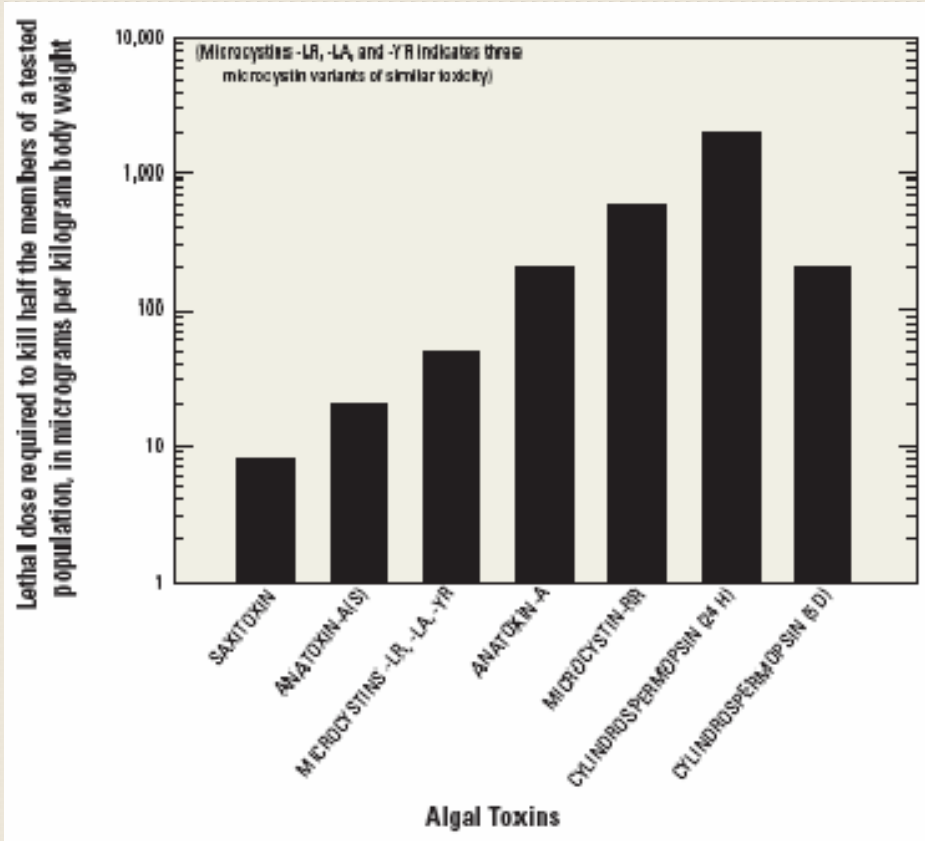
Vie di esposizione	Mezzo
Orale	Acqua potabile Acque ad uso ricreazionale Cibo (prodotti ittici)
Polmonare	Aerosol, spray in attività di ricreazione, lavoro, doccia
Cutanea	Attività di ricreazione, lavoro, doccia
Emodialisi	Acqua usata per emodialisi

Generi di cianobatteri che producono tossine

	Peptidi ciclici		Alcaloidi			Aminoacidi	
	Microcistine	Nodularine	Cylindro-spermopsine	Anatossine	Sassitossine (PSP)	BMAA	
<i>Anabaena</i>	X			X	X	X	X
<i>Aphanizomenon</i>	X		X	X	X	X	X
<i>Cylindrospermopsis</i>			X		X	X	X
<i>Microcystis</i>	X					X	X
<i>Nodularia</i>		X				X	X
<i>Planktothrix</i>	X			X	X	X	X
<i>Nostoc</i>	X						X
<i>Pseudoanabaena</i>	X						X

Molto spesso ogni cianobatterio produce diverse tossine. Tuttavia, la produzione di tossine non è costante e può variare molto in risposta a fattori biotici e abiotici.

Confronto della tossicità di alcune delle cianotossine



Le tossine hanno diversa tossicità acuta. In caso di eventi di intensa fioritura, la concentrazione di cianotossine in acqua può raggiungere valori molto elevati. In queste occasioni le tossine possono causare intossicazioni acute nell'uomo e negli animali.

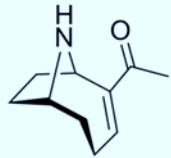
Sassitossina è la tossina più pericolosa in queste occasioni.

Tuttavia, in generale, **alcaloidi (sassitossine, anatoxine, cilindrospermopsine) vengono rapidamente inattivate in acqua.**

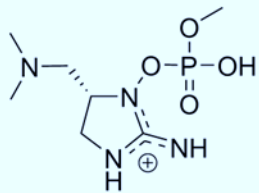
Al contrario, le microcistine sono molto stabili e possono permanere in acqua per lungo tempo. Una prolungata esposizione degli esseri umani alle microcistine è in grado di produrre malattie gravi. In effetti, alcuni sono microcistine sono promotori tumorali.

Struttura chimica delle cianotossine

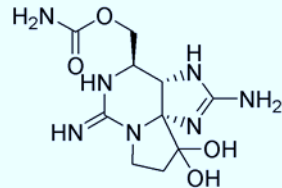
Alkaloids



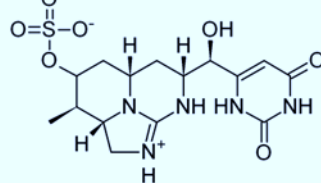
Anatoxin-a



Anatoxin-a(S)

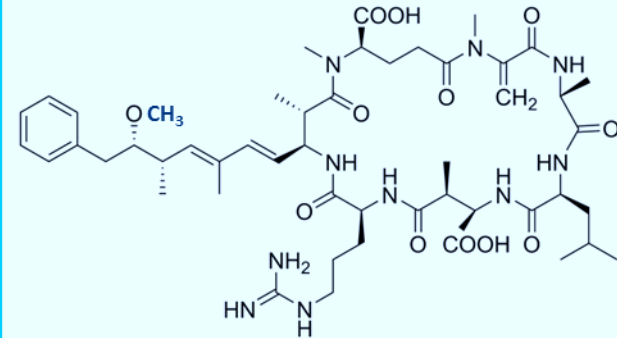


Saxitoxin



Cylindrospermopsin

Cyclic peptide



Microcystin-LR

Oltre a quelle rappresentate nelle immagini, molte altre sostanze tossiche sono state identificate. In particolare, vi sono 3 anatoossine, 2 cilindrospermopsine e almeno 20 sassitossine. Il numero totale di peptidi ciclici è di circa 80 (3 nodularine e almeno il 75 microcistine).

Tutte queste varianti hanno tossicità differente!

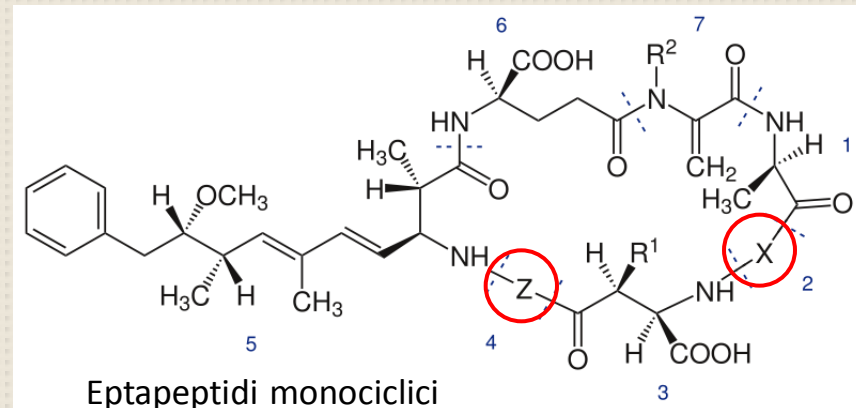
Per una valutazione dei rischi affidabile dovremmo essere in grado di identificare e quantificare ogni singola variante.

Le microcistine

Le microcistine sono tra *le cianotossine quelle più diffuse* e vengono prodotte dalla maggior parte delle specie di *Microcystis* e da alcune specie di *Anabaena*, da *Planktothrix agardhii* e *rubescens*.

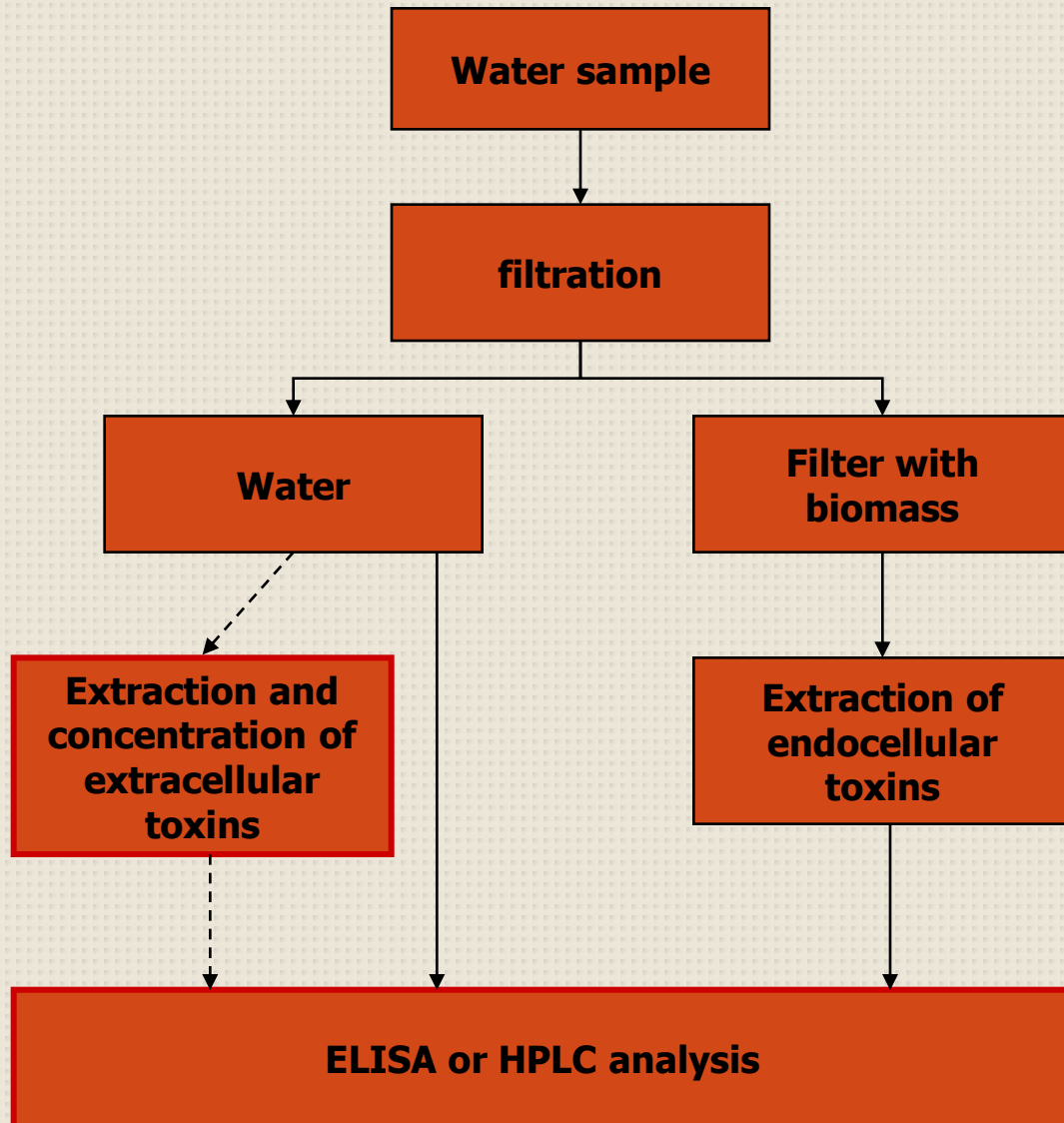
Sono *molecole stabili e persistenti*, a causa della loro struttura ciclica, che possono quindi persistere nell'ambiente anche per periodi relativamente lunghi soprattutto in assenza di luce.

Finora si conoscono più di ottanta isomeri, in maggioranza idrofili, anche se i più diffusi sono sei: la **MC-LR**, la **MC-RR** con i diversi epimeri, la **MC-YR**, la MC-LA, MC-LF e la MC-LW.



Composizione sostituenti		
Nome	Z	X
Microcistina LR	Arg	Leu
Microcistina RR	Arg	Arg
Microcistina YR	Arg	Tyr

Diagramma di flusso per l'analisi delle cianotossine



Campionamento, filtrazione e estrazione di tossine endocellulari sono operazioni comuni per tutte le tossine, mentre *l'estrazione e la concentrazione delle tossine extracellulari e l'analisi* sono operazioni specifiche per le diverse tossine.

Campionamento

Per lo studio delle *dinamiche di produzione delle tossine* può essere utile campionare *al picco di clorofilla* se si dispone di una sonda Fluoro Probe o al picco di ossigeno disciolto se si dispone di una sonda CTD oppure campionare *la zona eufotica* con campionamento ad intervalli di 2,5-5 m, evitando il campionamento integrato sulla colonna d'acqua.

La morte cellulare dei cianobatteri determina la comparsa di *schiume superficiale* che raccolgono materiale in decomposizione: qui la concentrazione delle tossine può essere molto elevata, in quanto viene riversato all'esterno il contenuto endocellulare.

Per la balneazione esistono norme a parte relative al campionamento.

Limite di legge

- Valore guida OMS per le acque potabili: $1 \mu\text{g/L}$
- Valore limite per le acque di balneazione: $25 \mu\text{g/L}$
secondo Decreto Legge n. 116/2009

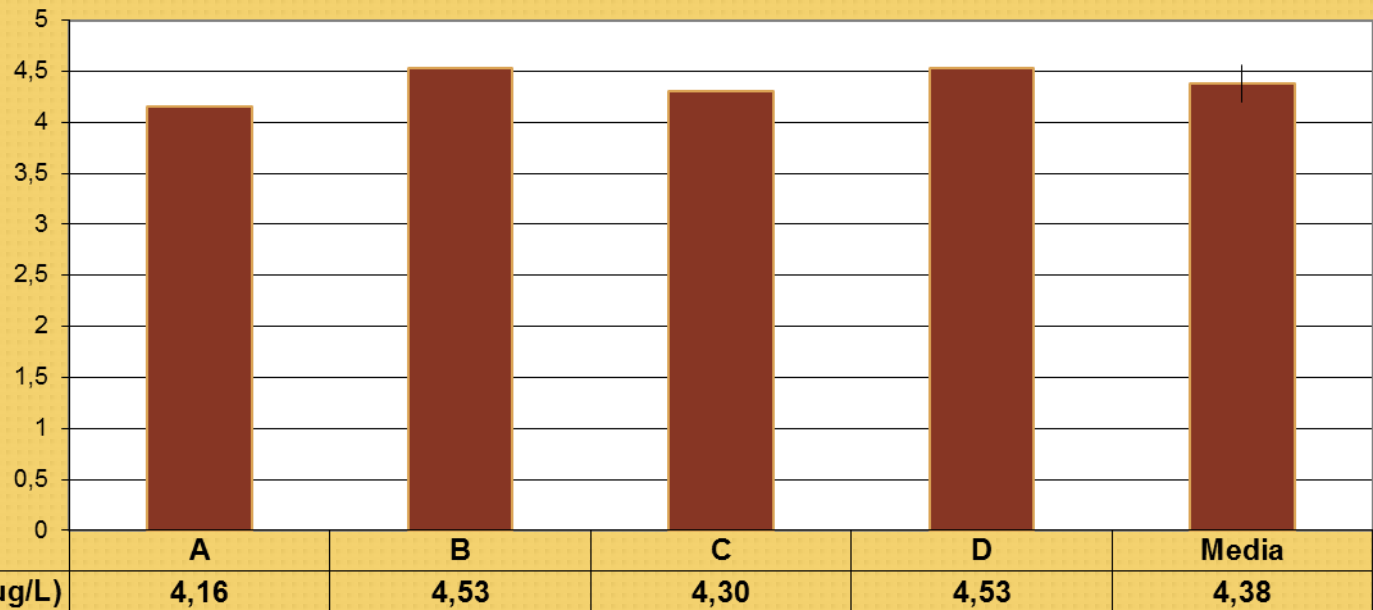
Analisi della fase endocellulare: quale metodo?

Il campione è filtrato su GF/C per separare le alghe e il filtro è congelato per una notte.

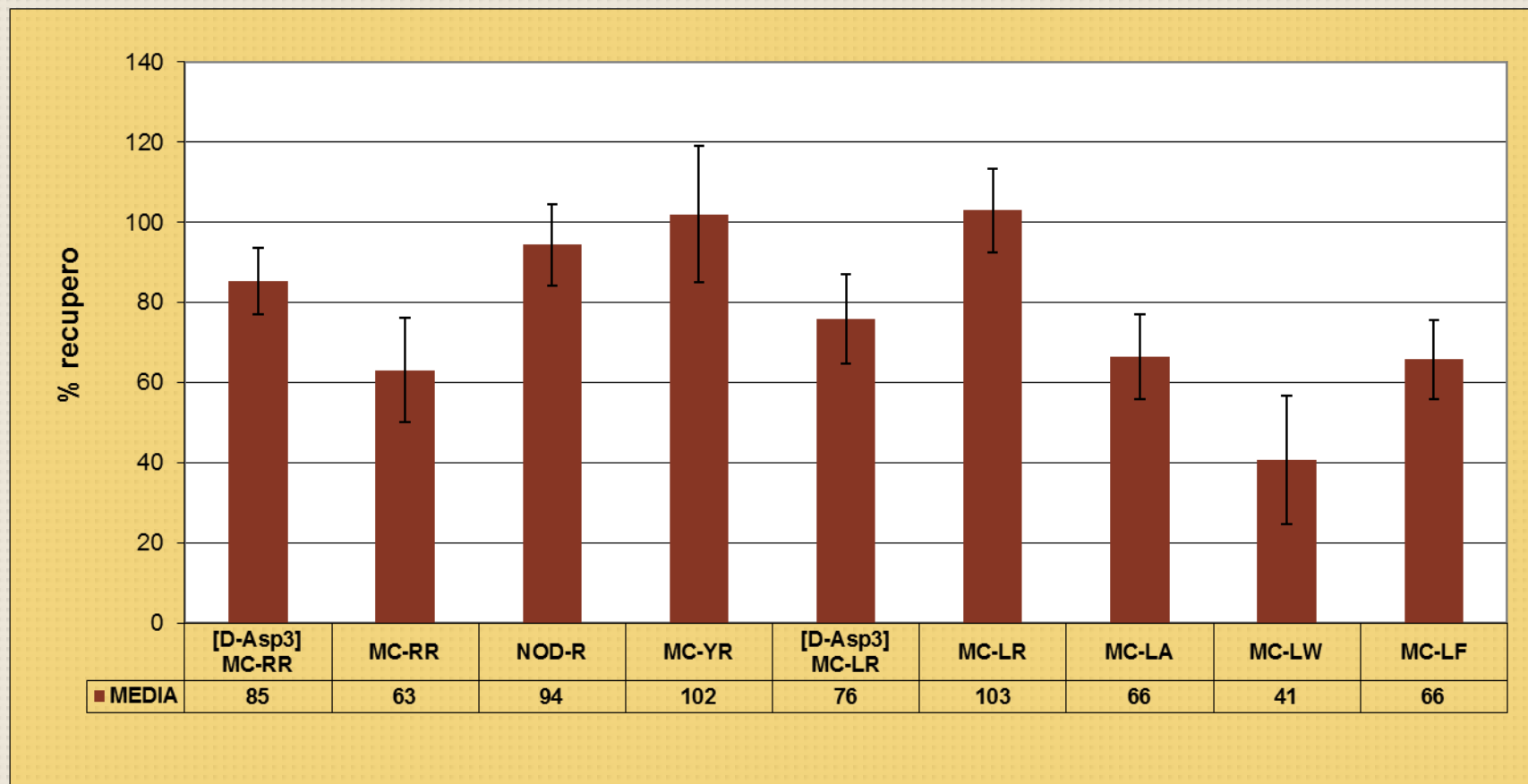
Il filtro è estratto con:

- *metanolo:MilliQ (9:1 v/v)* in bagno ad ultrasuoni (50-60 Hz) per 15 minuti alla temperatura di 20°C;
- *acqua MilliQ* nelle stesse condizioni precedenti. I due estratti sono riuniti e miscelati in bagno ad ultrasuoni (50-60 Hz) per 5 minuti.

Analisi della [D-Asp³]-MC-RR endocellulare dopo estrazione di 4 filtri, ottenuti da un campione di acqua del Lago di Pusiano

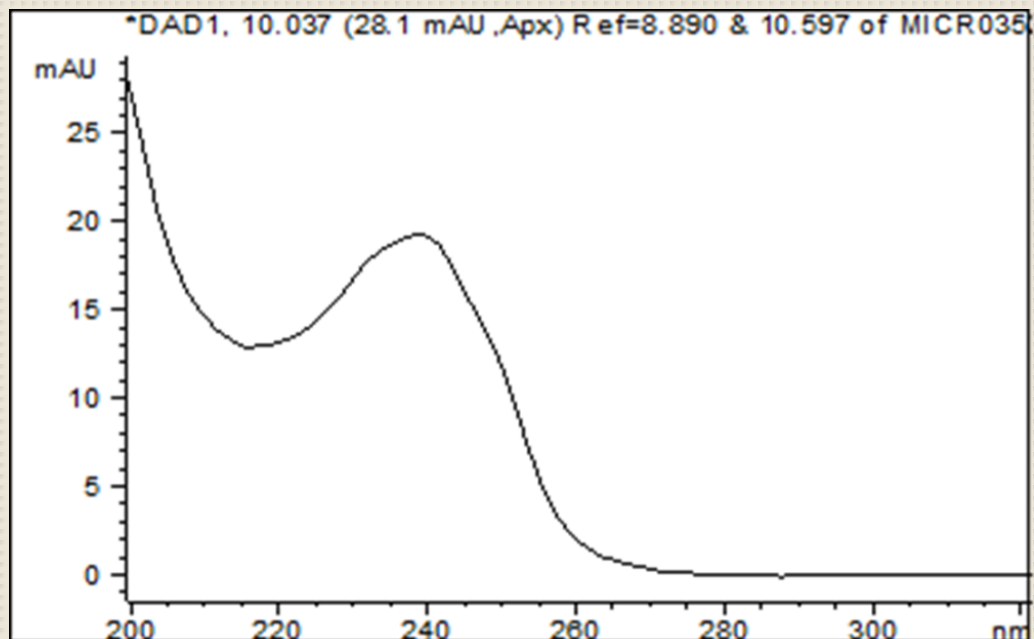


Analisi della fase disciolta:
concentrazione su *C18-SPE* e analisi in HPLC-DAD,
eluizione C18 con metanolo acidificato e MeOH:H₂O
75:25 v/v

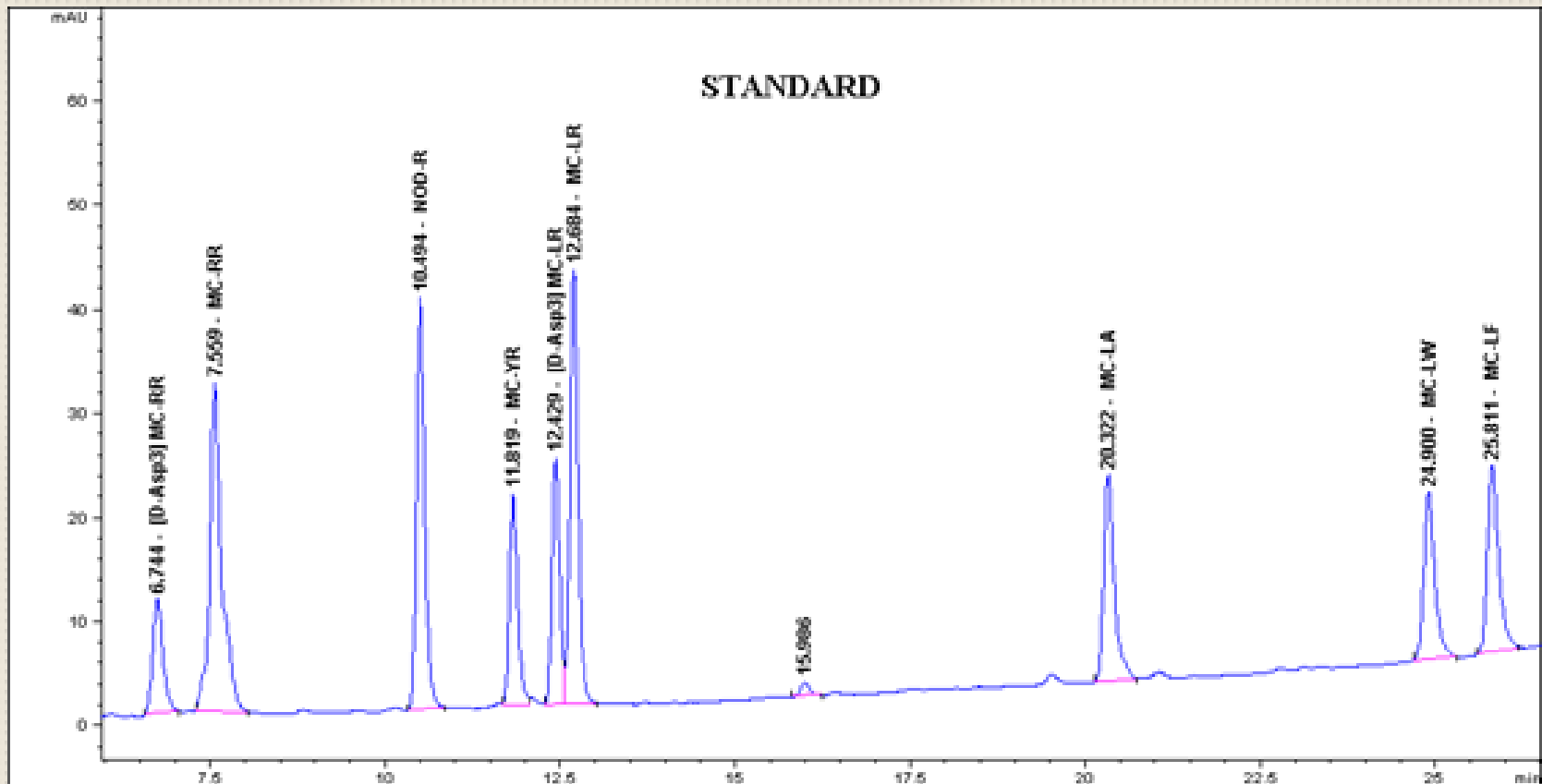


Quantificazione in HPLC-UV or DAD

Il cromatografo utilizzato è un HPLC-DAD o UV. Per la fase mobile sono utilizzati (A) acqua ultrapura (Milli-Q) e (B) acetonitrile, acidificati (0,05% v / v) con acido trifluoroacetico (TFA). La separazione degli analiti viene effettuata su colonna C18 (250 mm x 3,00 mm id). La quantificazione è effettuata per il segnale acquisito a 238 nm.



Esempio di analisi di una soluzione standard di microcistine e nodularina a 0,5 mg/L IN HPLC-DAD



Notiziario IRSA del Dicembre 2010

DETERMINAZIONE DI TOSSINE ALGALI (MICROCISTINE E NODULARINA) NELLE ACQUE SUPERFICIALI

a cura di Guzzella L.*, Ghislanzoni L.*, Pozzoni F.*, Cerasino L.** e Salmaso N.**

**CNR-IRSA, Brugherio (MB)*

***Fondazione Edmund Mach - Istituto Agrario di San Michele all'Adige, S. Michele all'Adige (TN)*

L'emergenza del lago Occhito in Puglia

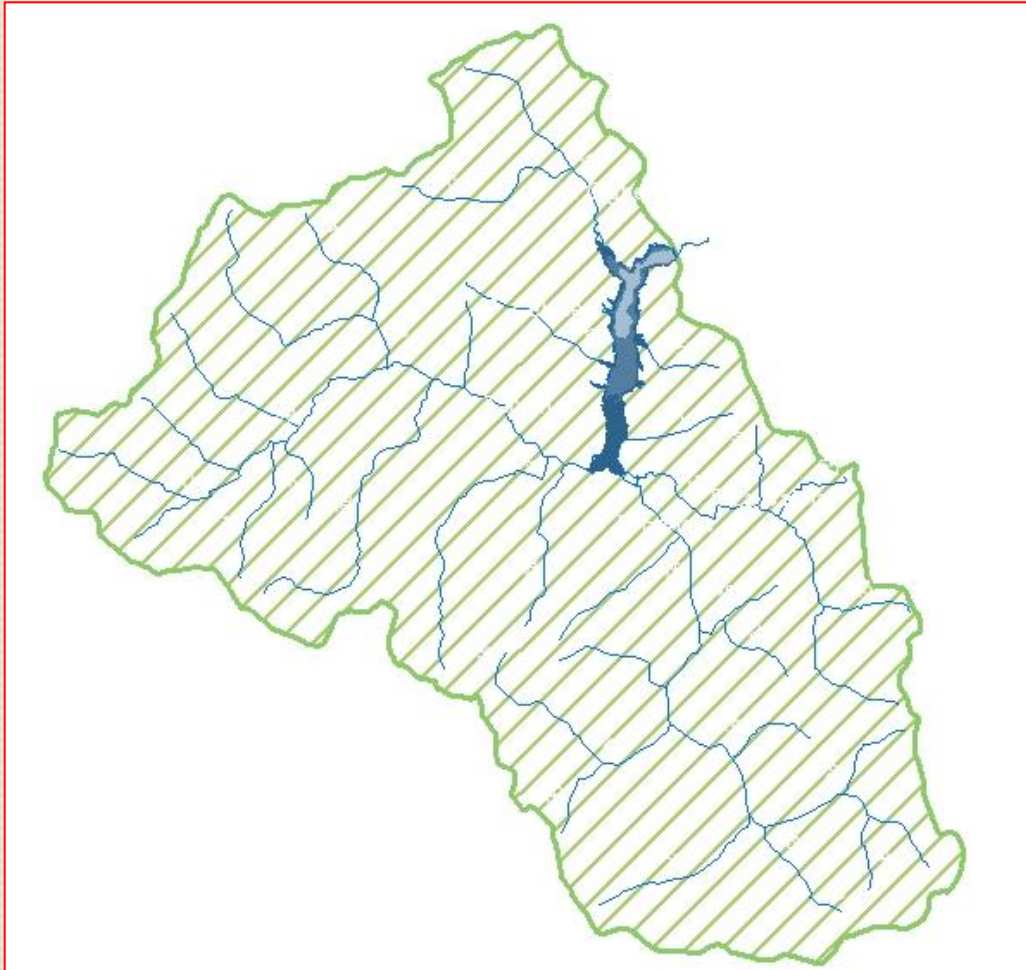
Nell'inverno 2008-2009 il Lago Occhito si è arrossato vistosamente a causa di una intensa attribuita alla cianoficea potenzialmente tossica *Planktothrix rubescens*



OBIETTIVO: studiare la fioritura di *P. rubescens*
e valutare l'impatto sull'ecosistema lacustre e sulla rete irrigua



Il Lago Occhito



Bacino destinato a uso multiplo:

Irriguo (60 %)

Potabile (20 %)

Industriale (20%)

La risorsa irrigua alimenta il
compensorio del Fortore
(143 000 ha)

Area lago max invaso $\sim 10 \text{ km}^2$

Profondità max invaso $\sim 40 \text{ m}$

Volume ~ 333 milioni di m^3
dei quali ~ 248 milioni di m^3 utili

L'acqua proveniente dal lago viene
trasportata tramite una galleria al
Ripartitore di Finocchito da dove
l'acqua viene distribuita alla rete
irrigua e all'Acquedotto di Foggia
(AQP)

Sperimentazione condotta



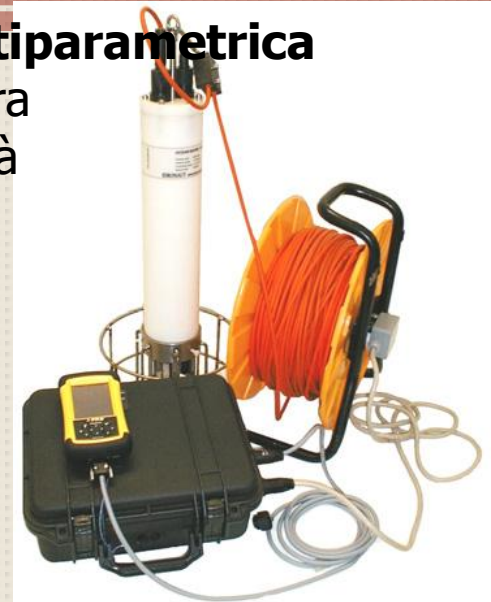
Fluoro Probe

- Chl a
- 4 gruppi algali



Sonda multiparametrica

- Temperatura
- Conduttività
- pH
- Ossigeno
- RedOx
- PAR
- Torbidità

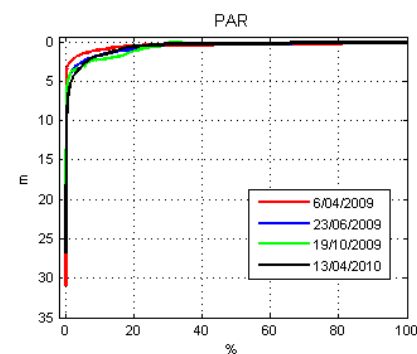
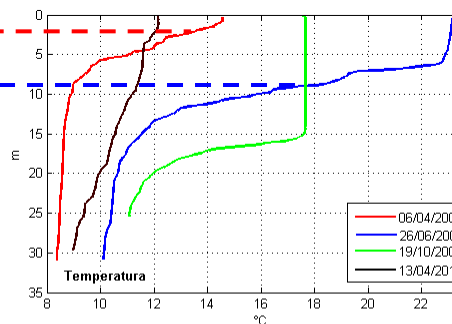
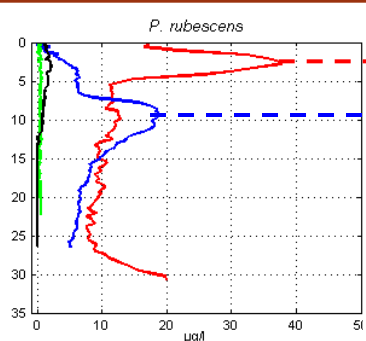
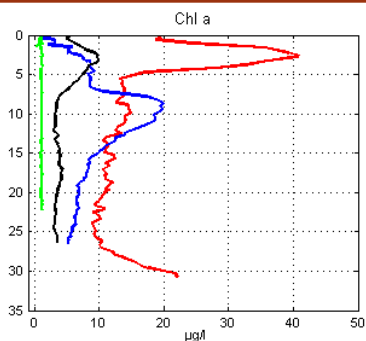
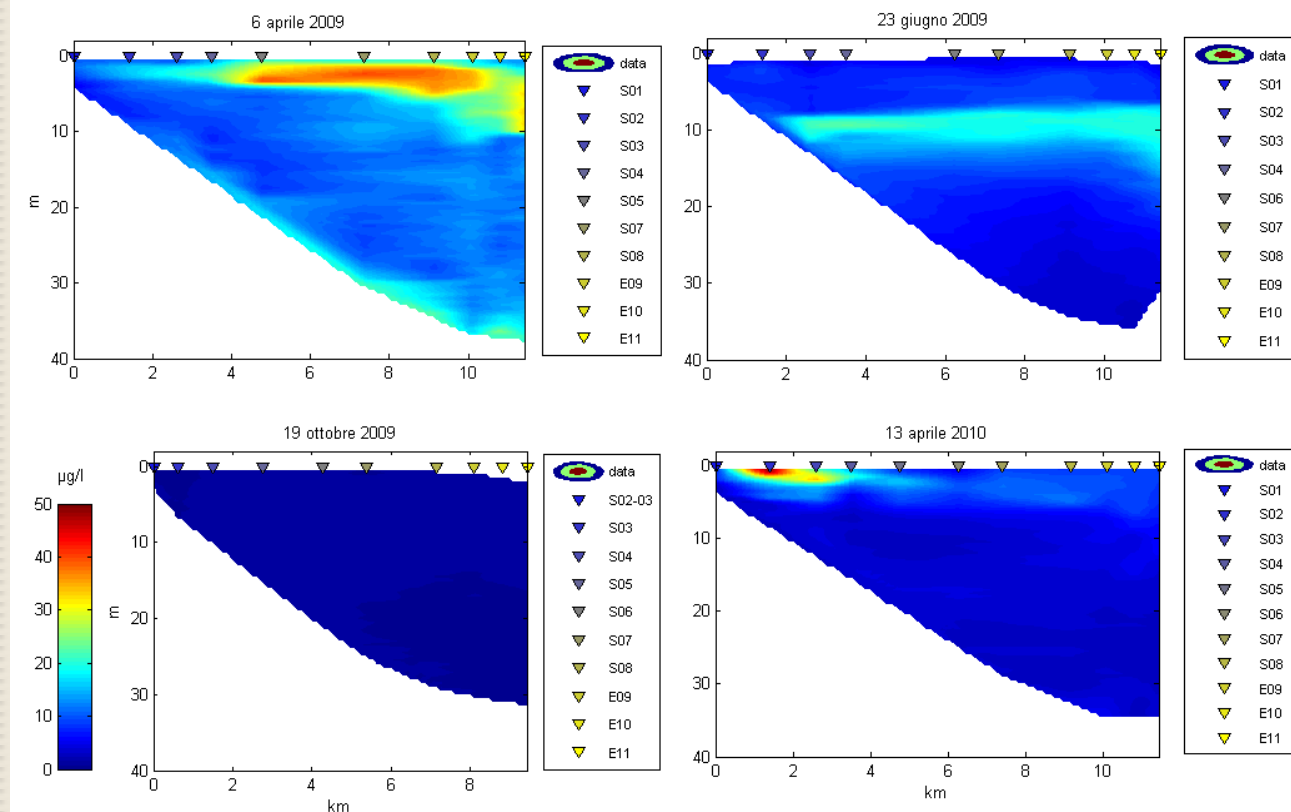
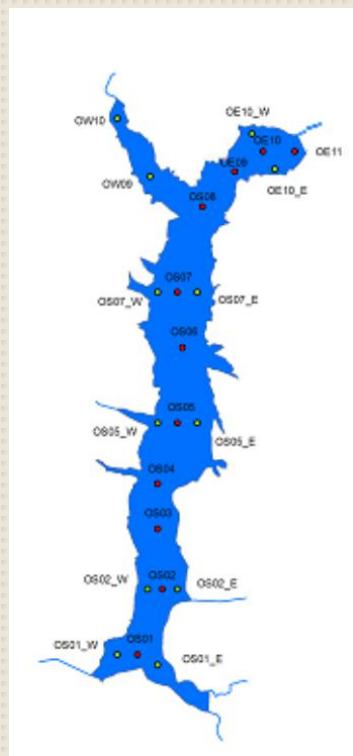


Misure in laboratorio

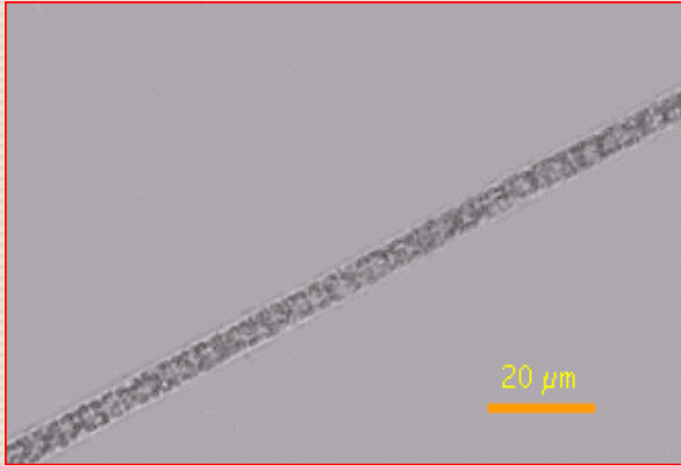
- Nutrienti
- Fitoplancton
- Potenziale di crescita algale
- Tossine
- Test tossicità



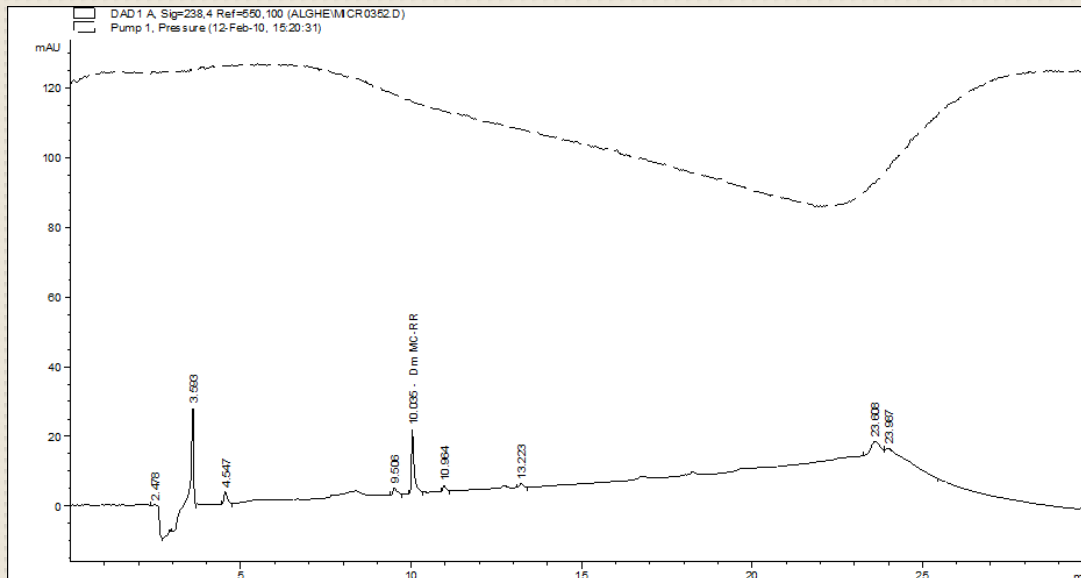
Evoluzione del bloom di *P. rubescens* nel 2009-2010



LA CIANOFICEA : *Planktothrix rubescens*

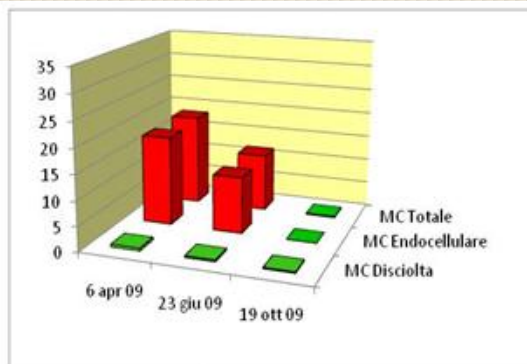
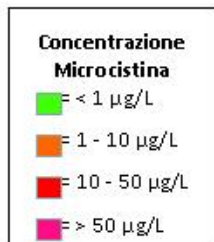


- Specie coloniale filamentosa con filamenti lunghi fino a 2 mm
- Stenoterma di acque fredde
- Elevata capacità di assimilazione del fosforo

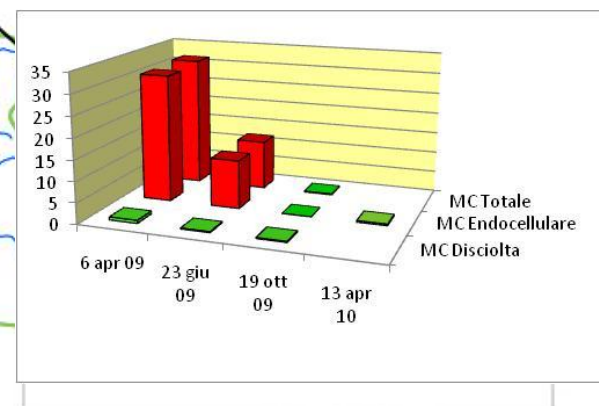
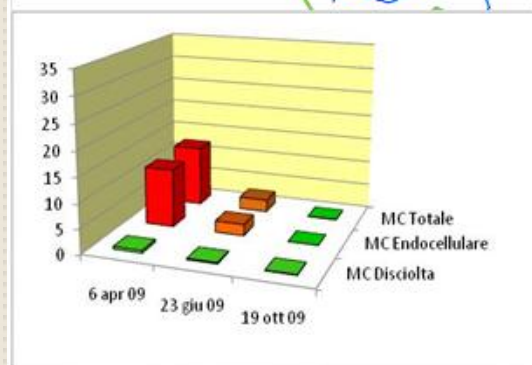
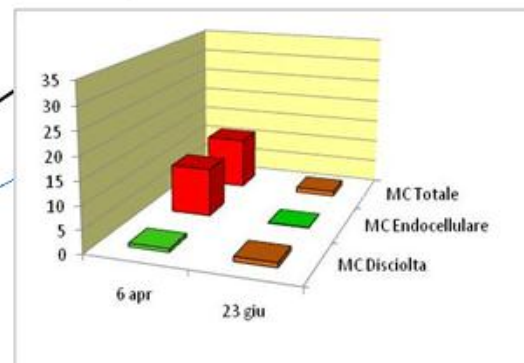
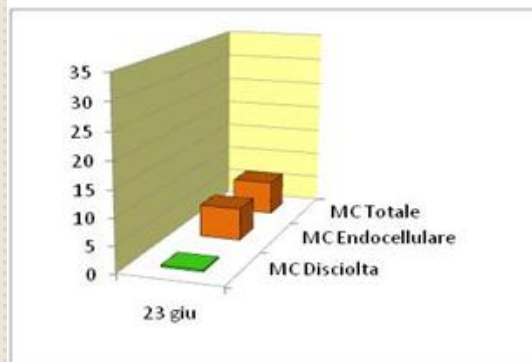


L'analisi in HPLC-DAD del contenuto endocellulare dell'alga e il confronto dello spettro di assorbimento con uno standard certificato ha evidenziato la presenza della [D-Asp³]-microcistina-RR

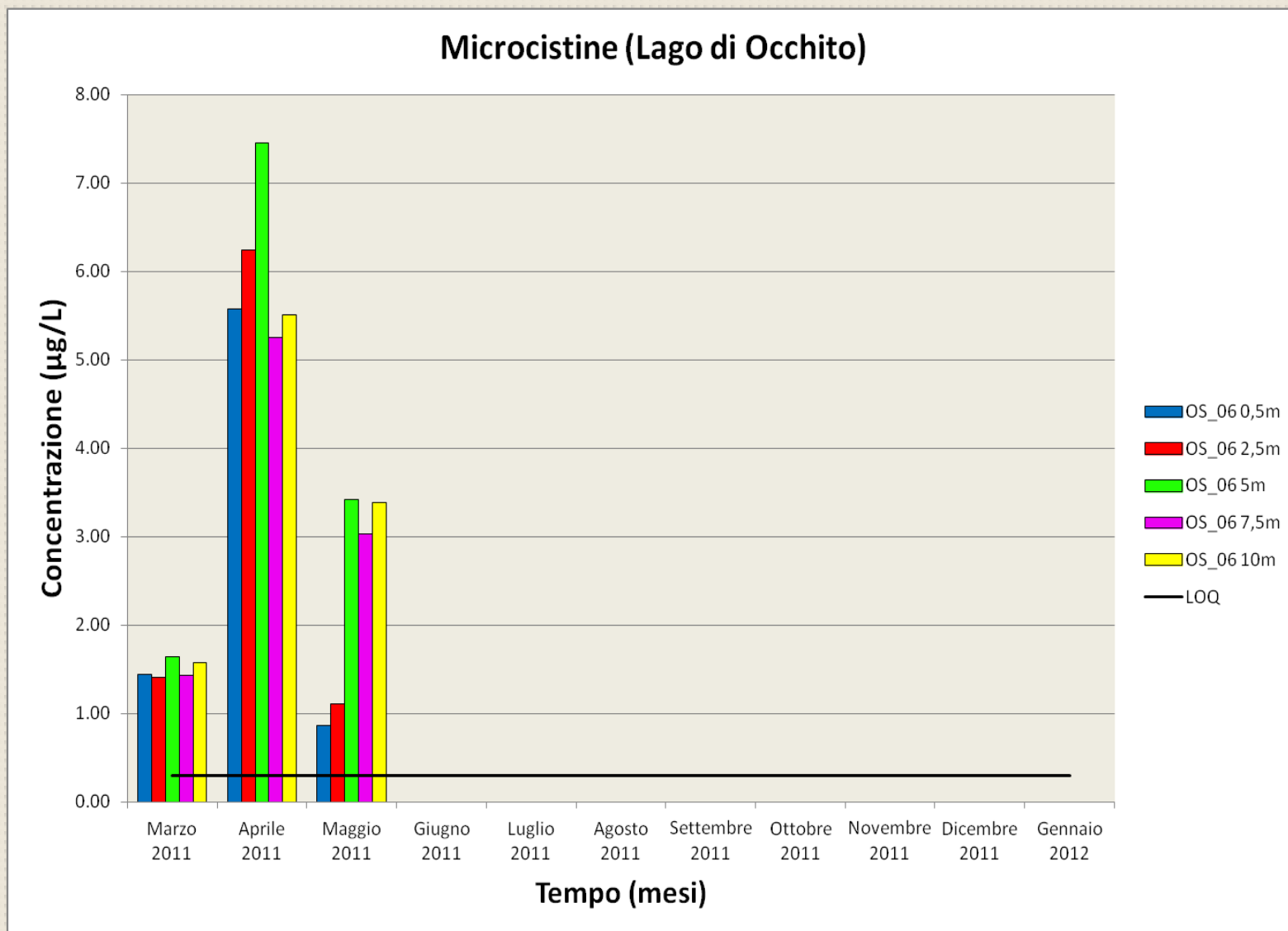
Valori di [D-Asp³]-MC-RR (µg/L) nei campioni del lago nel 2009



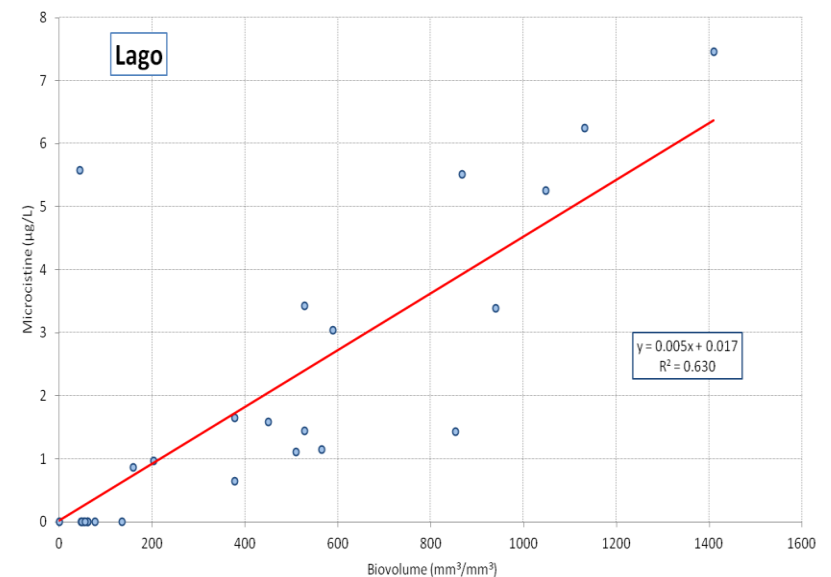
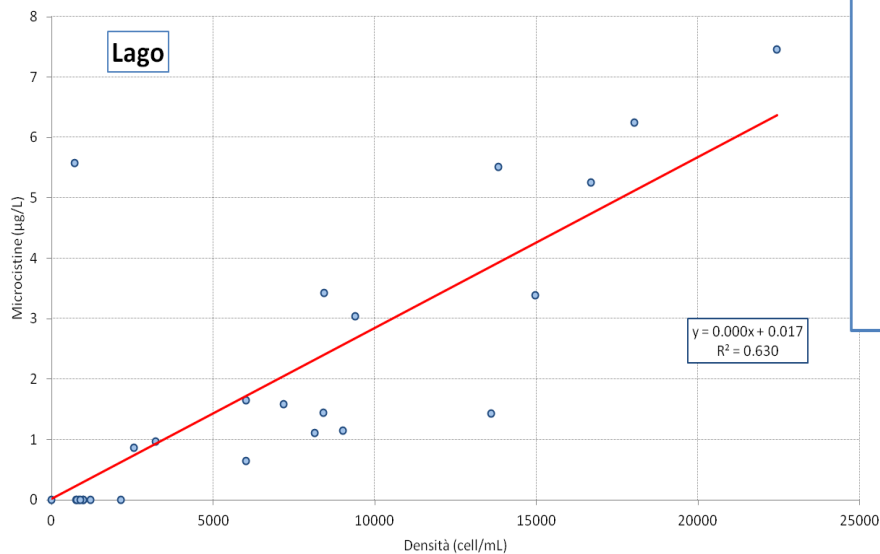
16 km



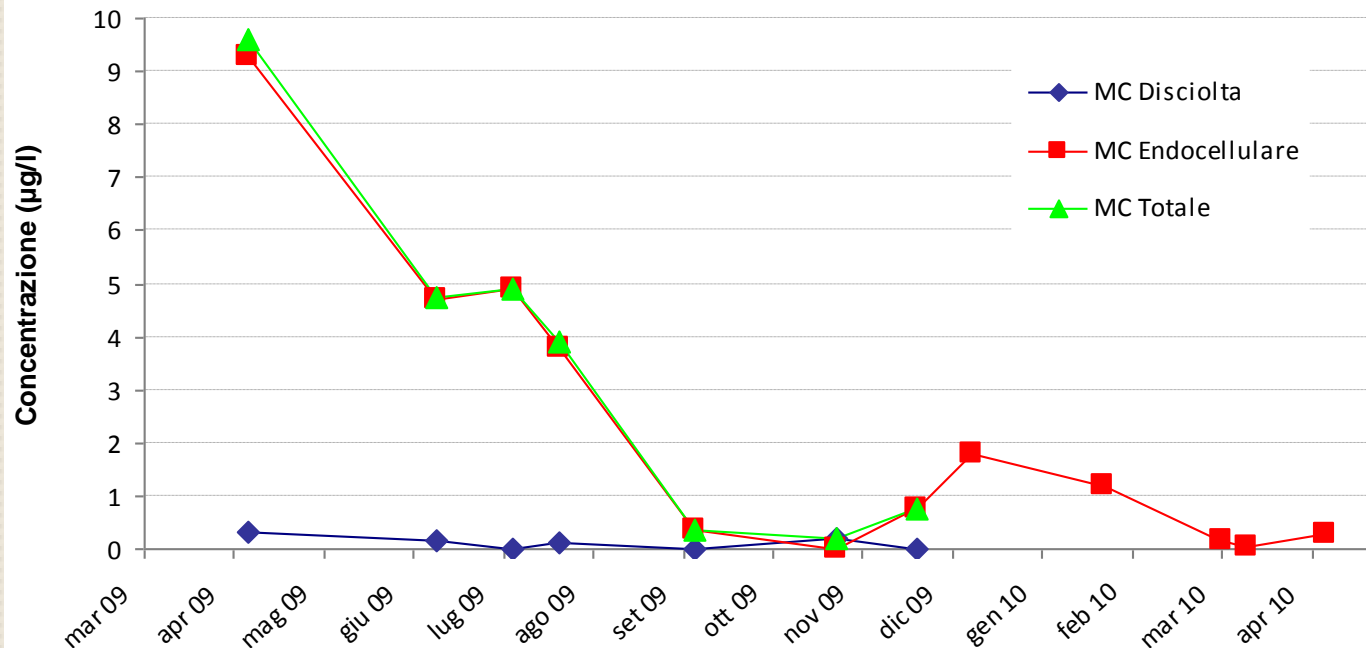
Valori di [D-Asp3]-MC-RR ($\mu\text{g/L}$) nei campioni del lago del 2011



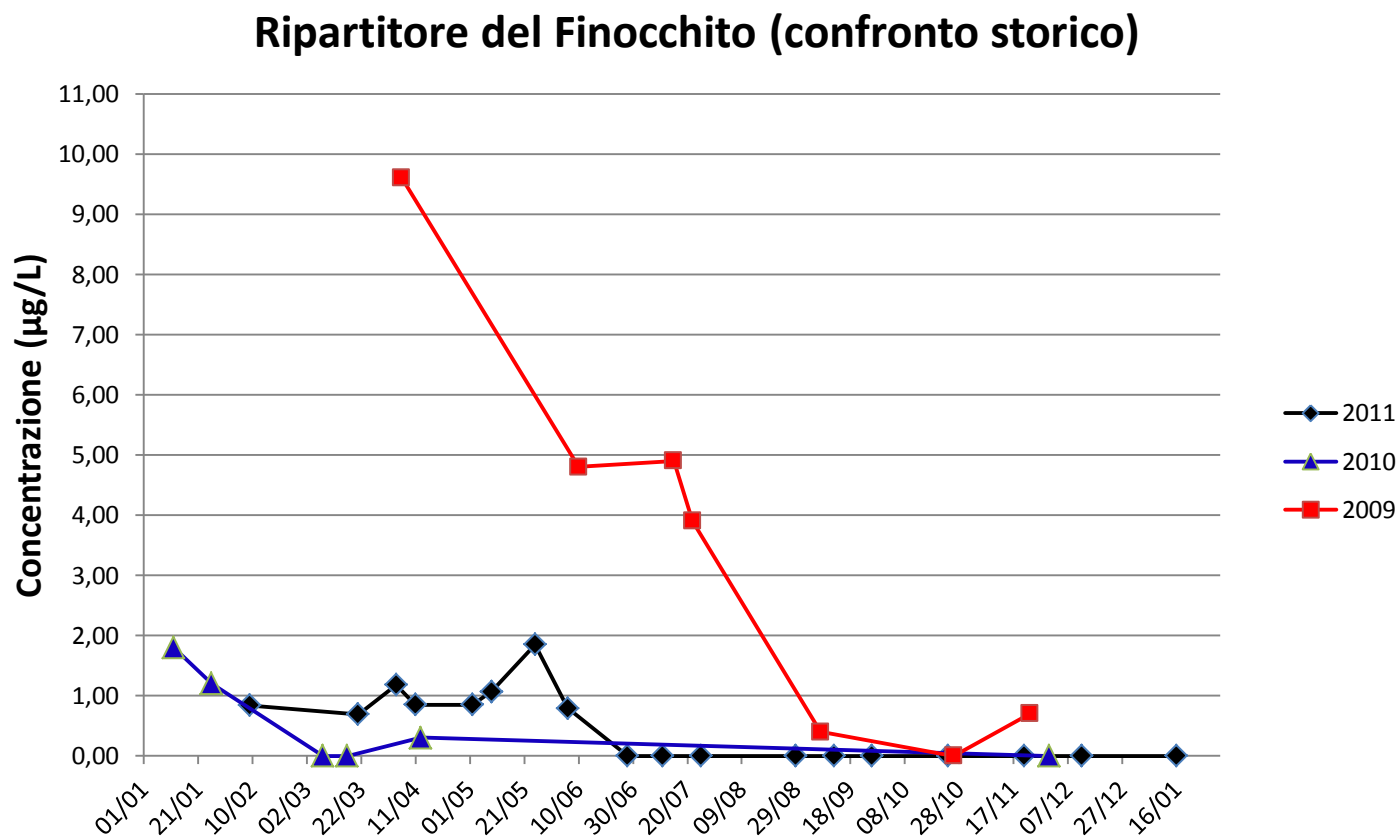
Correlazioni tra clorofilla o densità cellulare e concentrazioni di [D-Asp³]-MC-RR nel 2011



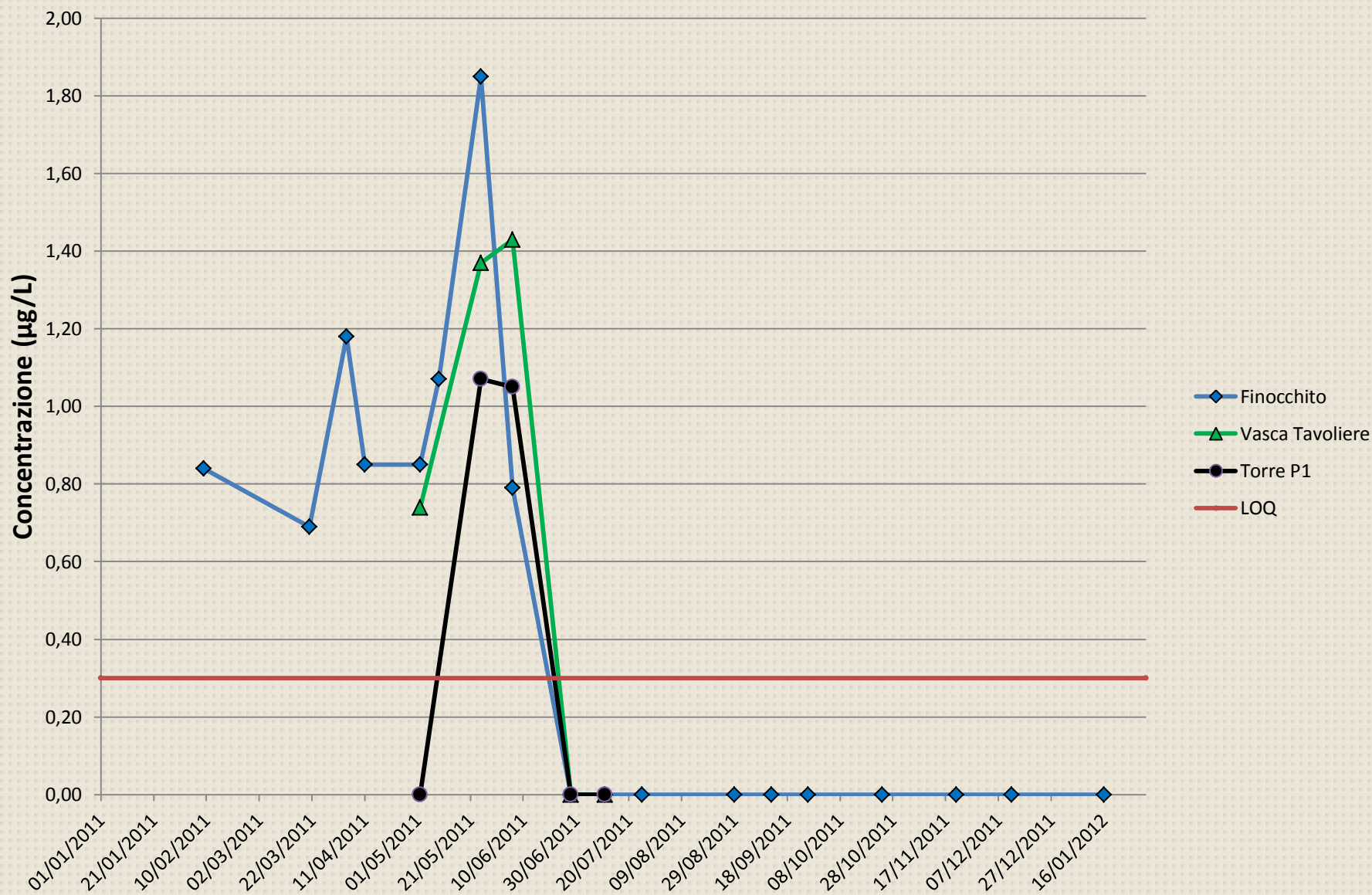
Andamento temporale delle concentrazioni della [D-Asp³]-MC-RR (µg/L) nel Ripartitore di Finocchito nel 2009



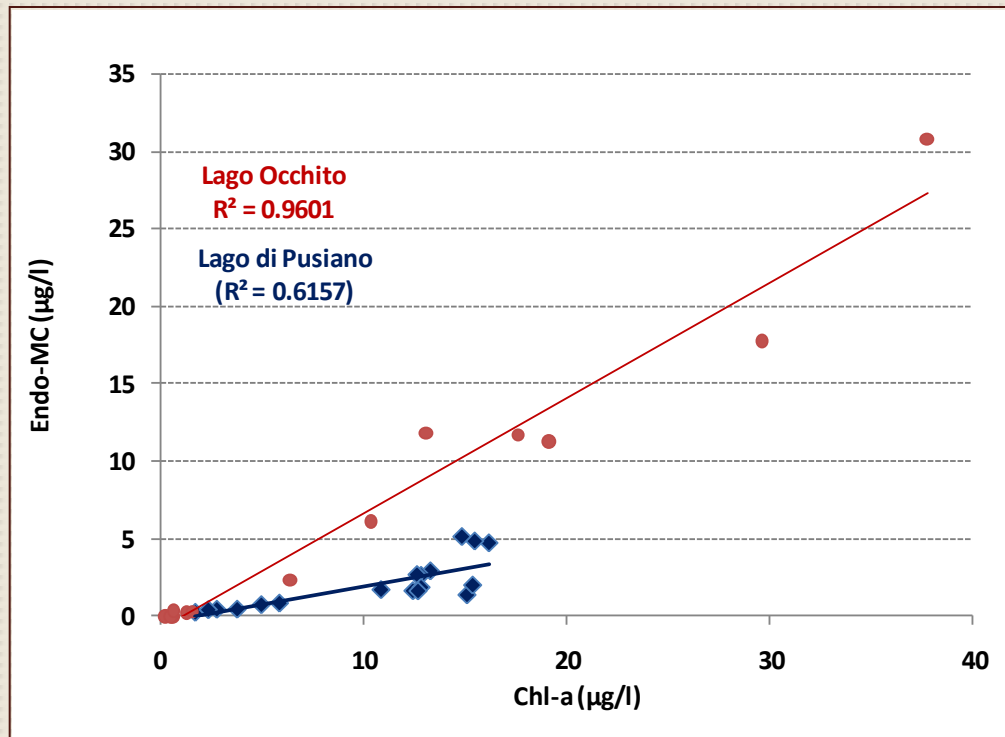
Valori di [D-Asp³]-MC-RR (µg/L) nel Ripartitore di Finocchito



Valori di [D-Asp³]-MC-RR (µg/L) nella rete irrigua nel 2011



Relazione tra clorofilla, come stima di biomassa, e produzione di microcistine nell'Occhito e Pusiano

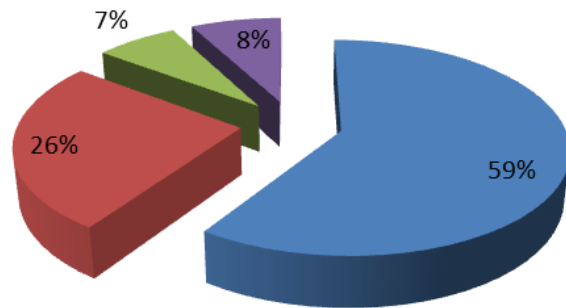


Sebbene molti studi evidenziano la mancanza di relazione tra biomassa algale e produzione di microcistine, i dati raccolti nei laghi Occhito e Pusiano suggeriscono che sia presente una relazione tra le due variabili. Tali relazioni evidenziano una differente produzione di microcistine: **nell'Occhito ogni cellula produce 0,25 pg di microcistine, nel Pusiano 0,06 pg per cellula.**

Fingerprint delle microcistine

Microcistine nel lago di Pusiano

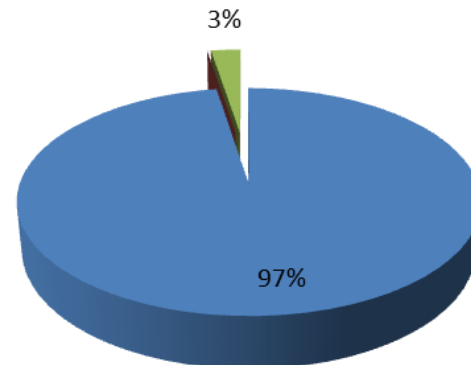
■ [D-Asp3] MC-RR ■ Dm-MC-RR(?) ■ [D-Asp3] MC-LR ■ MC-YR



Fioriture differenti di *P. rubescens* determinano un differente produzione di microcistine

Microcistine nel Lago di Occhito

■ [D-Asp3] MC-RR ■ Dm-MC-RR(?) ■ [D-Asp3] MC-LR ■ MC-YR



Schema decisionale per il monitoraggio del lago:

Livello di allerta 1:

Livello di attenzione

Fioritura cianoficee
>2000 cell/mL

> 10 µg/L MC totale

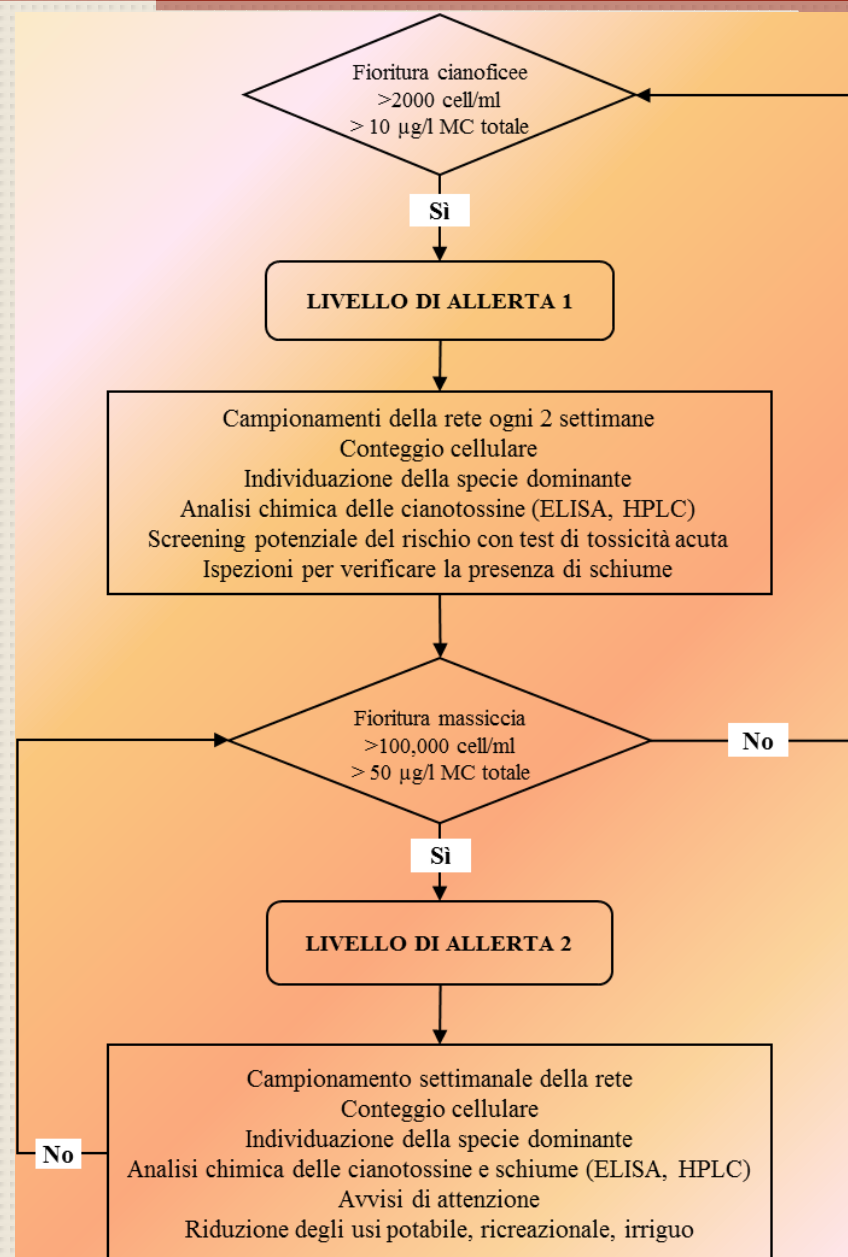
Livello di allerta 2:

Livello di intervento

Fioritura massiccia

>100,000 cell/mL

> 25 µg/L MC totale



Valutazione del rischio sanitario per le cianotossine

Per un approccio più realistico del rischio tossicologico per l'uomo, è stato proposto un *metodo per la stima della tossicità*, applicando dei un fattori di tossicità equivalente (TEF) (Wolf & Frank, 2002) sulla *base dei dati tossicologici disponibili* per le principali tossine per i mammiferi, come viene fatto per PCB diossina-simili e diossine.

Il valore di riferimento ($TEF = 1$) viene assegnato al composto più tossico (nel caso delle microcistine alla microcistina-LR).

Un $TEF \leq 1$ viene assegnato a quei composti che sono meno tossici della microcistina-LR, il valore viene calcolato in funzione del rapporto tra la loro tossicità e quella del composto di riferimento, espressa come LD50. La tossicità del campione, caratterizzata da tossine diverse, è calcolato come segue:

$$\text{Tossicità equivalente (TE)} = \sum TEF_i * [I]$$

Tossine	Concentrazioni (µg/L)	TEF	Fattori di tossicità equivalenti
MC-LR	30	1.0	30
MC-RR	100	0.1	10
MC-YR	15	1.0	15
NOD	20	1.0	20
Total	165		75

Valutazione del rischio ecologico per le cianotossine

Lo stesso metodo può essere applicato per il *rischio ecologico*, partendo dai valori di EC₅₀ dell'organismo acquatico più sensibile, in questo caso del *Thamnocephalus platyurus*. Il rischio ecologico del campione sarà calcolato come segue:
Tossicità equivalente (TE) = $\sum \text{TEF}_i * [I]$

Tossine	Concentrazioni (µg/L)	TEF	Fattori di tossicità equivalenti
MC-LR	30	1,0	30
MC-RR	100	0,05	5
MC-YR	15	0,04	0,6
[D-Asp ³]-MC-RR	10	0,36	0,4
Total	155		36

Ringraziamenti

La presentazione è stata predisposta con il
contributo di

Diego Copetti, Luca Ghislanzoni, Fiorenzo
Pozzoni, Lucia Valsecchi
del CNR-IRSA, Brugherio (MB)
che si ringraziano !

La ricerca è stata in parte supportata dal
Consorzio per la Bonifica della Capitanata di
Foggia