UNIVERSITA' POLITECNICA DELLE MARCHE



DIPARTIMENTO DI SCIENZE DELLA VITA E DELL'AMBIENTE

Corso di Laurea Magistrale in Biologia Marina

EFFETTO DELLA SALINITA' SULLA CRESCITA, COMPOSIZIONE CELLULARE E PRODUZIONE DI TOSSINE (MICROCISTINE) DEL CIANOBATTERIO PLANKOTOTHRIX RUBESCENS.

EFFECT OF SALINITY ON GROWTH, CELLULAR COMPOSITION AND MICROCYSTIN PRODUCTION BY THE CYANOBACTERIUM PLANKOTOTHRIX RUBESCENS.

Tesi di Laurea Magistrale di: Alessio Corradetti Relatore Prof. Stefano Accoroni

Correlatori: Prof.ssa Alessandra Norici

Prof.ssa Maria Cecilia Totti

Sessione Invernale Anno Accademico 2020-2021

Indice

1	Introduzione	1
	1.1 Harmful Algal Blooms	1
	1.2 Cianobatteri	9
	1.3 Tossine dei cianobatteri	18
	1.4 Le specie di cianobatteri tossici e la loro distribuzione	32
	1.5 Le tossine dei cianobatteri in mare	40
	1.6 Scopo della tesi	42
2	Materiali e metodi	44
	2.1 Analisi densità ottica e cellulare	47
	2.2 Analisi dei pigmenti	49
	2.3 Analisi FTIR	52

	ii		IND	(CE
	2.4	Analisi delle tossine		56
	2.5	Analisi statistiche		57
3	Ris	ultati		58
	3.1	Andamento temporale delle abbondanze di <i>Planktothrix rubescens</i>		58
	3.2	Analisi delle tossine		62
	3.3	Analisi dei pigmenti		64
	3.4	Analisi FTIR		67
4	Dis	cussione		71

Bibliografia

79

Capitolo 1

Introduzione

1.1 Harmful Algal Blooms

Le fioriture (bloom) algali sono fenomeni naturali dovuti alla crescita esponenziale di microalghe appartenenti al fitoplancton e al microfitobenthos che in particolari condizioni possono raggiungere la concentrazione di milioni di cellule per litro. Con il termine *Harmful Algal Blooms* (HABs) o "fioriture algali dannose" si indicano quei fenomeni di proliferazione intensa di particolari specie di alghe che sono in grado di determinare un danno sull'ambiente o sulle attività e/o salute dell'uomo.

Gli effetti delle fioriture algali sono spesso positivi per l'ambiente, in quanto le alghe sono produttori primari e questi fenomeni contribuiscono fortemente nell'aumentare la produzione primaria dell'ecosistema i.e. le diatomee sono responsabili di circa il 20-25% della produzione primaria globale (in un anno generano carbonio organico tanto quanto $\mathbf{2}$

le foreste pluviali messe assieme)(Nelson et al., 1995)[]. Gli organismi marini, inoltre, sincronizzano i loro ritmi riproduttivi in base ai periodi in cui si verificano i bloom algali stagionali. Per esempio, in Jansen (2006), è stato osservato che il copepode artico *Calanus glacialis* sincronizza la schiusa delle uova con il picco fitoplanctonico primaverile (aprile-maggio) in modo da sostenere il nauplio nei primi stadi dello sviluppo, mentre le fasi di nutrizione mediata dalle riserve nutritive presenti nell'uovo cadono nei periodi che intercorrono tra un bloom e l'altro. Inoltre, le alghe sono particolarmente importanti in quanto giocano un ruolo fondamentale nei cicli biogeochimici di azoto, fosforo, ossigeno, carbonio e zolfo (Graham, 2000)[2].

Le fioriture algali possono invece avere effetti nocivi quando causano colorazioni anomale o schiume di vario tipo, producono danni meccanici alle branchie dei pesci, causano morie di fauna e flora bentonica in seguito a fenomeni di anossia o ombreggiamento rispettivamente, o quando le specie interessate producono tossine. Le fioriture algali sono talvolta associate a colorazione anomala (rossa, rosa, verde o bruna) in funzione della natura dei pigmenti fotosintetici delle alghe protagoniste della fioritura. Tali fenomeni possono avere effetti deleteri sul turismo.

In altri casi le fioriture algali possono essere associate a presenza di schiume e muco di colore marrone in superficie o in sospensione, come ad esempio bloom di *Phaeocystis spp.* nel Mare del Nord, dove si assiste alla formazione di uno spesso strato di schiuma di colore bianco sulla superficie dell'acqua. Diversi generi di cianobatteri (e.g. *Microcystis spp.*) presentano all'interno del citoplasma delle vescicole gassose che ne aumentano le capacità di galleggiamento. Questi organismi formano schiume sulle superficie e in questo modo occupano i primi centimetri della colonna d'acqua, precludendo gli altri organismi fotosintetici dal captare la luce incidente (Meriluoto, 2017) 3.

Alcune fioriture causano sofferenza in organismi animali sia sessili che mobili, morie di fauna acquatica e bentonica per effetto dell'anossia dei fondali. Questo accade verso la fine del bloom, quando le cellule muoiono e si depositano sul fondale: qui, intensi processi di decomposizione batterica sequestrano ossigeno disciolto in colonna d'acqua e producono ingenti quantità di acido solfidrico (H_2S) , con conseguente soffocamento degli organismi marini sessili o che vivono nei pressi del fondale. Ad esempio, comunità marine che ricevono apporti fluviali dall'ambiente terrestre quali *run-off* agricoli o sistemi di scarico fognario, sono interessate dalla formazione di estesi tappeti di *Cladophora*. Durante la decomposizione di questi organismi, si può avere anossia del fondale e moria di invertebrati bentonici (anche di interesse commerciale) (Graham, 2008) [2]. In altri casi si hanno danni alle praterie di angiosperme marine per effetto dell'ombreggiatura dovuta alle elevate concentrazioni cellulari in colonna d'acqua.

Infine, ci sono le fioriture prodotte da microalghe in grado di generare tossine che causano danni all'uomo e/o agli organismi marini.

Spesso ci si riferisce a questo tipo di eventi con il termine "Red Tides" (maree rosse, Anderson et al, 2002)[4]. Ciononostante questo termine è improprio per vari motivi: (i) non sempre le fioriture causano water discoloration (R.C. Guy, 2014)[5], (ii) la colorazione dell'acqua può essere diversa dal rosso (verde, marrone, bianco, etc.) e (iii) alcuni tipi di tossicità possono essere causati anche da basse concentrazioni cellulari i.e. <1000 cell./L.

All'interno delle oltre 4000 specie di microalghe planctoniche descritte (Zingone et al,

2000) [6], la lista delle specie potenzialmente coinvolte nelle HABs comprendono 80 specie tossiche e 200 specie nocive. Negli ultimi anni però, il numero di specie riconosciute potenzialmente tossiche è stata ampiamente allargato. Questo fatto non sorprende, tenendo in considerazione che migliaia di specie algali sono ancora sprovviste di descrizione (Andersen, 1992) [7].

Le specie algali tossiche appartengono a diverse classi: Dinophyceae, Primnesiophyceae, Bacillariophyceae, Dyctiochophyceae e Raphidophyceae (http://www.marinespecies.org/hab/). Per quanto riguarda i cianobatteri, di specie tossiche o nocive se ne conoscono almeno 46 (Sivonen K, Jones J., 1999) 8.

Esistono diversi tipi di sindromi, alcune di loro potenzialmente mortali, associate alle diverse tossine algali assunte tramite alimenti contaminati: PSP (Paralytic Shellfish Poisoning), ASP (Amnesic Shellfish Poisoning), DSP (Diarrethic Shellfish Poisoning), CFP (Ciguatera Shellfish Poisoning), NSP (Neurotoxic Shellfish Poisoning) e CTP (Cyanobacterial Toxin Poisoning).

Le tossine possono essere veicolate attraverso l'ambiente marino, fino all'uomo, tramite diversi meccanismi: il trasferimento lungo la rete trofica, attraverso l'aerosol marino contaminato da questi composti e tramite contatto diretto.

Le tossine trasferite lungo la rete trofica marina (Anderson, 2009) [9] possono causare danni o dare fenomeni di mortalità a diversi animali marini nel momento in cui questi ultimi ingeriscono zooplancton o pesci contaminati (Geraci et al., 1989) [10].

L'uomo entra in contatto con queste tossine grazie a vettori (come i molluschi) che accumulano queste sostanze nocive nel tratto gastrointestinale o in altri tessuti durante l'allevamento in stabilimenti di acquacoltura o nei banchi naturali. Al contrario, i crostacei non accumulano grandi concentrazioni di tossine nei loro tessuti (Sandra E. Shumway, 1990)[1]. In alcuni casi le tossine possono essere veicolate dall'areosol marino. Un esempio sono i bloom tossici della dinoflagellata *Karenia brevis*, che produce la **brevetossina**, una neurotossina che, se inalata tramite areosol, può dare irritazione alle vie respiratorie fino a gravi sintomi neurologici. Oppure le fioriture massive di *Ostreopsis ovata* in Mediterraneo provocano sintomi quali irritazioni cutanee o lieve sintomatologia a carico delle vie respiratoie ai fruitori di spiagge a ridosso di zone fortemente interessate dalla fioritura (Medina-Pèrez et al, 2021)[12].

Infine le tossine possono causare irritazione alla pelle o congiuntiviti tramite contatto diretto durante la balneazione come nel caso delle fioriture di O. cf. ovata (Accoroni & Totti, 2016) 13. Negli ultimi tempi viene talvolta osservato un aumento della frequenza degli Harmful Algal Blooms, che potrebbe essere dovuto sia a un perfezionamento delle tecnologie, delle conoscenze e del sempre maggior numero dei monitoraggi effettuati (Zingone et al., 2021; Hallegraeff et al., 2021) 14 15, ma anche ai cambiamenti climatici in atto in questi ultimi anni. Secondo il report 2019 dell'IPCC, l'interazione tra aumento di temperature e carico organico sta contribuendo sostanzialmente all'incremento dei bloom tossici, contribuendo al fenomeno sempre più preponderante dell'eutrofizzazione e alla conseguente espansione delle zone ipossiche (Pörtner, H.-O., 2019) 16.

Un altro fenomeno responsabile dell'incremento di *HABs* è l'eutrofizzazione, definito da Nixon et al (1995) [17] come il processo di arricchimento di materia organica in un ecosistema, che si verifica generalmente a seguito di input eccessivi di nutrienti. Come già accennato prima, anche i cambiamenti climatici globali sono attori principali del crescente fenomeno di bloom tossici. Questo si rispecchia su un aumento della stratificazione delle acque, conseguenza dell'aumento delle temperature superficiali oceaniche (Guancheng, 2020) 18.

Le temperature influenzano la motilità (Kamykowski, 1987)[19], la germinazione delle cisti (Brosnahan, 2020)[20] ma anche il tasso fotosintetico viene alterato profondamente (J.A. Raven e P.G. Falkowski, 2007)[21].

L'intensificazione del picnoclino data dalla stratificazione delle acque, porta alla formazione di un sottile strato dove si concentra il 50-70% della biomassa totale nella colonna d'acqua, modificando processi biologici quale crescita, riproduzione, grazing e produzione di tossine (Wells et al, 2015)[22]. Inoltre, il riscaldamento delle acque e loro successiva stratificazione, ha fatto nascere l'ipotesi di un'espansione in atto di queste alghe anche verso i poli, modificando profondamente la loro biogeografia (Gobler, 2020)[23]. In letteratura sono presenti diversi casi studio riguardo questo argomento che rafforzano quest'ipotesi (Gobler 2017, Griffith 2019)[24][25].

È stato osservato come in corrispondenza del fenomeno climatico "*El-Niño*", vi sia aumento nella frequenza dei bloom tossici (Van Dolah, 2000) [26]. Infatti questo evento porta a un aumento anomalo della temperatura superficiale dell'oceano, con aumentata stratificazione delle acque e il riduzione del fenomeno di *upwelling* lungo le coste del Cile (Rasmusson EM, 1983) [27]. Questo porta a delle conseguenze nella comunità fitoplanctonica, tenendo conto che temperatura, irradianza e disponibilità di nutrienti sono fattori determinanti per la loro ecologia, anche lo sviluppo di *HABs* è fortemente influenzato da questi fattori (J.L. Maclean, 1989) [28].

Il problema delle HABs sta anche portando allo sviluppo di diversi sistemi per poter

abbattere il contenuto di tossine o migliorarne il monitoraggio. Per esempio, l'ozono viene utilizzato per l'inattivazione di tossine microalgali essendo un agente fortemente ossidante. Sfruttando la fotolisi UV in presenza di biossido di titanio (TiO_2) , si è in grado di inattivare le molecole di microcistine nel loro analogo ossidato non tossico (Hengfeng Miao and Wenyi Tao, 2009)[29]. Altri metodi sfruttano per esempio il potere adsorbente dell'argilla, che dispersa sulla superficie dell'acqua rimuove le cellule algali dalla colonna d'acqua legandosi a esse (Anderson, 2009)[9].

Per quanto riguarda il miglioramento dei sistemi di monitoraggio, è stato sviluppato un test che sfrutta il riconoscimento di sonde a RNA chiamato ALGADEC per il monitoraggio di specie marine tossiche come *Alexandrium minutum*. Il test ha la capacità di snellire sensibilment i tempi di acquisizione di risultati, passando da un giorno a due ore. Necessita comunque di tecnici preparati per generare campioni di RNA di ottima qualità (Sonja Diercks-Horn and Katja Metfies, 2011) [30]. Anche l'avanzamento di tecnologie nell'ambito delle immagini satellitari è un'importante passo avanti nel monitoraggio e previsione di bloom tossici. Negli Stati Uniti, sono state sfruttate diverse tecnologie ottiche che riguardavano l'identificazione di anomalie nel *backscattering*, concentrazioni di *chl-a* e assorbimento per portare alla scoperta di un bloom della dinoflagellata tossica *Karenia brevis* nel mezzo del Golfo del Messico (Jennifer L. Wolny et al, 2020)[31].

Per quanto riguarda l'impatto economico e sulla salute, gli *HABs* causano non pochi danni e conseguenze. Infatti i settori che ne risentono maggiormente sono quelli del turismo, della pesca e del settore dell'acquacoltura, oltre agli importanti danni alla saluta umana che l'alimentazione con cibo contaminato genera. Si stima che vi siano tra i 628000 casi e il milione e mezzo di sintomi gastrintestinali dovuti all'esposizione alle tossine algali (tramite nuoto in acque contaminate) in California. La perdita economica associata a queste intossicazioni si assesta tra i 21 milioni e i 51 milioni di dollari annui in costi sanitari (il costo varia a seconda del modello epidemiologico utilizzato) (Given et al, 2006) [32].

Per quanto riguarda l'industria della pesca, i danni sono causati sia dalla perdita di materiale invendibile in quanto contaminato sia dai costi che i produttori devono affrontare per il ripristino della produzione. A seguito di una *brown tide* di *Aureococcus anophagefferens* nella Peconic Bay (New York), si è osservata la completa perdita di produzione di capesante (*Argopecten irradians*). Kahn and Rockel (1985)[33], hanno stimato un aumento di costi di almeno 3 milioni di dollari per il ripristino della specie di interesse in quell'estuario. In generale, si stima un perdita annuale di 862 milioni di euro in Europa e di 82 milioni di dollari negli USA (Granèli, 2006)[34].

Vi è perciò la necessità di fronteggiare questi problemi riguardanti le HABs tramite la creazione di programmi di ricerca totalmente incentrati su quest'argomento. Uno di questo è il GEOHAB (Global Ecology and Oceanography of Harmful Algal Blooms), che utilizza approcci osservazionali, sperimentali e modellistici, sfruttando sia tecniche esistenti che innovative per la ricerca e studio del fenomeno delle HABs a diverse scale spaziali (Raphael M. Kudela, 2017)[35].

1.2 Cianobatteri

I cianobatteri rappresentano il più antico gruppo di organismi fotosintetizzanti, apparsi molto probabilmente 3.4 miliardi di anni fa, stando ai record fossili (Schopf, 2000)[36]. Attualmente, i cianobatteri possono trovarsi in diversi ambienti, avendo la capacità di adattarsi a condizioni di temperatura, salinità, pH, concentrazione di O_2 e irradianza, estremamente variegate. Questa loro caratteristica sta diventando problematica soprattutto in ambiente dulcicolo durante gli ultimi anni dove i cambiamenti climatici, associati a un aumento dello sviluppo industriale e agricolo, hanno favorito un progressivo aumento della produzione primaria e di fenomeni d'eutrofizzazione (Paerl & Huisman, 2009)[37].

Questi bloom vanno a impoverire la qualità delle acque in diverse maniere, per esempio favorendo la formazione di schiume sulla superficie dello specchio d'acqua, emettendo cattivi odori, aumentando la torbidità, ed eventualmente riducendo la biodiversità tramite fenomeni anossici. Inoltre, alcuni generi di cianobatteri sono responsabili della sintesi di diversi composti tossici. Infatti, la grande capacità di adattamento è da ricondurre proprio alla capacità di formare metaboliti secondari che aumentano la fitness di questo gruppo anche in condizioni proibitive per altri organismi (Svircev, 2019)[38]. I cianobatteri sono organismi procarioti del gruppo degli eubatteri (Stephen J. Giovannoni, 1988)[39].

Per quanto riguarda il rivestimento cellulare, ci sono molte analogie con i batteri gramnegativi, come la presenza di uno strato di **peptidoglicano** sopra il plasmalemma (fig. 1.1) (Hoiczyk, 2000)[40].



Figura 1.1: Membrane di A) Phormidium uncinatum e B) Escherichia coli a confronto. CM, membrana citoplasmatica; EL, S-layer; OM, membrana esterna; P, peptidoglicano (Egbert Hoiczyk, 2000).

Il peptidoglicano è una componente strutturale di origine polimerica composta da acido N-acetilmuramico e N-acetilglucosammina. Al di sopra è presente uno spazio periplasmico e poi una membrana esterna (Lee, 2008)[41].

Nella porzione periferica del citoplasma sono presenti dei tilacoidi cui sono associati i pigmenti fotosintetici: clorofilla e ficobiliproteine, queste ultime aggregate in strutture globulari detti ficobilisomi (fig. 1.2), localizzati sulla membrana esterna dei tilacoidi (Lee, 2008)[41]. Insieme a questi pigmenti sono presenti anche carotenoidi, soprattutto xantofille (che contengono O_2 , come le mixoxantine e zeaxantina), beta-carotene (che non contiene O_2) ed echinenone, simile al beta-carotene. Tutti i pigmenti accessori (carotenoidi e ficobiliproteine) catturano la luce a lunghezze d'onda non direttamente assorbibile dalla chl-a, che poi trasferiscono alla clorofilla.

La morfologia dei cianobatteri può essere divisa in: i) unicellulari, ii) coloniali o iii) filamentosi. Le colonie sono di fatto cellule singole tenute insieme da una matrice mu-



Figura 1.2: Struttura dei ficobilisomi; PE, ficoeritrina; PC, ficocianina; AP, alloficocianina (Lea Vernès, 2015).

cillaginosa. Un filamento è costituito da un **tricoma**, ossia una semplice fila di cellule disposta l'una dietro l'altra racchiusa all'interno di una guaina mucillaginosa. All'interno di un singolo filamento possono trovarsi anche più tricomi.

La morfologia può complicarsi andando a dare forme dette ramificate, a loro volta uniseriate (ossia una singola fila di cellule) o multiseriate (composte da più file di cellule). I filamenti possono essere semplici o ramificati. A tal proposito si possono distinuere le vere ramificazioni quando le cellule del filamento producono una ramificazione o false ramificazioni se una cellula si accresce al di sopra di una cellula andata incontro a morte programmata (Lee, 2008)[41].

I cianobatteri filamentosi possono poi presentare o meno delle cellule specializzate:

• Acineti: sono cellule specializzate per la resistenza a condizioni non ottimali e presentano una membrana cellulare ispessita, una dimensione maggiore rispetto alle cellule vegetative e un maggior contenuto di riserve nutritive e di DNA (Kaplan, 2010)[42];

• Eterociti: cellule specializzate per la fissazione dell'azoto (Kumar, 2010) 43;

Tradizionalmente, i cianobatteri sono suddivisi secondo le loro caratteristiche morfologiche in 5 sottosezioni. Le sottosezioni I e II sono rappresentate da cellule coccoidi, dove la sottosezione I è capace di dividersi per fissione binaria, mentre la II produce delle endospore dette **beociti**. Il gruppo III, IV e V invece è rappresentato da cianobatteri filamentosi dove il III è composto da cellule vegetative, il IV può differenziarsi in cellule specializzate (acineti e eterociti) e il V è rappresentato anch'esso da specializzazioni ma presenta una morfologia ramificata.

Con l'avvento delle tecniche molecolari, è stato dimostrato che vi è una coerenza filogenetica tra i vari gruppi eccetto che per il gruppo V, dove, sfruttando per la ricostruzione i geni nifH e nifD della nitrogenasi, si è evidenziata un'origine polifiletica di questo gruppo (Tomitani et al., 2006) 44.

I cianobatteri hanno adottato diverse strategie per il movimento, che vanno dalla secrezione di una sostanza mucillaginosa atta allo scivolamento su delle superfici, il riposizionamento in colonna d'acqua attraverso **vescicole gassose** e il nuoto attraverso un liquido senza il coinvolgimento di flagelli (Graham & Wilcox, 2000)[2].

Il movimento di scivolamento viene definito come un movimento attivo di un organismo in contatto con un substrato solido o semisolido senza un organello o un cambiamento osservabile nella struttura dell'organismo (Häder, 1992)[45]. Nei cianobatteri che sono capaci di scivolamento, vi è una struttura aggiuntiva aldilà della membrana esterna, composta da fibre di **oscillina**, una glicoproteina (Lee, 2008)[41]. Sulle cellule adiacenti sono presenti dei pori che secernono una sostanza viscosa, che passando attraverso le fibre di oscillina permettono il movimento, la cui direzione è guidata dall'orientazione delle fibre di oscillina sulla membrana.

Le vescicole gassose sono invece delle strutture cilindriche vuote, racchiuse da una membrana composta da una proteina idrofobica disposta secondo uno schema cristallino (Walsby, 1994)[46]. Data la loro minore densità rispetto al citoplasma circostante, la produzione di queste vescicole gassose permettono all'organismo di salire verso sulla superficie (fig. 1.3) in condizioni di scarsa illuminazione. Viceversa, nel momento in cui l'attività fotosintetica è a un livello elevato, la sintesi di zuccheri e l'assorbimento di ioni aumenta la pressione di turgore cellulare, collassando le vesciole gassose e facendo affondare le cellule (Graham, 2000)[2].

La riproduzione dei cianobatteri unicellulari avviene per fissione binaria. Nelle filamentose, possiamo distinguere due tipi di riproduzione. Alcuni producono **beociti**, che sono simili alle endospore prodotte dai batteri. Sono più piccoli della cellula parentale e si originano per suddivisione del citoplasma in numerosi beociti. La rottura della cellula permette poi la fuoriuscita della spora e sviluppo in una cellula matura. Altre si riproducono per **esospore** che vengono prodotte all'interno del citoplasma della cellula parentale e fuoriescono dalla cellula dalle estremità di quest'ultima.

Nelle forme filamentose la fissione binaria porta a un allungamento dei tricomi che poi si spezzano in corrispondenza di cellule morte (**necridi**) formando dei brevi filamenti (**ormogoni**) che si allontanano tramite movimento di scivolamento, sviuppandosi poi in un filamento separato (Lee, 2008)[41].



Figura 1.3: Meccanismo di funzionamento delle vescicole gassose: quando si trovano in condizioni di scarsa luminosità le vescicole permettono al cianobatterio di salire in superficie. Qui, la maggior quantità di luce assorbita permette una maggior produzione di soluti e molecole ad alta densità che collasseranno le vescicole causando l'affondamento (Graham, 2000).

Tutti fungono da meccanismi di riproduzione e soprattutto dispersione per la colonizzazione di diversi ambienti (Herdman, 1988) [47].

Ecologia dei cianobatteri

I cianobatteri sono probabilmente gli organismi che riescono a occupare il maggior numero di ecosistemi. Possono infatti trovarsi sia a basse sia ad alte temperature, in ambienti d'acqua dolce e marina, in sorgenti termali, ambienti ipersalini e terrestri. I cianobatteri dimostrano infatti la possibilità di dominare ogni ambiente dove, anche temporaneamente, sia presente acqua e luce solare (Badger, 2005)[47]. La presenza di pigmenti accessori (ficobiline), dona ai cianobatteri la capacità di adattarsi ad ambienti con scarsa illuminazione. In particolare, l'acqua limpida assorbe la luce nelle lunghezze d'onda del rosso. Se invece in colonna d'acqua è presente della materia organica disciolta, saranno le componenti nel blu a venire assorbite maggiormente. Questo fa sì che i cianobatteri siano in grado di assorbire le lunghezze d'onda dell'arancione e rosso, non assorbibili dalle maggior parte delle alghe eucariotiche, con un evidente vantaggio competitivo.

Anche la temperatura è un fattore estremamente importante, per la fotosintesi ma anche per il metabolismo in generale. La temperatura causa un aumento dei tassi fotosintetici, fino a un certo punto, oltre il quale questi vanno a decrescere. La decrescita di quest'ultima, è imputabile sia a effetti fotochimici, sia a *costraints* biochimici quali alterazioni del trasporto elettronico o del metabolismo del C (e.g. sintesi del saccarosio) (Davison, 1991) (48). Si è portati a pensare che i cianobatteri possano essere favoriti a temperature elevate rispetto alle alghe eucariotiche (Brock TD, 1975). (49). In realtà, la maggiore capacità di crescita a dei cianobatteri potrebbe non essere imputata soltanto agli effetti fisiologici della temperatura sull'organismo. Infatti in regime di stratificazione, lo strato eufotico è molto poco profondo a differenza dello strato di rimescolamento, che arriva invece a profondità maggiori. In questo scenario, alcune cellule algali potrebbero finire rimescolate a profondità maggiori, rimanendo per molto tempo in condizioni di scarsa luminosità (Kurmayer, 2016) [50]. Questa condizione permette ai cianobatteri contenenti vescicole gassose e.g. *Planktothrix, Aphanizomenon, Thricodesmium* etc. di crescere meglio in laghi stratificati.

Vi è un'interessante relazione diretta tra irraggiamento, concentrazione dei nutrienti e

galleggiamento in Anabaena flos-aquae: infatti, questo cianobatterio va a sintetizzare altre vescicole gassose nel momento in cui l'irradianza è bassa e la concentrazione di ${\cal CO}_2$ e di ${\cal NH}_4^+$ è bassa. Queste condizioni si verificano spesso in laghi eutrofici senza ricambi idrici durante l'estate; infatti la grande biomassa fitoplanctonica va a esaurire sia l'anidride carbonica che lo ione ammonio, ombreggiando gli organismi che si trovano al di sotto dello strato eufotico interessato dal bloom. Anabaena tende a galleggiare vicino la superficie dove può utilizzare l'azoto molecolare e fissarlo. Questo dona un vantaggio rispetto agli altri organismi non azoto-fissatori, generando un bloom che si autorigenera nel tempo in queste condizioni di biomassa elevata e minore intensità luminosa (Lee, 2008) 41. Vi è comunque un *trade-off* tra la fissazione dell'azoto e l'efficienza nella fissazione del carbonio: dobbiamo infatti tenere presente che la fissazione dell'azoto molecolare è estramamente dispendiosa. Pertanto non è possibile effettuare indefinitamente la fissazione dell'azoto molecolare senza incontrare problemi nella fissazione del carbonio inorganico (Boatman, 2018) 51, e per questo il meccanismo appena descritto potrebbe essere messo in atto solo quando le concentrazioni nitriti, nitrati o ammoniaca in colonna d'acqua sono limitanti (come appunto durante un bloom). Contrariamente, i cianobatteri non N fissatori, possono acquisire l'azoto soltanto sottoforma di NO_3^- (nitrato), NO_2^- (nitrito) e NH_3 (ammoniaca), anche se l'utilizzo dell'azoto per la costruzione delle macromolecole è relegato alla forma più ridotta, ossia l'ammoniaca, visto anche che nitrito e nitrato sono estremamente tossici e devono essere prontamente convertiti. Nel caso di ambiente molto ricco di N, questo può essere immagazzinato nella cianoficina, una molecola di riserva per l'azoto.

Per quanto riguarda il fosforo, è necessario tenere in considerazione che in mare e in

acqua dolce la disponibilità di P è diversa: in mare il fosforo non è limitante sul medio periodo (potrebbe diventarlo sul lungo periodo), mentre in acqua dolce questo è spesso limitante, dove le concentrazioni possono essere anche 100 volte minori di quelle in acqua marina (Falkowski & Raven, 2007) 21.

Questo può essere acquisito sottoforma di fosfato inorganico (ortofosfato, PO_4^3-) che sottoforma di fosforo organico. Studi hanno infatti dimostrato come le fosfatasi extracellulari dei cianobatteri siano molto attive nell'idrolisi di composti organici contenenti fosforo, andando a costituire un'importante parte nel turnover dei fosfati in ambiente sia marino che d'acqua dolce (Whitton, 1991)[52]. Quando l'ortofosfato entra nella cellula, questo viene utilizzato subito per la sintesi di **ATP**. Si può andare anche incontro al cosiddetto *luxury uptake*, dove il fosforo viene immagazzinato all'interno dei *polyphosphate bodies*.

I cianobatteri entrano spesso a far parte di associazioni simbiotiche con diversi organismi. Le associazioni simbiotiche possono essere sia extracellulari che intracellulari. Per quanto concerne le associazioni extracellulari, i cianobatteri possono spesso rappresentare i ficobionti nei licheni, ossia organismi nati dall'associazione tra un fungo e un'alga fotosintetica. Un'altra simbiosi extracellulare può avvenire tra la felce acquatica *Azolla* e il cianobatterio *Anabaena azollae*, che si stabilisce all'interno di cavità presenti sul lobo dorsale delle foglie.

Nelle simbiosi intracellulari, i cianobatteri prendono il nome di **cianelle** ed è praticamente impossibile coltivare in laboratorio le specie simbiotiche al di fuori del suo ospite, che prende invece il nome di **cianoma**. Colonie del corallo *Monstatrea cavernosa (Hexacorallia)* ospitano cianobatteri coccoidi all'interno delle cellule. Questi hanno la capacità di effettuare la fissazione di azoto molecolare; le condizioni anaerobiche necessarie vengono create grazie alle **reazione di Mehler** (fig. 1.4), dove la riduzione del glicerolo dato dalle zooxantelle (dinoflagellate) genera un ambiente anossico.



Figura 1.4: Reazione di Mehler: glicerolo viene scomposto dalle reazioni di glicolisi con rilascio di ioni H^+ che riducono le molecole di O_2 derivanti dalla reazione fotosintetica, creando un ambiente privo di ossigeno (Lee, 2008).

1.3 Tossine dei cianobatteri

Le tossine dei cianobatteri possono dividersi in diversi gruppi a seconda della loro struttura molecolare o del loro tessuto target (fig 1.5), dove espleta poi la sua tossicità. Tra le cianotossine abbiamo:

- Peptidi policiclici;
- Alcaloidi;

• Lipopolisaccaridi.

Peptidi policiclici

I peptidi policiclici sono polipeptidi che prendono la forma di una struttura ciclica. La struttura ciclica si forma tramite legami ammidici tra un peptide e l'altro, o tramite instaurazione di altri tipi di legami stabili quali lattoni, eteri, tioeteri e disolfuri (Joo, 2012)53. Le **microcistine** sono delle epatotossine facenti parte di quelle cianotossine che sono maggiormente diffuse in acqua dolce. Isolate per la prima volta in *Microcystis aeruginosa*, ma prodotte anche da molti altri organismi acquatici, sia planctonici che bentonici (Charmichael, 1990)54. Sono peptidi ciclici caratterizzati da 7 amminoacidi e caratterizzate da un amminoacido peculiare denominato *Adda* (acido (2S,3S,8S,9S)-3-Ammino-9-metossi-2,6,8-trimetil-10-fenildeca-4,6-dienoico) caratteristico dei cianobatteri (Chorus e Bartram, 1999)55. Adda, definisce la tossicità delle microcistine (Pham, 2018)56.

Le microcistine presentano 3 forme (fig.1.6) che sono le più presenti nei corpi idrici ossia la MC-LR, MC-RR e MC-YR, rispettivamente la forma levogira della leucina, dell'arginina e della tirosina. Tra le 3, la MC-LR è la più diffusa. Le microcistine sono più o meno idrosolubili a seconda della molecola considerata, quindi necessitano di un trasportatore ATP-dipendente per attraversare la membrana plasmatica delle cellule del fegato. Una volta penetrata negli epatociti, inibisce le fosfatasi 1 e 2A, che portano a iperfosforilazione del citoscheletro e depolimerizzazione dei filamenti intermedi che lo compongono, restringimento delle cellule che controllano la circolazione sanguigna nell'organo, con conseguente rigonfiamento del fegato ed emorragia. Se presente a basse

Tossine	Struttura	Generi	Specie
Epatotossine			
Microcistine	Eptapeptidi ciclici	Dolichospermum (Anabaena) Anabaenopsis Aphanizomenon, Aphanocapsa Hapalosiphon Limnothrix Microcystis Nostoc Planktothrix Oscillatoria	D. circinale D. flos-aquae D. lemmermannii D. viguieri Anab. milleri Aph. ovalisporum Aphanoc.cumulus H. hibernicus L. redekeii M. aeruginosa M. flos-aquae M. viridis M. wesenbergii M. botrys P. agardhii, P. rubescens, O. tenuis
Nodularine	Pentapeptidi ciclici	Nodularia	N. spumigena
Neurotossine			
Anatossina-a	Alcaloidi tropano connessi	Dolichospermum (Anabaena) Aphanizomenon Cylindrospermum Oscillatoria Planktothrix Phormidium Raphidiopsis	D. circinale D. flos-aquae D. planctonicum D. spiroides P. rubescens P. formosa Pho. formosum R. mediterranea
Anatossina-a(s)	Guanidine metil fosfato estere	Dolichospermum	D. flos-aquae, D. lemmermannii
Saxitossine	Alcaloidi carbammati	Dolichospermum Anabaena Aphanizomenon Cylindrospermopsis Lyngbya Planktothrix	D. circinale, D. lemmermannii D. spiroides A. perturbata var. tumida Aph. isatschenkoi, Aph. flos-aquae, C. raciborskii L. wollei Planktothrix sp. FP1
Dermatotossine (irritanti) e o	citotossine		
Cilindrospermopsine	Alcaloidi guanidinici	Anabaena Aphanizomenon Cylindrospermopsis Raphidiopsis, Umezakia	A. bergii A. lapponica Aph. ovalisporum Aph. flos-aquae, L. wollei C. raciborskii R. curvata U. natans
Lingbiatossina-a	Alcaloide	Lyngbya Oscillatoria Schizotrix	L. majuscula
Aplisiatossina e debromoaplisiatossine Endotossine irritanti	Alcaloide	Lyngbya Oscillatoria Schizotrix	O. nigroviridis S. calcicola
Tossine lipopolisaccaridiche	Lipopolisaccaridi	Parte dei cianobatteri	

Figura 1.5: Cianotossine e rispettive specie produttrici (Lucentini e Ottaviani, 2011)



Figura 1.6: Struttura chimica delle 3 forme più comuni di microcistine (Lucentini e Ottaviani, 2011).

dosi, porta a ipertrofia epatica e proliferazione cellulare, senza sfociare nell'emorragia (Sivonen, 1996) 57. La tossicità delle microcistine varia da alta e.g. $LD_{50}=50 \ \mu g/Kg$ (nel topo) a non percettibile.

Nel 2010, la IARC ha posto le MC-LR tra le possibili sostanze cancerogeniche negli umani in quanto sono state osservate capacità di indurre tumori del fegato nei topi, ma ancora non vi sono abbastanza evidenze ne su studi compiuti su umani ne su animali. Le **nodularine** (NOD) sono peptidi ciclici composti da 5 amminoacidi (fig. 1.7), il cui maggior produttore è il cianobatterio *Nodularia spumigena*. Descritte per la prima volta nel 1988 da Charmichael 58, sono state descritte 8 isoforme della molecola (Mazur-Marzec, 2006) 59. Il meccanismo d'azione delle NOD è molto simile alle MC; sono anch'esse epatotossiche e inibiscono l'azione delle fosfatasi 1 e 2 (Eriksson, 1988) 60. Questo porta alla distruzione dei filamenti di actina e conseguente rigon-



Figura 1.7: Struttura chimica della nodularina (Lucentini e Ottaviani, 2011)

fiamento delle cellule del fegato. A dose letali porta a emorragie epatiche nel giro di alcune ore e a insufficienza epatica nel giro di alcuni giorni (Gilroy, 2000) 61. La LD_{50} nei topi è di 50 μ g/Kg. A dosi più basse determina proliferazione delle cellule epatiche. Anche le nodularine, sono state inserite dalla IARC nella lista delle sostanze probabilmente carcinogeniche, dovuto alle scarse evidenze ottenute fino ad ora.

Al caloidi

Gli alcaloidi sono definiti come composti organici contenenti azoto in uno stato negativo di ossidazione, distribuiti in maniera limitata tra gli organismi viventi (Pelletier, 2983)[62].

Tra gli alcaloidi annoveriamo le **cilindospermopsine**(fig. 1.8). Descritte per la prima volta nel 1992 da Ohtani⁶³, sono rappresentate da un alcaloide triciclico che consiste in un gruppo guanidinico triciclico combinato con un idrossimetiluracile. È altamente idrosolubile. A basse dosi, osservato sia *in vivo* che *in vitro*, porta a un'inibizione della sintesi proteica irreversibile, che porta a citotossicità sia del fegato che del rene. La tossicità acuta è invece mediata dalla sintesi di metaboliti secondari dati dal citocromo



Figura 1.8: Struttura chimica della cilindrospermopsina (Chorus e Welker, 2021)

P450 (Humpage, 2005) $\boxed{64}$. Si è notato usando inibitori del cyt p450 si osserva una diminuzione della citotossicità mediata dai metaboliti, ma nessun miglioramento per quanto riguarda l'inibizione della sintesi proteica. Si osserva inoltre una diminuzione del quantitativo di GSH (glutatione ridotto), che può essere dovuta sia all'utilizzo di glutatione per metabolizzare le cilindrospermopsine, sia perché la sintesi di glutatione era inibita.

Nell'uomo, l'esposizione a acqua contaminata porta a sintomi gastrointestinali come diarrea sanguinolenta e conseguente perdita di elettroliti. Vi si associa grave disidratazione, perdita di proteine, glucosio e chetoni nelle urine. I casi, richiedevano quasi sempre ricovero ospedaliero con terapie endovenosa.

L'anatossina-a e l'omoanatossina-a sono alcaloidi bicicilici. Strutturalmente correlata all'omoanatossina-a, la quale quest'ultima presenta un gruppo metilico aggiuntivo (fig 1.9). Nonostante la differente struttura, il meccanismo molecolare è identico. La tossina ha un'elevata tossicità acuta, se somministrata nel topo per via intraperitoneale ha una LD₅0 di 250-375 μ g/Kg (Rogers, 2005) 64. Invece, per via orale, ha una LD₅0 molto più elevata, essendo >5000 μ g/Kg (Codd, 1994) 65. Nel primo caso la morte è molto veloce, per paralisi muscolare e asfissia. Nel secondo caso avviene dopo un



Figura 1.9: Struttura chimica anatossina-a e omoanatossina-a (Lucentini e Ottaviani, 2011)

periodo di latenza

Il meccanismo d'azione è simile a quello dei carbamati e degli insettidici organofosfati, con inibizione non competitiva irreversibile dell'acetilcolinesterasi (AChE). La differenza è che gli insetticidi agiscono sul tessuto nervoso centrale, mentre le ATX-a sul tessuto nervoso periferico (Buratti, 2017) 66.

Non ci sono molti dati sugli effetti sull'uomo, se non per un episodio di un ragazzo di 13 anni deceduto dopo una caduta accidentale all'interno di uno stagno in un campo da golf. La presenza di anatossine è stata rilevata post-mortem in sangue e feci (Stuart, 2006)[53], anche se la rilevazione di anatossine da campioni forensi non sempre è affidabile (James et al., 2005)[67].

Da includere nella lista c'è anche l'**anatossina-a(s)**, estere fosforico dell'idrossiguanidina (fig. 1.10): anche questa molecola condivide la struttura chimica con gli organofosfati e carbamati, e anche se è differente dall'ATX-a, ha un effetto simile di inibizione dell'acetilcolinesterasi e mancata idrolisi dell'acetilcolina, portando a ipereccitabilità nervosa. Un altro alcaloide è composto poi dalla **saxitossina** (STX), che fa parte del gruppo di tossine dette PSP (Paralytic Shellfish Poisoning). Le saxitossine sono prodotte da alghe eucaritiche ma anche da cianobatteri, soprattutto *Cylindrospermopsis*



Figura 1.10: Struttura chimica dell'anatossina-a(s)

raciborskii, Geitlerinema amphibium, Geitlerinema lemmermannii, Cylindrospermum stagnale e Phormidium uncinatum. La molecola (fig. 1.11) è formata da un gruppo tetra-idropurinico e due subunità di guanidina. Le STX e le neosaxitossine (NEO) sono detti carbamoil-derivati e hanno struttura simile a quella dei carbamati. Tra le varie



Figura 1.11: Struttura basale delle tossine PSP (Lucentini e Ottaviani, 2011).

tossine PSP, le STX e le NEO sono le più potenti in termini di tossicità. Il meccanismo d'azione consta nel blocco dei canali Na⁺ nei neuroni (fig. 1.12), causando un arresto nella generazione del potenziale d'azione e conseguente asfissia. Nelle cellule cardiache bloccano invece i canali K⁺ e Ca2+, impedendo la corretta conduzione del potenziale d'azione con conseguenti aritmie che possono risultare fatali.

I sintomi di un'intossicazione compaiono dopo 30 minuti dall'esposizione. Se l'espo-



Figura 1.12: Meccanismo d'azione delle STX e delle NEO (Valèrio, 2010).

sizione è lieve, i sintomi vanno dal torpore delle labbra e formicolio al dolore ai piedi e punta delle dita. Si possono anche avere sintomi gastrointestinali quali vomito e diarrea.

L'intossicazione grave è invece caratterizzata da astenia profonda, atassia, difficoltà a mantenere l'equilibrio, difficoltà respiratorie fino alla morte per asfissia entro 2/24 ore dall'ingestione.

La dose letale per un uomo può essere di 1-2 mg di tossina, anche se possiamo avere sintomi anche dopo ingestione di 200-600 μ g. Se superate le prime 12 ore, il paziente si riprende senza rischi e rapidamente.

Altre cianotossine

Oltre alle già menzionate cianotossine rilevate in acque dolci e salmastre di tutto il mondo, altre tossine sono state scoperte nelle acque marine e costiere soprattutto nell'area dell'Indo-Pacifico e delle Hawaii(Funari, 2008) 68. Vengono ritenute la causa di dermatiti da contatto ("prurito del nuotatore") nelle Hawaii (Serdula, 1982)[69]. In particolare, si osservano vescicazioni, orticaria e desquamazione anche profonda della pelle in zone sensibili quali labbra e aree sotto il costume da bagno. Questo fenomeno si verifica soprattutto in zone tropicali dove è presente il cianobatterio Lyngbya majuscula (Hambright, 2014)[70]

. Si sono verificate anche intossicazioni da ingestione di carni di tartaruga marina *Chelonia midas* contaminate (Yasumoto, 1998)[71]. L'ingestione delle carni contaminate hanno prodotto infiammazioni a livello della bocca, dell'esofago e dello stomaco, insieme a ulcere orali e stomacali, dolori addominali, nausea, vomito e diarrea (Haschek, 2013)[72].

L'aplysiatossina è un bilattone fenolico (fig. 1.13) che nel topo presenta una LD_{50} di 100-120 μ g/kg; la morte è avvenuta per dissanguamento dell'intestino tenue, preceduta da un restringimento dei vasi linfatici e congestione della rete microcapillare nella lamina propria mucosae (Nagai, 1998) [73]. La lyngbiatossina ha un meccanismo d'azione



Figura 1.13: Struttura chimica dell'applysiatossina (Funari e Testai, 2008).

simile a quello delle aplysiatossine, in quanto anche questa tossina induce gravi danni ai capillari dei villi intestinali presenti nell'intestino tenue. Iniezioni intraperitoneali di lyngbiatossina hanno una LD_{50} di 250 μ g/kg, e i danni maggiori erano riportati in topi giovani piuttosto che in topi adulti (Ito, 2002) 74. Per via orale la dose subletale sale a 600-1000 μ g/kg.

La lyngbiatossina insieme alla **debromoaplysiatossina** sono stati descritti come potenti promotori tumorali, in quanto aumentano l'azione delle protein-chinasi C (Fujiki, 1981)[75].

Lipopolis accaridi

Il **lipopolisaccaride** è un'endotossina presente sulle membrane dei batteri gramnegativi che ha una struttura di base composta da 3 componenti essenziali: un glicano con un polisaccaride O-specifico a cui si lega un glicolipide che ancora un **lipide A** e una regione *core* polisaccaridica (Durai et al., 2013)[76] (fig. 1.14). L'esposizione a LPS è stata associata a reazioni allergiche, irritazioni degli occhi o problemi gastrointestinali, nonostante sperimentalmente questi effetti non siano mai stati riprodotti. Il meccanismo di azione consta del legame dell'LPS con dei recettori trans-membrana denominati *toll-like*. Il legame con questi fattori genera una cascata di segnali con rilascio di fattori che mediano l'infiammazione insieme alla stimolazione del sistema immunitario e accumulazione di piastrine, con conseguente danno vascolare (Heuman, 2002)[77].

Il lipide-A è la porzione dell'LPS ritenuta la causa delle reazioni avverse in differenti tipi di batteri gram-negativi; è estremamente variabile da specie a specie (ma anche in base al ceppo) e spesso può essere totalmente inattivo. Nonostante gli LPS cianobatterici siano anche 10 volte meno tossici di altre specie batteriche, esistono comunque reports di effetti tossici su umani, quali sintomi gastrointestinali o irritazioni cutanee



Figura 1.14: Struttura molecolare del lipopolisaccaride (Maeshima, 2013).

(Weise, 1970) 78.

Non si hanno molte conoscenze sugli LPS cianobatterici; studi sui topi hanno mostrato una LD_50 che va dai 40 ai 190 mg/Kg di peso corporeo. Vi sono stati estratti invece che non hanno causato morte nemmeno a 250 mg/Kg.

Esperimenti su embrioni di *Danio rerio* volti a dimostrare effetti sul pathway ossidativo, hanno dimostrato un deciso aumento della glutatione-S-trasferasi, un moderato aumento della glutatione perossidasi e nessuna variazione nella glutatione reduttasi. Mentre i livelli di glutatione negli embrioni era elevato, i livelli del glutatione ridotto e del glutatione ossidato non erano alterati, segno che non vi era nessuno stress ossidativo in atto (Jaja-Chimedza, 2012) 79.

Uno studio tossicologico sulla trota iridea Onchorynchus mykiss trattata con LPS cianobatterici e microcistine (sia intere che frammentate) estratte da Microcystis, hanno evidenziato un rigonfiamento del fegato e una maggiore quantità d'acqua nei visceri nel co-trattamento, ma non nel trattamento con le singole microcistine. Questo rispecchia gli effetti degli LPS derivati da altri gram-negativi, che consta nell'alterazione del meccanismo di detossificazione del fegato (Ferrao, 2011)[80].

Sono stati stilati diversi decreti legge e linee guida per la fruizione di luoghi di balneazione e per l'utilizzo di acque potabili colpite da bloom di cianobatteri tossici. In Italia, secondo il Decreto Legisativo n. 116/2008, il valore limite per le acque di balneazione è di 25 μ g/L. Per quanto riguarda le linee guida OMS, non è stata riportata una sola procedura, ma una serie di linee guida che cambiano in base alla probabilità degli effetti avversi che possono verificarsi. Il rischio basso/lieve può verificarsi con concentrazioni di 20,000 cellule per mL. A queste densità, ci si aspetta un livello di 2-4 μ g/L di microcistine nell'acqua. Un rischio di livello moderato può presentarsi con densità cellulari di 1 milione di cellule per litro, con una quantità di tossine disciolte in acqua di 20 μ g/L di microcistine (se il cianobatterio dominante si tratta di *Microcystis* e il contenuto cellulare di tossine è nell'ordine di 0.2pg o 0.4 μ g di microcistine per μ g di clorofilla). Il rischio alto si osserva invece in quelle acque che sono interessate dalla formazione di schiume. Le fatalità per l'uomo in presenza di schiume è ridotta, a differenza degli animali che bevendo da questi specchi d'acqua ingeriscono concentrazioni di tossine elevati. Le schiume si formano quando la concentrazione delle cellule si aggira intorno al milione di cellule. Basandoci sulla LD_{50} (somministrazione orale) della MC-LR nei topi di 5000-11,600 μ g/kg, si può calcolare che per un bambino di 10 kg, l'ingestione di 2μ g di microcistina o meno, causa sanguinamento epatico e danni al fegato. Per quanto riguarda le acque potabili, si adottano le linee guida OMS di 1 μ g/L di microcistine. Per stilare la linea guida, si utilizza la seguente formula:

• Valore Linea Guida= $\frac{TDI*bw*P}{L}$

dove il TDI rappresenta il tolerable daily intake, bw è il peso corporeo, L sono i litri e P rappresenta una proporzione che considera l'ingestione della tossina derivante anche da fonti diverse dall'acqua. Il valore di 1 μ g/L è stato derivato considerando un peso corporeo standard di 60 kg con un consumo giornalieri di acqua di 2 L.

Per la saxitossina è stato calcolato un valore di 80 μ g di STX per 100 g di molluschi per far si che il sito di allevamento venga chiuso.

1.4 Le specie di cianobatteri tossici e la loro distribuzione

L'aumento nell'input di nutrienti (soprattutto fosforo e azoto), associato a un aumento dello sviluppo agricolo e industriale, stanno favorendo l'insorgere di fenomeni di bloom tossici di cianobatteri (Hans W. Paerl and Jef Huisman, 2009). Come già largamente discusso durante l'introduzione sugli *HABs*, i bloom possono comportare sia alterazioni alla trofodinamica dell'ecosistema e conseguente sviluppo di zone anossiche, sia produzione di tossine. I cianobatteri non fanno eccezione e le zone in cui si sviluppano sono interessate da schiume di superficie e cattivi odori e a volte anche da un aumento nella concentrazione delle cianotossine in colonna d'acqua.

Nonostante vi siano sforzi importanti nel diminuire la concentrazione di questi nutrieni nei mari europei (ad esempio con installazione di impianti di smaltimento acque), quello dell'eutrofizzazione è un problema ancora molto diffuso (Coppini, 2010) [81]. Tuttavia, non sempre bloom tossici si osservano in condizioni eutrofiche. Oligotrofia e condizioni non limitanti di fosforo (rapporto N/P compreso tra 10 e 15), possono portare a bloom di cianobatteri tossici. Un esempio è dato dalla proliferazione del cianobatterio tossico protagonista di questa tesi ossia *Plankothrix rubescens* (Jacquet, 2005) [82]. *Planktothrix* è un genere cosmopolita, composto da diverse specie. Le più distribuite, soprattutto nell'emisfero Nord, sono *P. agardhii* e *P. rubescens. P. agardhii* è un cianobatterio di colore verde con un'alta concentrazione di ficocianina, altamente resiliente e tollerate anche a basse irradianze, che rappresenta uno dei più comuni protagonisti di bloom tossici (microcistine) (Bonilla, 2012) [83]. *P. rubescens* è invece

1.4. LE SPECIE DI CIANOBATTERI TOSSICI E LA LORO DISTRIBUZIONE

un cianobatterio di colore rosso, dovuto a un'elevata presenza di ficoeritrina (Ernst, 2009) 84. Rappresenta la specie più abbondante associata a contaminazioni da microcistine.

Il genere *Microcystis*, anch'esso contenente specie produttrici di microcistine, è molto diffuso in tutto il globo. Nelle acque giapponesi, almeno sei specie di *Microcystis* sono capaci di formare bloom, e almeno due di esse producono microcistine sia in ambiente che quando isolate e coltivate in laboratorio, ossia *M. areuginosa* e *M. viridis* (Xu et al., 2008)[85].

Microcystis wesenbergii rappresenta un altro componente del genere *Microcystis*. Presente anch'esso in un areale molto esteso (Asia, Europa, America e Oceania), è stato protagonista di molti studi volti a comprendere se fosse o meno un produttore di MC. Durante un bloom all'interno di un bacino idrico in Vietnam, sono stati isolati almeno 5 ceppi appartenenti a *M. wesenbergii*, che rappresentava la specie dominante durante l'evento di fioritura. Nessuno dei 5 ceppi isolati era però capace di produrre microcistine e molto probabilmente la presenza di MC era da imputare alla presenza di *M.* areuginosa (Luu, 2019)[86].

Anche il mar Baltico (che presenta un range di salinità che va da 2 a 13 (Kniebusch, 2019) 87) è estremamente colpito da questi fenomeni di intensa proliferazione di cianobatteri, soprattutto del genere Anabaena, Aphanizomenon e Nodularia. Le fioriture avvengono soprattutto a fine estate, ma la presenza di microcistine-LR non sono di chiara origine: infatti non vi sono chiare correlazioni che indichino Anabaena come produttrice di queste cianotossine. Piuttosto, la specie che maggiormente da origine a bloom tossici nel golfo di Finlandia è Nodularia spumiqena, che produce l'epatotossina
nodularina, un pentapeptide ciclico (Halinen, 2007) **86**. Inoltre, la specie Aphanizomenon flos-aquae che normalmente produce una neurotossina, si è rivelata non tossica in mar Baltico. Ceppi tossici di Anabaena sono invece presenti in ecosistemi d'acqua dolce in Egitto, Danimarca, Norvegia, Canada, Finlandia e Francia.

Episodi di bloom epatotossici causati da **cilindrospermopsina** sono invece stati registrati in Australia, Giappone, Israele and Ungheria (Bartram and Chorus, 2014) 55. I bloom tossici dovuti a cianobatteri sono ubiquitari in tutto il mondo. È dunque necessario aumentare gli sforzi di monitoraggio soprattutto nelle regioni tropicali e sub-tropicali. Sembra poi che vi sia una maggior distribuzione di cianobatteri produttori di epatotossine rispetto a quelli neurotossici, anche se estesi bloom di cianobatteri neurotossici si siano registrati in Nord America, Europa e Australia (Rapporto ISTI-SAN, 2014) 88.

Vi è anche la necessità di migliorare le tecniche di sequenziamento e ampliare le conoscenze sui diversi ceppi, dato che i bloom monospecifici possono contemplare sia ceppi tossici che ceppi non tossici, impossibili da distinguere al microscopio.

Cianobatteri tossici in Italia

Per quanto riguarda l'Italia, la distribuzione dei cianobatteri potenzialmente tossici è confinata alle acque interne.

Planktothrix rubescens forma bloom a elevate densità cellulari, e costituisce la più importante specie produttrice di microcistine (fig. 1.16) (Bogialli, 2009) [89]. *P. rubescens* forma bloom in bacini e specchi d'acqua oligotrofici e con ricambio idrico adeguato

1.4. LE SPECIE DI CIANOBATTERI TOSSICI E LA LORO DISTRIBUZIONE

lungo tutto il territorio italiano (fig 1.5); solitamente in laghi sub-alpini oligotrofici o mesotrofici non produce fioriture visibili; questo perchè i bloom non sono così intensi in termini di concentrazioni (<10.000 cell/mL), in quanto i processi di rimescolamento superficiali vanno a diluire le fioriture. Questa specie ha la peculiarità di permanere nel metalimnion (area al di sotto del perilimnion, in cui è presente il termoclino di un lago (Brusseau, 2019) [55]), e quindi di determinare una maggiore concentrazione di MC non in superficie.

Diversamente, nel lago di Pusiano (Lecco), *P. rubescens* provoca bloom nel periodo autunno-inverno, con concentrazioni MC >1 μ /L durante il periodo 2005/2006. Nell'anno 2011 invece, sono state trovate concentrazioni molto maggiori di 5 μ /L (Legnani et al., 2005)[90].

Dolichospermum lemmermannii interessa soprattutto i laghi di Como, Garda, Maggiore e Iseo. È una delle specie che crea più disagi a livello turistico, visto che i bloom possono dare problemi alla balneazione. Nel lago Maggiore, durante l'anno 2005, i livelli di MC si sono attestati a una concentrazione maggiore di 1 μ g/L. Altre specie tossiche trovate in questo lago sono Dolichospermum planctonicum e Pseudoanabaena sp., trovate nell'anno 2012 a densità fortunatamente basse (ARPA Piemonte, 2012)[9]. Nel lago Annone, presente in provincia di Lecco, ci sono state imponenti fioriture di Woronichina naegeliana, specie produttrice di anatossina-a, dove però la concentrazione di tossine risultano irrisorie (Rapporto ISTISAN, 2014)[88].

Nel ramo Est del medesimo lago si è invece verificata un'altra situazione, con bloom della specie Aphanizomenon flos-aquae ad agosto 2004 e 2009. Le densità cellulari erano nell'ordine di 10^8 nel 2004, mentre nel 2009 erano anche maggiori, con una con-

centrazione di ATX-a di 290 $\mu {\rm g/L}.$

Nel centro Italia, il lago di Vico nel Lazio è spesso interessato da fioriture di *P. rube*scens, che hanno anche raggiunto densità di 10^8 cellule/L. Tuttavia, dal 2010, la parte di cellule che contengono il gene per le microcistine, il *mcyB*, sono molto diminuite, anche se le concentrazioni di microcistine non si sono azzerate del tutto. Le cellule tossiche tendono tra l'altro a trovarsi a maggiore profondità rispetto alla superficie (Funari, 2011) [92].

Nelle Marche, laghi artificiali come quello di Gerosa o quello del Fiastrone sono anch'essi interessati di fioriture di *P. rubescens*. In entrambi i laghi, le fioriture hanno avuto le stesse dinamiche, con elevate densità cellulari nello strato metalimnico, nel periodo estivo e in superficie nel periodo invernale. Comunque, nel lago del Fiastrone le concentrazioni di microcistine non hanno mai superato gli $0.2 \ \mu g/L$. Nel lago di Cingoli (lago di Castreccioni), campionamenti in profondità hanno rilevato concentrazioni di microcistine nell'ordine dei 2.5 $\ \mu g/L$ (Akyol et al., 2021) [93].

Il lago di Castreccioni è considerato uno dei laghi meso-eutrofici italiani perché non mostra elevate concentrazioni di nutrienti. Qui *P. rubescens* è molto comune, e non dipende quindi da situazioni distrofiche come elevate concentrazioni di nutrienti o inquinamento organico.

In figura 1.15 è mostrato il grafico degli andamenti dei bloom e della concentrazione di microcistine disciolte in acqua. Durante il primo anno di monitoraggio, il bloom è stato rilevato durante il periodo invernale fino agli inizi del periodo primaverile. Un altro leggero picco di concentrazione è stato osservato anche durante i mesi estivi, tuttavia minore di quello invernale. Nel 2015, invece, la fioritura è avvenuta durante il periodo



Figura 1.15: Andamento della popolazione di *P. rubescens* nel lago di Castreccioni durante il periodo 2014-2019 (Akyol et al., 2021).

estivo, in questo caso con concentrazioni estrememamente elevate. Nel 2016 il picco di concentrazione si è registrato in agosto mentre nel 2017 è avvenuto in aprile, quindi più precoce rispetto agli anni precedenti. Nel 2018 si è osservato in agosto mentre nel 2019 i blooom sono stati due: uno a maggio e uno in autunno, anche se le densità cellulari erano minori rispetto al primo.

In Italia meridionale invece, un episodio di bloom eccezionale di *P. rubescens* è avvenuto nel bacino idrico di Occhito, nella regione Puglia durante l'anno 2009. Vi sono state trovate concentrazioni variabili di MC, in un range che va da 0.006 μ g/L (novembre 2009) a 28.4 μ g/L (aprile 2009). Al contrario, eccezionali concentrazioni cellulari di 45 x 10⁶ cellule in agosto-luglio 2009 sono rapportate a mediocri concentrazioni di MC (<4 μ g/L). Trattamenti delle acque si sono comunque rilevati preziosi nell'abbassare la concentrazione delle MC nell'acqua, la cui erogazione non è stata mai interrotta (Bogialli, 2013)[94].

A seguito dell'apertura delle dighe dovuta a forti piogge, l'acqua del bacino è arrivata

al mare dove sono presenti impianti di mitilocultura. Dal monitoraggio dell'acqua, concentrazioni non elevate di MC sono state trovate sia in acqua sia nei mitili. (De Pace, 2014)[95].

In Sardegna, nel 2004, nei 3 laghi Benzone, Govossai e Gusana ci sono stati fenomeni di intensi bloom durati dall'estate fino all'autunno. Le densità cellulari si attestavano in un range che va da 10^6 a oltre 200×10^9 cellule per litro. Le specie dominanti apprtenevano ai generi Anabaena, Aphanizomenon, Aphanocapsa, Aphanothece, Cylindrospermopsis, Lyngbya, Merismopedia, Microcystis, Oscillatoria, Planktothrix, Pseudanabaena, Woronichia. Durante i bloom, si avevano solitamente una o due specie dominanti, solitamente Planktothrix (soprattutto P. rubescens) e Micricystis (soprattutto M. aeruginosa) (Bogialli, 2009) [89].



Figura 1.16: Distribuzione dei bloom di *Planktothrix spp.* in laghi e bacini italiani tra il 1992 e il 2009 (Lucentini e Ottaviani, 2011)

1.5 Le tossine dei cianobatteri in mare

Finora la discussione si è soffermata soprattutto su bloom di cianobatteri tossici, che si sono verificati in ambiente d'acqua dolce: da bacini idrici contenenti acqua per la distribuzione (acque potabili, acque per irrigazione etc.) a laghi artificiali e non. I bloom però possono anche interessare tutti gli ambienti acquatici, da zone salmastre a zone costiere fino a zone di oceano aperto.

Per esempio *Trichodesmium* è un cianobatterio marino tropicale filamentoso non eterocitico con la capacità però di fissare l'azoto molecolare mediante diazociti (Heiman, 2015)[96].

Per quanto riguarda la tossicità, in alcuni studi sono stati somministrati estratti di *Trichodesmium* derivati da un bloom sulle coste caraibiche a dei topi; in questa occasione, gli estratti si sono rilevati neurotossici (Hawser, 1991)[97]. In altre occasioni, si sono rivelate non tossiche sugli organismi marini.

Hawser et al., nel 1992, hanno testato la tossicità di due specie di *Trichodesmium*, *T. thiebautii* e *T. erythraeum* sul copepode calanoide *Artemia salina*. I risultati mostrano un'alta tossicità di *T. thiebautii*, dove il 24% dei campioni mostravano una mortalità >75%.

Esperimenti su *Acartia tonsa* invece, effettuati usando diversi isolati di *Trichodesmium* spp., hanno dimostrato una percentuale di mortalità del 100% quando esposti a omogenizzati di *Trichodesmium*, mentre mostravano una mortalità irrisoria quando esposti a isolati integri del cianobatterio. Tra l'altro, in tutti trattamenti che mostravano alta mortalità, in alcuni soggetti si notava l'estrusione dell'intestino. Questo particolare sintomo non è stato spiegato del tutto, ma potrebbe avere a che fare con un massiccio rigonfiamento delle viscere (Guo, Chunzhi & Tester, 1994).

E anche molto frequente che bloom di cianobatteri tossici avvenuti in acque dolci, possano influenzare anche le regioni che si trovano a valle del bacino, quindi zone costiere in cui è possibile trovare spesso allevamenti di acquacoltura o molluschicoltura. Sulle coste portoghesi, durante il 2016, elevate concentrazioni di *Planktothrix agardhii*, un cianobatterio produttore di microcistine incapace di produrre eterociti e acineti, sono state trovate nelle acque antistanti un estuario. L'area rappresenta sia una zona di intenso allevamento di molluschi che una zona ad alta fruizione turistica, soprattutto perché ospita spesso surfisti e bagnanti. Concentrazioni cellulari decrescenti (ma sempre elevate), sono state trovate sia in mare aperto sia alla bocca dell'estuario. A livello del molo, le concentrazioni cellulari mostravano oscillazioni settimanali tra 4,960,608 e 174,244 cellule/L. Nella zona della spiaggia, le concentrazioni andavano da 296.229 x 10^6 a 122.571 x 10^6 cellule/L. Alla foce del fiume, si sono registrate le concentrazioni maggiori, in un intervallo che va da 6810.3×10^6 alle 2328 x 10^6 cellule/L. In alcune zone, le concentrazioni eccedevano quelle segnalate dalle norme di sicurezza dell'OMS. Inoltre, anche dalle zone dove la salinità arrivava a 35, è stato possibile recuperare cellule vitali che hanno dato vita alle colture utilizzate per testare la crescita a diverse salinità (Churro, 2017) 98. Molto probabilmente, le cellule si sono originate in un bacino idrico a monte della zona di studio che ospita spesso bloom di questo cianobatterio. Anche in Italia, un evento di bloom cianobatterico nel bacino idrico di Occhito, in Puglia, dove vi erano presenti elevate densità cellulari di P. rubescens (produttrice di microcistine), ha avuto conseguenze in acqua di mare. Nel 2014 De Pace e Vita 95,

hanno dimostrato la presenza di microcistine all'interno dei tessuti di *Mytilus galloprovincialis* presenti in allevamenti a valle del bacino idrico interessato.

In Grecia le microcistine sono state rilevate in alcuni mitili coltivati nel Golfo di Thermaikos, più precisamente nelle aree di Chalastra, Imathia e Pieria, nel Nord della Grecia (Kalaitzidou et al., 2021)[99].

Altre rilevazioni di microcistine nei mitili sono state anche condotte in Sardegna da Baralla et al. 100 su due lagune costiere, quella di Cabras e quella di Calich, in cui l'acqueoltura e il turismo sono aspetti fondamentali nell'economia locale. Anche qui non sono stati trovati livelli di microcistine elevati nelle acque e nei mitili durante i mesi primaverili-estivi.

1.6 Scopo della tesi

Lo scopo di questa tesi è stato quello di studiare la capacità di crescita e di produzione di tossine del cianobatterio dulcicolo tossico *Planktothrix rubescens*, isolato dal lago di Castreccioni (provincia di Macerata) coltivato a salinità differenti da quelle d'acqua dolce. Sono state compiute analisi delle abbondanze cellulari tramite densità ottica (OD650 e OD750) allo spettrofotometro e tramite quantificazione delle cellule attraverso la microscopia ottica diretta, per valutare la crescita del cianobatterio.

Oltre all'andamento temporale delle cellule si è anche studiata la capacità di produrre tossine tramite LC-MS/MS (analisi effettuata dall'Istituto Zooprofilattico Sperimentale Umbria e Marche ISZUM). Abbiamo studiato la concentrazione delle MC sia attraverso la quantificazione nel comparto intracellulare che attraverso la quantificazione di quest'ultime disciolte nel mezzo di coltura.

Sono state poi analizzate le concentrazioni dei pigmenti fotosintetici quali clorofilla, ficocianina, alloficocianina e ficoeritrina tramite spettrofotometria.

È stata infine caratterizzata la composizione macromolecolare di lipidi, carboidrati e proteine attraverso l'analisi FTIR (Fourier-trasform infrared spectroscopy) per andare a osservare possibili modifiche nella composizione cellulare dei componenti strutturali principali dopo l'esposizione a salinità differenti da quelle ambientali.

Capitolo 2

Materiali e metodi

Oggetto di questo studio è il cianobatterio filamentoso tossico *Planktothrix rubescens* (Fig 2.1). Il ceppo utilizzato è stato prelevato dal lago di Castreccioni (N 43.38018343883211°, E 13.160429190435844°), nel comune di Cingoli (provincia di Macerata) nell'anno 2019. La coltura madre era mantenuta in camera di coltura a 21°C con fotoperiodo 12:12 h L/D, in terreno BG-11 preparato con acqua deionizzata sterilizzata in autoclave a 121°C. Sono stati quindi preparati diversi terreni BG-11, a diverse salinità:

- BG-11 a salinità 0 come controllo;
- BG-11 a salinità 10 ;
- BG-11 a salinità 20 ;
- BG-11 a salinità 30.



Figura 2.1: Filamenti di *P. rubescens* a microscopio ottico diretto, ingrandimento 40x.

Per preparare i terreni di coltura a differenti salinità, l'acqua di mare filtrata è stata previamente sterilizzata in autoclave e ne è stata misurata la salinità. Per fare ciò, è stata prelevata una piccola aliquota, posta in una falcon sotto cappa a flusso laminare. Dopodiché, ne è stata determinata la salinità con un salinometro.

Successivamente, dell'acqua deionizzata è stata sterilizzata in autoclave e utilizzata per la preparazione del terreno BG-11 a salinità 0. Per prepararlo, è stato prelevato lo

stock di BG-11 a concentrazione 50x e portato poi a concentrazione finale diluendolo in acqua deionizzata sterile. Gli altri terreni di coltura sono stati preparati miscelando prima l'acqua deionizzata con l'acqua di mare filtrata per raggiungere i livelli di salinità desiderati (i.e. 10, 20 e 30), poi aggiungendo lo stock di BG-11 come fatto per il terreno non salato.

A questo punto si è proceduti all'allestimento delle colture, prelevando dalla coltura madre un'aliquota da inoculare nei terreni appena allestiti. Prima dell'allestimento ci si è accertati che la coltura fosse in fase esponenziale e che le cellule fossero in buone condizioni. Sono stati inoculati 41 mL di coltura madre in 12 beute da 250 mL, contenenti 209 mL di terreno di coltura (rapporto 1:6) considerando 3 repliche per ciascuna condizione di crescita:

- 3 beute di controllo a salinità 0;
- 3 beute salinità a 10;
- 3 beute salinità a 20;
- 3 beute salinità a 30.

Le beute sono state poi mantenute in camera di coltura a 21°C, con fotoperiodo 12:12 h L/D, irradianza 90-100 $\mu molm-2s-1$ per tutta la durata dell'esperimento.

L'esperimento è durato un mese, con 12 campionamenti distribuiti durante l'arco temporale stabilito. Il T0 corrisponde al primo giorno di campionamento, il T1 al secondo giorno di campionamento e così via. Il campionamento era effettuato a giorni alterni, dove ad esempio il T12 non rappresentava il dodicesimo giorno ma il ventinovesimo giorno di campionamento.

2.1 Analisi densità ottica e cellulare

La curva di crescita è stata ricostruita utilizzando sia le abbondanze cellulari, sia le densità ottiche. I campionamenti per la loro stima sono stati eseguiti ogni 2 giorni. Per ogni giorno di campionamento, sono stati prelevati 1.5 mL di coltura da ciascuna delle 12 beute, posti all'interno di eppendorf da analizzare allo spettrofotometro e al microscopio.

Le analisi delle densità ottiche sono state eseguite allo spettrofotometro JENWAT 6705 UV/vis, misurandole a due lunghezze di onda diverse, 650nm e 750nm, come indicato in alcuni studi scientifici condotti proprio su questo genere di cianobatteri (Vergalli et al. 101), 2016 e Churro, 2017 102). Lo spettrofotometro sfrutta la legge di Lambert-Beer per fornirci il dato di assorbanza. La tecnica permette di rilevare le assorbanze sia nello spettro del visibile che dell'ultravioletto. La legge di Lambert-Beer postula che l'assorbanza è proporzionale sia alla concentrazione del materiale assorbente all'interno della soluzione analizzata (in questo caso la sospensione cellulare) sia al cammino ottico. Lo spettrofotometro è composto da un monocromatore che è il responsabile della generazione del fascio luminoso alla lunghezza d'onda voluta, da una sorgente di luce e da un rilevatore, che converte il segnale luminoso in impulso elettrico. Per procedere con l'analisi, il volume di 1.5 mL del campione viene messo all'interno di cuvette (fig. 2.2) per l'analisi spettrofotometrica poste all'interno dello scompartimento porta-cuvette. Si sceglie la lunghezza d'onda desiderata e si procede poi a rilevare l'assorbanza. La lettura è stata replicata 3 volte, e il valore d'assorbanza che viene usato per la costruzione della curva di crescita è il risultato della media delle 3 letture. Per la stima delle abbondanze, lo stesso campione utilizzato per la densità



Figura 2.2: Cuvette per spettrofotometria.

ottica è stato recuperato e sedimentato in una camera SEDGEWICK-RAFTER (fig. 2.3) che contiene esattamente 1 mL di campione. La camera di sedimentazione è composta da una griglia con 1000 campi (50 colonne e 20 righe) e, date le elevate abbondanze si è deciso di effettuare la conta non su tutti i campi ma solamente su alcuni scelti a caso. Una volta sedimentato, il campione viene osservato al microscopio diretto, contando le cellule presenti in ogni campo. Per facilitare la conta, questa è stata eseguita all'ingrandimento 10X non contando ogni singola cellula all'interno dei filamenti osservati in ciascun campo, ma misurando (con l'ausilio di un oculare micrometrico) la lunghezza di ogni singolo filamento presente nel campo. Dato che il numero di cellule per μ m di filamento era stato preventivamente verificato al 40X su un elevato numero di campioni, il numero di cellule totali è stato quindi ricostruito dalla lunghezza totale di tutti i filamenti misurati, tenuto conto del numero di campi presi

in considerazione. I dati di abbondanza sono stati espressi quindi in cell./mL. Infine sono stati calcolati i tassi di crescita specifici (μ d⁻¹) secondo la seguente formula:

•
$$\mu = \frac{(lnN_1 - lnN_0)}{(t_1 - t_2)}$$

dove N_1 e N_0 erano le abbondanze calcolate al t_1 e t_0 rispettivamente.



Figura 2.3: Camera per conta cellulare.

2.2 Analisi dei pigmenti

Sono state analizzate le concentrazioni della clorofilla a (Chl-a) e delle ficobiline, ovvero ficoeritrina (PE), ficocianina (PC) e alloficocianina (APC). I campioni (5 mL) per queste analisi sono stati prelevati da ciascuna beuta al T0, al T2 e al T12.

Il protocollo adottato per l'estrazione dei pigmenti prevedeva una centrifugazione di un determinato volume di coltura per separare le cellule dal mezzo di coltura, ma, dato che la centrifugazione non permetteva una completa sedimentazione (non si formava un pellet ben definito ma le cellule rimanevano in sospensione), per la separazione si è optato per una filtrazione tramite pompa a vuoto: un filtro con maglia da 1.2μ m, viene posto al di sopra di un supporto forato che va a chiudere ermeticamente una beuta per filtrazione. Questa beuta presenta lateralmente un becco a cui collegare un tubo di plastica che esce direttamente dalla pompa, che rimuovendo l'aria crea vuoto nella beuta. Il volume da filtrare viene versato poi all'interno di un cilindro graduato posto al di sopra del filtro, tenuto fermo da una pinza di ferro. Una volta completato il processo di filtrazione, il materiale rimane sul filtro mentre il terreno di coltura viene raccolto nella beuta sottostante. È necessario avere cura di non utilizzare una pressione troppo elevata quando si va ad accendere la pompa, per evitare di rompere le cellule, e rischiare di perdere pigmenti o componenti macromolecolari, troppo piccoli per poter essere trattenuti dal filtro.

L'estrazione dei pigmenti è stata fatta trattando il materiale filtrato con tampone fosfato 0,05M a pH6.7 (PBS), lisozima 0.5% e acetone 90%..

Per la preparazione del PBS, si pesano 0.435g di KH_2PO_4 e 0.340g di K_2HPO_4 (diidrogenofosfato di potassio e idrogeno fosfato di potassio, rispettivamente) che verranno sciolte in 50 mL di acqua deionizzata. Una volta solubilizzati i Sali, si portano le due soluzioni al pH-metro. Prima di procedere alla misurazione, occorre creare la retta di taratura del pH-metro misurando due soluzioni a concentrazioni di ioni H^+ note, rispettivamente a pH 4 e 7. Una volta fatto questo, posizioniamo una delle due soluzioni e misuriamo il pH, ricordando sempre di tenere in agitazione con un magnete. Effettuata la misurazione, portiamo la soluzione al pH desiderato versando con una pipetta Pasteur parte dell'altra soluzione, per alzare o abbassare il pH. Il tampone fosfato verrà poi conservato in frigo.

Per la procedura di estrazione dei pigmenti, si filtrano 10 mL di coltura, si preleva il

materiale filtrato e si sciacqua il filtro all'interno di una eppendorf da 2 mL con 1.4 mL di PBS, avendo cura di asportare più materiale possibile dal filtro. Si porta poi a volume con 0.600μ l di lisozima. Dalla soluzione contenuta nella eppendorf si asporta poi 1 mL di soluzione e la si versa in una nuova eppendorf. I campioni nelle due eppendorf rappresentano le due repliche tecniche di ogni beuta. Si agita poi su vortex per rendere omogenea la soluzione e assicurare il contatto del lisozima con tutte le cellule. Si collocano le eppendorf all'interno di un bagnetto termico, dove rimangono un'ora a 37°C per attivare il lisozima; questo per far sì che vada a lisare la membrana del cianobatterio, portando in soluzione i pigmenti. I campioni sono poi centrifugati per 10 minuti a 12000g. È quindi possibile separare il surnatante contenente le ficobiline dal pellet che contiene invece la clorofilla. Per estrarre la clorofilla, è stato necessario trattare il pellet con 1 mL di acetone 90%, conservandolo a 4°C e al buio per una notte. I campioni sono stati poi conservati in freezer fino all'analisi allo spettrofotometro.

L'analisi allo spettrofotometro è stata fatta a diverse lunghezze d'onda a seconda del pigmento analizzato: 562 nm per la ficoeritrina, 615 nm per la ficocianina, 652 nm per l'alloficocianina e 664nm per la chl-a. La misurazione è stata eseguita allo spettrofotometro JENWAY 6705 UV/vis, sfruttando la funzione "lunghezza d'onda multipla". Una volta ottenuto il valore d'assorbanza, questo deve essere convertito in una misura di concentrazione del pigmento espressa in mg/L secondo le seguenti formule di conversione assorbanza/concentrazione;

- PC (mg/L)= $\frac{A615-0.474*(A652)}{5.34}$
- APC (mg/L)= $\frac{A652-0.208*(A615)}{5.09}$

- PE (mg/L)= $\frac{A562-2.41*(PC)-0.849*(APC)}{9.62}$
- Chl-a (μ g L^{-1})=A664 * 11.41

Questi dati sono stati poi utilizzati per ricostruire l'andamento delle concentrazioni dei singoli pigmenti lungo la curva di crescita.

2.3 Analisi FTIR

L'analisi di spettroscopia FTIR (Fourier-trasform infrared spectroscopy) è un'analisi spettroscopica non distruttiva che consta nell'emissione di un fascio di luce nella lunghezza d'onda dell'infrarosso diretto verso un campione. La tecnica FTIR per l'analisi delle componenti biochimiche delle alghe è particolarmente efficace in quanto la manipolazione del campione è minima, non disturba l'ambiente intracellulare, e conseguentemente riduce la probabilità di andare incontro ad artefatti sperimentali (Giordano et al, 2001)[103]. Lo spettrometro FTIR è composto da un corpo nero che emette radiazione IR nel range $4000cm^{-1}$ e $400cm^{-1}$. Il fascio passa attraverso un interferometro di Michelson costituito da un *beam splitter*, che possiede la caratteristica di scomporre la radiazione IR in due raggi, che saranno diretti verso uno specchio fisso e uno mobile. I due raggi riflessi si ricombinano e vanno a colpire l'oggetto che vogliamo misurare. Quando passa attraverso il campione, quest'ultimo assorbe parte della lunghezza d'onda in base ai gruppi funzionali che costituiscono la molecola in esame. Quando colpiti, i gruppi funzionali vibrano a determinate lunghezze d'onda, e in virtù di questa caratteristica, è possibile discriminare le diverse componenti cellulari del campione generando una sorta di "codice a barre" molecolare. La parte di radiazione che viene riemessa dal campione passa infine attraverso un rilevatore e quindi al computer, dove verrà prodotto il dato tramite un metodo matematico chiamato **trasformata di Fourier**, che converte l'interferogramma in dato.

Il macchinario non effettua una singola scansione, in quanto questo genererebbe uno spettro con un grado di rumore elevato. Si effettuano infatti più scansioni del campione, e il computer genera una media delle letture che presenta un livello di rumore accettabile per la misurazione (Meyers, 2003)[104]. Nel nostro caso, si effettuavano 31 scansioni.

Per la preparazione del campione è stata sfruttata la procedura descritta in Giordano et al., 2009 105, dove è necessaria la centrifugazione del campione per separare le cellule dal mezzo di coltura. È stato utilizzato per questo scopo lo spettrometro FTIR Tensor 27 (Bruker Optik GmbH, Ettlingen, Germania). Per i problemi precedentemente esposti riguardo l'utilizzo della centrifuga per separare le cellule dal mezzo di coltura, si è optato per la filtrazione dei campioni come precedentemente descritto. Per evitare che il sale presente nel mezzo vada a generare un effetto di scattering con la generazione di spettri errati, è essenziale lavare il campione in una soluzione di ammonio formato (AF) isoosmotico con il mezzo. Per preparare la soluzione, si scioglie l'AF in milliQ per ottenere la stessa molarità del mezzo di coltura. Verranno prodotte 4 soluzioni: una contenente solo milliQ (controllo), e tre per le colture a 10, a 20 e 30 PSU. La milliQ è un'acqua ultrapura che si ottiene dalla filtrazione di acqua precedentemente purificata attraverso un filtro Millipore. Il filtro trattiene particelle che potrebbero disperdere il fascio luminoso diretto verso il campione. L'analisi è stata condotta su campioni di coltura (10 mL) prelevati da ogni beuta e campionati al T0, T2, T6 e T12. Ogni campione è stato filtrato e, una volta eliminato il mezzo di coltura, è stato sciacquato due volte con 10 mL di AF in modo da minimizzare la quantità di sale trasportata nel campione.

Successivamente il materiale cellulare filtrato è stato risospeso in 110μ L di AF, sempre utilizzando la soluzione isoosmotica a quella del mezzo. Per asportare il materiale dal filtro è stata utilizzata una spatola accuratamente pulita. Una volta risospeso il campione, un volume pari a 50 μ L di soluzione è stato depositato su dischetti di vetro messi poi a seccare in stufa a 80°C. Dopo il passaggio in stufa, i dischetti sono stati caricati nello spettrometro FTIR. I dischetti sono stati posti all'interno di un caricatore a forma di ruota per l'allocazione dei dischi. Uno dei dischi conteneva soltanto la soluzione di ammonio formato, come bianco.

La curva ottenuta (fig. 2.4) rappresenta gli spettri di assorbanza delle componenti macromolecolari che compongono le cellule. L'acquisizione degli spettri è stata effettuata utilizzando il software Opus 6.5. Le regioni di nostro interesse vanno dai 1800 ai $900cm^{-1}$, più precisamente il picco a $1740cm^{-1}$ rappresenta i lipidi, quello a $1650cm^{-1}$ rappresenta le proteine ed i picchi nell'intervallo che va da 1200 a $900cm^{-1}$ rappresenta invece i carboidrati. Dagli spettri otteniamo però non la concentrazione della molecola, ma la sua quantità relativa rispetto alle altre componenti. Questo perchè non stiamo effettuando la misurazione su un campione omogeneo e liquido, rendendo inapplicabile la legge di Lambert-Beer, sfruttata invece nella spettrofotometria.

Una volta caricati i dischetti, con il software OPUS sono stati effettuati gli scan sui campioni, a cui è stata applicata una "baseline correction" per poi ricavare la deriva-



Figura 2.4: Spettri di assorbimento: ogni curva di diverso colore rappresenta un diverso campione analizzato.

ta seconda (fig 2.5). L'applicazione della derivata è essenziale in quanto permette di identificare i contributi che formano i picchi complessi di assorbimento.

Il dato di abbondanza dei composti organici è stato estratto dallo spettro complesso di assorbanza mediante la funzione "curve fit". Il fit è costruito posizionando possibili picchi deconvoluti alle lunghezze d'onda dei picchi negativi della derivata seconda (fig. 2.6). Una volta ottenuti gli integrali dei picchi deconvoluti, si sono calcolati i rapporti di abbondanza tra proteine, lipidi e carboidrati (i contributi dei carboidrati dovranno essere prima sommati in quanto non sono rappresentati da un singolo picco ma da diversi picchi all'interno dell'intervallo precedentemente indicato).



Figura 2.5: Derivata seconda: in figura sono evidenti i picchi negativi che si trovano al di sotto dello zero.

2.4 Analisi delle tossine

L'analisi delle tossine è stata portata avanti dall'Istituto Zooprofilattico Sperimentale Umbria e Marche (IZSUM), dove è stata rilevata la concentrazione delle tossine alle diverse salinità a tre giorni di campionamento differenti per tutte le condizioni: al T0, al T6 e al T12. I prelievi sono stati eseguiti sotto cappa a flusso laminare, prelevando 15 mL di coltura da ogni beuta. All'IZSUM i campioni sono stati filtrati per separare le cellule da terreno di coltura allo scopo di quantificare la concentrazione di tossina intracellulare ed extracellulare. I pellet risultanti (100-200 μ L) e i terreni di coltura rimossi successivamente liofilizzati sono stati risospesi in 1 mL di MeOH all'80%. I campioni sono stati analizzati in LC-MS/MS.



Figura 2.6: Curve fit: le curve a campana di colore verde sono state posizionate in base ai picchi negativi osservati nella derivata seconda.

2.5 Analisi statistiche

Le correlazioni (Pearson) tra i valori di densità cellulari espresse in OD650, OD750 e abbondanze cellulari (cell/mL) sono stati testati per valutarne la significatività e il coefficiente di correlazione. Le differenze di abbondanze cellulare, tassi di crescita e produzione di tossine nelle cellule e nel terreno di coltura tra le diverse condizioni di salinità è stata valutata attraverso a analisi della varianza one-way (ANOVA). Quando le differenze erano significative (p i0,05), è stato eseguito il un confronto a coppie di Tukey's pairwise comparison. Le analisi statistiche sono state condotte utilizzando Statistica (StatSoft Inc., Tulsa, OK, USA).

Capitolo 3

Risultati

3.1 Andamento temporale delle abbondanze di *Planktothrix rubescens*

Le abbondanze cellulari di *P. rubescens* sono state monitorate tramite sia analisi delle loro densità ottiche a 650 e 750 nm (OD650 e OD750 rispettivamente), sia contando le singole cellule che compongono i filamenti.

In figura 3.1 è mostrata la curva delle OD650 alle diverse salinità, dove sull'asse Y sono mostrate le assorbanze e sull'asse X i T di campionamento. A salinità 0, si osserva come fino al T6 vi è una fase in cui non è presente una crescita apprezzabile, la cosiddetta *lag phase*, in cui il cianobatterio si adatta alle nuove condizioni di crescita prima che quest'ultimo inizi a sfruttare i nutrienti presenti ed entri in fase di crescita esponenziale (Rolfe, 2012)[106]. Dal T2 in poi, si registra una piccola crescita che dapprima



Figura 3.1: Andamento di *P. rubescens* con OD 650 coltivato alle diverse salinità.

è limitata fino al T6 con un OD650 di 0.102 ± 0.009 , dopodichè la crescita accelera sensibilmente fino a T12, con un OD650 di 0.545 ± 0.023 . L'esperimento si è concluso prima che la coltura terminasse la sua fase di crescita esponenziale, anche se la replica numero 3 mostra una flessione della pendenza più marcata al T12 rispetto alla prima e seconda replica.

Per quanto riguarda invece le colture sottoposte a salinità crescenti, abbiamo osservato che la crescita risulta fortemente inibita, con dei valori di assorbanza a T12 di 0.040 \pm 0.005, 0.038 \pm 0.003 e 0.034 \pm 0.001 rispettivamente a salinità 10, 20 e 30. I valori di OD650 massimi sono stati registrati al T1 (OD650 0.064), T1 (OD650 0.069) e T1 (OD650 0.065) rispettivamente a salinità 10, 20 e 30. I tassi di crescita massimi sono stati 0.252 d⁻¹ (T2), 0.138 d⁻¹ (T2), 0.139 d⁻¹ (T2) e 0.084 d⁻¹ (T4) rispettivamente a salinità 0, 10, 20 e 30. Le curve di crescita stimate con OD750 (fig. 3.2) non hanno fornito andamenti troppo diversi da quelli ottenuti con OD650. Difatti i valori di densità ottiche OD650 e OD750 mostrano una significativa e positiva correlazione tra loro molto alta (r²=0.9975, n=52, p-level <0.001). Come per OD650, il valore



Figura 3.2: Andamento delle densità ottiche (OD750) di *P. rubescens* coltivato alle diverse salinità.

massimo di OD750 al T12 è stato osservato a salinità 0, con un valore di 0.481 \pm 0.025. Riguardo le altre salinità, si hanno i valori massimi al T0 (OD750 0.054), al T0 (OD750 0.061) e al T0 (OD750 0.065) rispettivamente a salinità 10, 20 e 30. Riguardo i tassi di crescita, i valori maggiori erano 0.308 d⁻¹ (T2), 0.232 d⁻¹ (T2), 0.171 d⁻¹ e 0.140 d⁻¹ (T9) rispettivamente a salinità 10, 20 e 30. Nemmeno le abbondanze cellulari (fig. 3.6) mostrano sostanziali differenze da quello che è stato osservato con le densità ottiche. Difatti, i valori di densità ottiche OD650 e OD750 mostrano correlazioni positive e significative molto evidenti con le abbondanze cellulari (r²=0.9891, n=52 e p-level <0.001 e r²=0.9701, n=52 e p-level <0.001 rispettivamente). Come per quanto osservato nei valori delle densità ottiche, nel controllo (salinità 0) si raggiunge l'abbondanza massima a T12 di 1'207'556 ± 131'537 cellule/mL, e anche in questo caso la fase esponenziale la osservava a partire dal T6, con abbondanze di 231'867 ± 18'851 cellule/mL.

Per quanto riguarda le colture sottoposte a salinità crescenti, i valori sono estrema-



Figura 3.3: Andamento delle abbondanze cellulari di *P. rubescens* coltivato alle diverse salinità.

mente bassi, con abbondanze a T12 di 511 \pm 539 cellule/mL per la salinità 10, mentre nessuna cellula è stata registrata al T12 per la salinità 20 e 30. I valori di abbondanza cellulari maggiori si sono avuti a T0 (78'178 cell./mL), T0 (72'178 cell./mL) e sempre a T0 (30'311 cell./mL) a salinità 10, 20 e 30. I tassi di crescita massimi si sono registrati al T0 (0.265 d⁻¹), al T7 (0.443 d⁻¹), rispettivamente a salinità 0 e 10 mentre per le salinità 20 e 30 non si sono mai registrati tassi positivi.

Densità cellulari (OD650, OD750 e abbondanze cellulari) medie significativamente più basse sono state registrate nell'esperimento a salinità 10, 20 e 30, rispetto al controllo (p-level <0.001). Solamente i tassi di crescita medi calcolati con OD650 dell'esperimento a salinità 30 (-0.0366 \pm 0.1026) hanno mostrato valori significativamente più bassi rispetto al controllo (0.0721 \pm 0.0798, p-level <0.05).

3.2 Analisi delle tossine

Le analisi delle tossine sono state eseguite sia per rilevare la concentrazione di tossine prodotta dai cianobatteri nei trattamenti, sia per determinare il tipo di microcistine prodotte.

Le analisi sono state effettuate sia sul pellet (per valutare il contenuto di tossina intracellulare) sia sul terreno di coltura (per valutare la quantità di tossine rilasciate in acqua). In generali, si è visto che la componente principale delle microcistine prodotte da questo ceppo di P. rubescens è la DesMe-MC-RR, ovvero la MC-RR desmetilata, con valori quasi sempre maggiori il 90% dell'intero profilo tossico (fig. 3.4). Per quanto riguarda la concentrazione di microcistine totali presenti nel pellet, si osserva che le microcistine tendono a diminuire in condizioni di salinità elevate (i.e. 20 e 30) già al T6. Le MC totali intracellulari erano 629'745 ng/g al T0 in tutte le condizioni. Queste hanno subito un repentino calo al T6 a salinità 0 e 10 con 34'099 e 61'599 ng/g, rispettivamente, per poi risalire al T12 con valori di 222'493 e 274'791 ng/g, rispettivamente. Al contrario, al t12 a salinità 20 e 30 le MC intracellulari erano molto basse: 6'735 e 7'837 ng/g. Seppur non in modo significativo, le medie delle concentrazioni a T6 e T12 intracellulari erano più elevate a salinità 0 (128'296 \pm 133'214 ng/g) e 10 (168'174 \pm 150'778 ng/g rispetto che a salinità 20 (6'907 ± 244 ng/g) e 30 (8068 ± 327 ng/g). La concentrazione di microcistine nel terreno di coltura è invece estremamente diversa: mentre a salinità più basse (i.e. 0 e 10) queste diminuiscono gradualmente nel tempo

rispettivamente), alle salinità maggiori (i.e. 20 e 30) queste aumentano al T6 (23.69 e

(da 18.87 ng/mL al T0, si va a 2.47 e 4.01 ng/mL al T6, e 1.34 e 1.21 ng/mL al T12



Figura 3.4: Concentrazione di MC totali presenti nel pellet (sinistra) e nel terreno di coltura (destra) alle varie salinità.

23.69 ng/mL, rispettivamente) per subire un lieve calo al T12 (13.55 e 18.84, rispettivamente).

Le medie concentrazioni a T6 e T12 nel terreno di coltura erano significativamente più elevate a salinità 30 (21.26 \pm 3.43 ng/mL) rispetto a salinità 0 (1.90 \pm 0.80 ng/mL) e 10 (2.61 \pm 1.98 ng/mL, p-level <0.05).

3.3 Analisi dei pigmenti

Riguardo i pigmenti, le analisi portate avanti sulle diverse componenti fotosintetiche hanno fornito risultati concordanti. Per quanto riguarda la ficocianina (fig. 3.8), con picco di assorbimento a 615 nm, nel controllo possiamo vedere come la ficocianina tende ad aumentare dal T0 al T1, mentre a T12 la concentrazione è molto minore rispetto agli altre due punti considerati, con valori di 0.07 ± 0.02 , 0.09 ± 0.03 e 0.02 ± 0.11 rispettivamente a T0, T1 e T12.

Per quanto riguarda i trattamenti, osserviamo un decremento nella concentrazione della PC, dal T0 al T12, con concentrazioni al T1 e T12 man mano minori all'aumentare della salinità. I due valori più bassi li osserviamo alla salinità 20 e 30 al T12, rispettivamente di 0.02 ± 0.005 e 0.017 ± 0.003 mg/L.

Anche per l'alloficocianina (fig. 3.9) abbiamo andamenti simili, con le concentrazioni che diminuiscono fino al T12 in tutti i trattamenti. Anche per l'alloficocianina i valori più bassi li abbiamo osservati al T12 delle salinità 20 e 30, 0.01 ± 0.005 e 0.017 ± 0.003 mg/L.

La ficoeritrina presenta un andamento simile, diminuendo all'aumentare della salinità



Figura 3.5: Concentrazione di ficocianina a diverse salinità.



Figura 3.6: Concentrazione di alloficocianina alle diverse salinità.



Figura 3.7: Concentrazione di ficoeritrina alle diverse salinità.

e presentando i valori minori sempre al T12 a 20 e 30, ovvero 0.02 ± 0.006 e 0.02 ± 0.005 mg/L (fig. 3.10). La clorofilla (μ g/L) ha un andamento diverso da quello degli altri pigmenti (fig. 3.11), che va invece ad aumentare in concentrazione dal controllo e nel trattamento a salinità 10, dove l'aumento è anche più sostanziale del controllo. Infatti nel controllo la concentrazione rimane pressocchè costante durante tutta la durata dell'esperimento. Abbiamo ottenuto valori per il controllo e per la salinità 10 al T12 di 0.17 ± 0.08 e 0.34 ± 0.06, rispettivamente. Dobbiamo tenere presente però che la concentrazione della clorofilla è espressa in μ g/L, quindi la concentrazione della clorofilla non eccede quella delle ficobiline.



Figura 3.8: Concentrazione di clorofilla alle diverse salinità.

3.4 Analisi FTIR

Tramite la tecnica FTIR, è stato possibile misurare i rapporti di abbondanza tra le macromolecole che compongono le cellule di *P. rubescens*, in modo da osservare possibili *shift* nella composizione cellulare in risposta all'aumento dello stress causato dalla salinità. È necessario ricordare che non è possibile ottenere valori di concentrazione veri e propri, ma solo il valore che è stato ottenuto dal rapporto tra le componenti. La salinità 0 è rappresentata da una singola colonna in quanto le analisi al T0 (che rappresenta il giorno dell'inoculo) della spettrometria FTIR sono state effettuate solo sul campione di controllo e non sulle altre salinità, assumendo che le cellule alle salinità 10, 20 e 30 si trovassero alla stessa condizione di crescita del controllo.

Osservando i risultati (fig. 3.9) dei rapporti di abbondanza protine/carboidrati, vedia-

mo come alla salinità 0 si abbiano dei rapporti che crescono nei primi due T, per poi diminuire a T3 e a T12, con il valore più alto ottenuto al T2 di 0.5 ± 0.15 , maggiore rispetto a tutti gli altri T di campionamento.

Per le salinità maggiori, si osservano invece dei rapporti pressocchè costanti se non al campionamento T2 a salinità 20, dove abbiamo un leggero discostamento, arrivando ad un valore di 0.5 ± 0.5 . Assistiamo però ad un elevato valore di deviazione standard, che potrebbe quindi essere frutto di un errore durante la deconvoluzione degli spettri o durante il processamento dei campioni in laboratorio. I rapporti proteine/lipidi invece



Figura 3.9: Rapporti di abbondanza molecolare tra proteine e carboidrati alle varie salinità.

(fig. 3.10) rimangono costanti a salinità 0 durante l'intera durata dell'esperimento, con valori di 11.9 ± 15.4 , 15.9 ± 15.7 , 5.5 ± 3.1 e 8.4 ± 9.04 rispettivamente a T0, T2, T3 e T12. Per quanto concerne la altre salinità, vediamo come a 10 si abbia un rapporto d'abbondanza maggiore a T12 rispetto agli altri T di campionamento, che mostra un valore di 32.6 ± 22.6 . Anche in questo caso però la deviazione standard è molto elevata, perciò potrebbe rivelare un errore sperimentale avvenuto in una delle diverse fasi di processamento del campione. A 20 e 30 invece il rapporto tende a diminuire, dove a raggiunge valori estremamente bassi al T12 per la salinità 20 1.2 \pm 1.02 e 7.6 \pm 8.5. Si evidenzia comunque un valore abbastanza elevato (31.04 \pm 17.3) al T3 rispetto al T12 per la salinità 30. I rapporti di abbondanza lipidi/carboidrati



Figura 3.10: Rapporti di abbondanza molecolari tra proteine e lipidi alle varie salinità.

(fig. 3.11) mostrano dei valori tutto sommato stabili nei vari T di campionamento e alle varie salinità, se non al T12 a salinità 20 dove abbiamo un valore di 0.1 ± 0.05 , molto superiore rispetto agli altri. È comunque da sottolineare che abbiamo ottenuto un valore di deviazione standard molto elevato anche qui, segno che potrebbe essersi trattato di un errore sperimentale durante la deconvoluzione degli spettri o durante la preparazione dei campioni in laboratorio.


Figura 3.11: Rapporti di abbondanza molecolari tra lipidi e carboidrati alle varie salinità.

Capitolo 4

Discussione

La costante presenza di cianobatteri, principalmente di *Planktothrix rubescens*, nelle acque del lago di Cingoli (noto anche come lago di Castreccioni) e la presenza in esse di cianotossine a concentrazioni non trascurabili incentiva uno studio approfondito sulla presenza di microcistine, nei periodi di fioritura, indagando inoltre la possibilità che esse arrivino al mare tramite il fiume Musone e che vengano accumulate all'interno dei molluschi bivalvi allevati lungo la costa. Quest'ultima possibilità è suggerita anche dal ritrovamento di microcistine in molluschi bivalvi in aree costiere spesso caratterizzate da fioriture di cianobatteri nelle acque interne vicine alla costa (De Pace et al., 2014; Baralla et al., 2017; Kalaitzidou et al., 2021)[99].

I mitili, sono animali oggetto di particolare attenzione in ambito igienico sanitario per la loro capacità di filtrare grandi quantitativi di acqua e quindi di concentrare all'interno dei tessuti contaminanti sia chimici che microbiologici. Pertanto potrebbero essere in grado di accumulare anche livelli non trascurabili di microcistine considerando che, anche se non più vitali, le cellule dei cianobatteri tossici potrebbero mantenere la loro tossicità una volta raggiunta la foce del fiume e le acque costiere. Tuttavia, la ricerca di cianotossine in acque destinate al consumo umano non è oggetto di controllo routinario in quanto, nella vigente normativa europea e nazionale non sono indicati valori soglia né per le alghe né per le tossine da esse derivanti.

Lo scopo di questo studio è stato proprio quello di indagare la capacità di *P. rubescens* di sopravvivere, mantenersi vitale e produrre/rilasciare tossine a salinità crescenti, i.e. mimando quello che accadrebbe quando acque dolci interessate da bloom di cianobatteri tossici arrivano alla foce del fiume e entrano in mare. Per prima cosa abbiamo cercato di validare un metodo che ci potesse aiutare a stimare le abbondanze cellulari in maniera rapida ma precisa. Data l'elevata correlazione osservata tra le densità ottiche OD650 e OD750 e le abbondanze stimate al microscopio ottico, possiamo dire che la stima delle abbondanze tramite le densità ottiche (indipendentemente dalle 2 lunghezze d'onda scelte) è sicuramente la scelta migliore in quanto più rapida.

I risultati di questo studio evidenziano che *P. rubescens* non è in grado di sopravvivere per più di 96 ore a salinità pari o superiori a 10.

Anche Vergalli 2016 101 ha condotto un esperimento simile con *Planktothrix agardhii* mostrando che questo cianobatterio era in grado di mantenere la sua capacità di crescita a salinità di 7.5, mentre la capacità di crescita diminuiva in modo proporzionale a salinità superiori. Anche se le cellule di *P. rubescens* muoiono a salinità pari o superiori a 10 alla fine dell'esperimento (30 giorni), questo decremento di abbondanze cellulari non è repentino, perché per i primi 4 giorni le abbondanze rimangono a valori simili al controllo a salinità 0. Questo vuol dire che le cellule una volta raggiunte le coste,

rimangono vitali e disponibili per almeno 4 giorni agli organismi filtratori, cioè per un lasso di tempo più che sufficiente per essere filtrate e potenzialmente accumulare le loro tossine nei tessuti dell'ospite.

Per quanto riguarda le concentrazioni di microcistine, si è osservato un andamento inverso tra le tossine prodotte e accumulate nel tempo all'interno delle cellule di P. rubescens e quelle rilasciate nel mezzo di coltura, in funzione della salinità: le concentrazioni intracellulari maggiori si sono osservate alle salinità minori (i.e. 0 e 10), anche se le differenze non erano significative, mentre la microcistine disciolte erano maggiori alle salinità di 20 e 30, con differenze significativamente più elevate a salinità 30. La diminuzione di tossine intracellulari con l'aumentare della salinità è stata osservata anche in *P. agardhii* (Vergalli, 2016) 101. Condizioni di crescita favorevoli (presenti solo nel controllo, in quanto nei trattamenti la salinità limitava la crescita del cianobatterio) sembrano aumentare la concentrazione intracellulare di tossine, come dimostrato anche in Engström-Öst (2011) 107. Come dimostrato in Rosen (2018) 108 questo aumento di tossine nel mezzo extracellulare potrebbe essere dovuto a una perdita di materiale dal comparto intracellulare o a plasmolisi delle membrane che trasferisce le tossine nel sovranatante. Ciò potrebbe spiegare la minore concentrazione intracellulare delle microcistine a salinità di 20 e 30. Le stesse conclusioni sono state raggiunte anche da Lethimaki (1997) 109, durante un esperimento su *Nodularia spumigena* nel mar Baltico nel quale una maggiore concentrazione di nodularine nel mezzo era imputato alla rottura delle membrane del cianobatterio.

Il rilascio massivo di tossine in acqua di mare è un risultato degno di nota perché, anche se le cellule di *P. rubescens* non sopravvivono per più di 4 giorni a salinità superiori a 10 e le cellule sopravvissute hanno una concentrazione di tossine molto bassa, queste rilasciano concentrazioni significativamente più alte in acqua di mare rispetto a quelle rilasciate in acque dulcicole/salmastre, rimanendo comunque un pericolo importante nelle acque di transizione e costiere, per gli ecosistemi, i bagnanti e i prodotti ittici destinati al consumo umano.

Altri studi sono stati condotti su altri generi di cianobatteri volti a studiare il comportamento di questi a salinità >0. Microcystis aeruginosa e Dolichospermum circinale sono due cianobatteri isolati dal lago Okeechobee in Florida, per valutarne la crescita a salinità diverse (7.5, 10, 15 e 18) (Rosen, 2018)[108]. Microcystis aeruginosa tollerava salinità fino a 18, mentre Dolichospermum circinale non tollerava valori di salinità maggiori di 7.5. Anche in questo caso si è notato che con l'aumento della salinità, aumentavano le concentrazioni di tossine extracellulari, probabilmente perchè la lisi cellulare portava a una perdita di microcistine che permanevano perciò nella fase liquida.

La principale microcistina prodotta dal ceppo analizzato in questo studio è rappresentata dalla **DesMe-MC-RR**, ovvero una delle microcistine-RR desmetilate. Questo analogo è considerato un vero e proprio biomarker per la presenza di *P. rubescens* (De Pace, 2014)[95] in acqua. In letteratura sono presenti alcuni studi nei quali si dimostra la presenza nei mitili proprio della stessa microcistina (DesMe-MC-RR) a testimonianza del fatto che microcistine prodotte da *P. rubescens*, cianobatterio dulcicolo, si possono accumulare nei mitili lungo le coste marine. Questo è il caso dei mitili prelevati sulla costa Nord della regione Puglia (nelle zone antistanti i laghi costieri di Lesina e di Varano) che sono stati rinvenuti aver accumulato questo tipo di microcistine (De Pace, 2014) [95]; in questo caso le tossine si erano originate da una fioritura di *P. rubescens* nel bacino idrico di Occhito (N 41.58079963813513°, E 14.9446767667475°), al confine tra Puglia e Molise. In questa situazione, i livelli di microcistine che superavano il TDI di un uomo di 60 kg sono state rilevate nell'80% dei campioni nel 2009 e nel 19% dei campioni nel 2010.

Tenendo in considerazione il valore soglia di 1 μ g/L di microcistine per le acque potabili, nel controllo (salinità 0) la concentrazione a T0, T6 e T12 (rispettivamente 18.87 ng/mL, 2.47 e 1.34) di tossine nel sovranatante superavano questo valore di riferimento. Per quel che riguarda invece le tossine prodotte e/o rilasciate in acque saline, ovviamente non è importante vedere se le concentrazioni superano i limiti di legge per la potabilità ma è comunque interessante considerare l'eventuale balneabilità di queste acque. Il decreto legislativo n. 116/2008, indica come valore soglia per la balneabilità il valore di 25 μ g/L. Dai risultati ottenuti, osserviamo come questo valore non viene superato neanche nelle salinità più elevate, dove lo shock salino porta alla plasmolisi e al conseguente rilascio delle tossine in acqua. Quindi possiamo dire che queste acque, pur rimanendo un potenziale pericolo per la salute umana perché le cianotossine presenti possono essere potenzialmente accumulate negli organismi filtratori come i mitili, non lo sono per la balneazione.

Per quel che riguarda la concentrazione di pigmenti questa diminuisce col tempo sia nel controllo che nei trattamenti, in concordanza con quanto ottenuto dai valori di densità ottica e abbondanze cellulari. Questo può voler dire che lo stress salino a cui sono stati sottoposti ha fatto in modo di limitare l'accumulo di pigmenti, che tendono perciò a diminuire con l'aumentare della salintà. La degradazione delle ficobiline salvaguardia le clorofille la cui abbondanza resta più inalterata.

L'analisi spettrometrica FTIR è stata condotta per evidenziare alterazioni nel contenuto macromolecolare: ogni cellula infatti, in risposta allo shock salino, sintetizza osmoprotettori per mitigare i danni causati dalle alte salinità. Il ceppo isolato di P. rubescens non è stato acclimatato ad alte salinità e non presenta perciò un'alta resistenza alle salinità, come anche evidenziato dalle curve di abbondanza cellulare nei trattamenti che mostravano una crescita fortemente inibita. Generalmente, nei cianobatteri con una bassa tolleranza alle salinità, gli osmoliti prontamente sintetizzati sono due disaccaridi: il saccarosio e il trealosio. Nei ceppi moderatamente alotolleranti, si accumula glucosilglicerolo e negli estremofili che crescono in bacini ipersalini, si assiste all'accumulazione di glicina betaina o di glutammato betaina (Lu et al., 2005) 110. Inoltre, saccarosio e trealosio rappresentano gli osmoprotettori che hanno un costo energetico maggiore, calcolato in termini di ATP equivalenti (Erdmann, 2001) [110]. Il meccanismo di protezione attuato dai disaccardi nei confronti delle membrane consta sostanzialmente dell'inserimento di questi ultimi tra i gruppi fosfato dei fosfolipidi, andando ad abbassare la probabilità di rottura del doppio strato fosfolipidico (Rudolph, 1990 111. Per quanto riguarda la composizione macromolecolare di P. rubescens, osserviamo rapporti proteine/carboidrati e lipidi/carboidrati che sono molto bassi (quindi vi è una più alta concentrazione di zuccheri nelle cellule del cianobatterio), si nota comunque una lieve diminuzione del rapporto a salinità maggiori di 0 ma i rapporti non vanno a modificarsi sostanzialmente col tempo. Questo cianobatterio potrebbe quindi attuare una risposta per lo più omeostatica allo stress.

Inoltre, lo stress salino aumenta il grado di desaturazione delle membrane fosfolipidi-



Figura 4.1: Osmoliti e loro costo energetico: nel nostro caso, saccarosio e trealosio sono quelli che presentano un costo maggiore in termini energetici, mentre glicina betaina e glicerolo sono quelli più energicamente economici, rispettivamente di 81 e 30 ATP equivalenti contro i 109 dei due disaccaridi.

che: una maggiore fluidità di quest'ultime fa in modo che risentano meno dei danni causati dal sale. Il ruolo della desaturazione delle membrane nella resistenza allo stress salino è stato dimostrato da Allakhverdiev 2001[112], tramite l'utilizzo di ceppi di Synechocystis difettivi per la **desaturasi** degli acidi grassi. In questi ultimi, la tolleranza al sale era molto diminuita rispetto alle varianti *wild-type*.

Inoltre questo aumento della desaturazione va ad attivare la sintesi delle proteine di membrana associate al sistema antiporto Na⁺/H⁺. Questo sistema permette la fuoriuscita dalle membrane degli ioni sodio in eccesso, che andrebbero a danneggiare il fotosistema irreversibilmente. Si osserva perciò un maggior grado di desaturazione delle membrane e una maggior quantità di proteine nelle membrane plasmatiche delle cellule stressate (Singh, 2002)[113]. In *P. rubescens*, i rapporti proteine/lipidi in alcuni casi (i.e. salinità 20 al T2 e a salinità 30 al T3) rimangono elevati, ma non vi sono dati sufficienti per supportare questa ipotesi.

Bibliografia

- [1] David M Nelson, Paul Tréguer, Mark A Brzezinski, Aude Leynaert e Bernard Quéguiner. «Production and dissolution of biogenic silica in the ocean: revised global estimates, comparison with regional data and relationship to biogenic sedimentation». In: *Global biogeochemical cycles* 9.3 (1995), pp. 359–372.
- [2] Linda E Graham e Lee Warren Wilcox. *Algae*. Benjamin-Cummings Publishing Company, 2000.
- [3] Jussi Meriluoto, Lisa Spoof e Geoffrey A Codd. Handbook of cyanobacterial monitoring and cyanotoxin analysis. John Wiley e Sons, 2017.
- Joann M. Burkholder Donald M. Anderson Patricia M. Glibert. «Harmful algal blooms and eutrophication: Nutrient sources, composition, and consequences».
 In: *Estuaries* 325.4b (2002), pp. 704–726.
- R.C. Guy. «Red Tide». In: Encyclopedia of Toxicology (Third Edition). A cura di Philip Wexler. Third Edition. Oxford: Academic Press, 2014, pp. 65–66.

- [6] Adriana Zingone e Henrik Oksfeldt Enevoldsen. «The diversity of harmful algal blooms: a challenge for science and management». In: Ocean and Coastal Management 43.8 (2000), pp. 725–748.
- [7] RA Andersen. «Diversity of eukaryotic algae». In: Biodiversity and Conservation 1.4 (1992), pp. 267–292.
- [8] Jones J Sivonen K. Toxic cyanobacteria in water. A guide to their public health consequences, monitoring and management. CRC Press, 1999.
- [9] Donald Anderson. «Approaches to monitoring, control and management of harmful algal blooms (HABs)». In: Ocean and coastal management 52 (lug. 2009), p. 342.
- [10] Joseph Geraci, Donald Anderson, Ralph Timperi, David Aubin, Greg Early, John Prescott e Charles Mayo. «Humpback Whales (Megaptera novaeangliae)
) Fatally Poisoned by Dinoflagellate Toxin». In: Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences - CAN J FISHERIES AQUAT SCI 46 (nov. 1989), pp. 1895–1898.
- [11] Sandra E Shumway. «A review of the effects of algal blooms on shellfish and aquaculture». In: Journal of the world aquaculture society 21.2 (1990), pp. 65– 104.
- [12] Noemí Inmaculada Medina-Pérez, Manuel Dall'Osto, Stefano Decesari, Marco Paglione, Encarnación Moyano e Elisa Berdalet. «Aerosol Toxins Emitted by Harmful Algal Blooms Susceptible to Complex Air–Sea Interactions». In: *Environmental Science & Technology* 55.1 (2021), pp. 468–477.

- [13] Stefano Accoroni e Cecilia Totti. «The toxic benthic dinoflagellates of the genus Ostreopsis in temperate areas: a review». In: Advances in Oceanography and Limnology 7.1 (2016).
- [14] Gustaaf M. Hallegraeff, Donald M Anderson, Catherine Belin, MarieYasmine Dechraoui Bottein, Eileen Bresnan, Mireille Chinain, Henrik Enevoldsen, M. Iwataki, Bengt Karlson, Cynthia H. McKenzie, Inés Sunesen, Grant C. Pitcher, Pieter Provoost, Anthony Richardson, Laura Schweibold, Patricia A. Tester, Vera L. Trainer, Aletta T. Yñiguez e Adriana Zingone. «Perceived global increase in algal blooms is attributable to intensified monitoring and emerging bloom impacts». In: Communications Earth and Environment 2 (2021).
- [15] Adriana Zingone, Laura Escalera, Katerina Aligizaki, Margarita Fernández-Tejedor, Amany Ismael, Marina Montresor, Patricija Mozetič, Seyfettin Taş e Cecilia Totti. «Toxic marine microalgae and noxious blooms in the Mediterranean Sea: A contribution to the Global HAB Status Report». In: *Harmful Algae* 102 (2021). Global Harmful Algal Bloom Status Reporting, p. 101843.
- [16] H.-O. et al. Pörtner. IPCC Special Report on the Ocean and Cryosphere in a Changing Climate.
- [17] Scott W Nixon. «Coastal marine eutrophication: a definition, social causes, and future concerns». In: Ophelia 41.1 (1995), pp. 199–219.
- [18] li Guancheng, Lijing Cheng, Jiang Zhu, Kevin Trenberth, Michael Mann e John Abraham. «Increasing ocean stratification over the past half-century».
 In: Nature Climate Change 10 (dic. 2020), pp. 1–8.

- [19] Daniel Kamykowski e Steven McCollum. «The temperature acclimated swimming speed of selected marine dinoflagellates». In: Journal of Plankton Research
 J PLANKTON RES 8 (mar. 1986), pp. 275–287.
- [20] Michael L. Brosnahan, Alexis D. Fischer, Cary B. Lopez, Stephanie K. Moore e Donald M. Anderson. «Cyst-forming dinoflagellates in a warming climate». In: *Harmful Algae* 91 (2020). Climate change and harmful algal blooms, p. 101728.
- [21] Paul G. Falkowski e John A. Raven. «Aquatic Photosynthesis». In: Princeton University Press, 2007. Cap. 7.
- [22] Mark L Wells, Vera L Trainer, Theodore J Smayda, Bengt SO Karlson, Charles G Trick, Raphael M Kudela, Akira Ishikawa, Stewart Bernard, Angela Wulff, Donald M Anderson et al. «Harmful algal blooms and climate change: Learning from the past and present to forecast the future». In: *Harmful algae* 49 (2015), pp. 68–93.
- [23] Christopher J. Gobler. «Climate Change and Harmful Algal Blooms: Insights and perspective». In: *Harmful Algae* 91 (2020). Climate change and harmful algal blooms, p. 101731.
- [24] Christopher J Gobler, Owen M Doherty, Theresa K Hattenrath-Lehmann, Andrew W Griffith, Yoonja Kang e R Wayne Litaker. «Ocean warming since 1982 has expanded the niche of toxic algal blooms in the North Atlantic and North Pacific oceans». In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 114.19 (2017), pp. 4975–4980.

- [25] Andrew W Griffith, Owen M Doherty e Christopher J Gobler. «Ocean warming along temperate western boundaries of the Northern Hemisphere promotes an expansion of Cochlodinium polykrikoides blooms». In: Proceedings of the Royal Society B 286.1904 (2019), p. 20190340.
- [26] Frances M Van Dolah. «Marine algal toxins: origins, health effects, and their increased occurrence.» In: *Environmental health perspectives* 108.suppl 1 (2000), pp. 133–141.
- [27] Eugene M Rasmusson e John M Wallace. «Meteorological aspects of the El Nino/southern oscillation». In: Science 222.4629 (1983), pp. 1195–1202.
- [28] J.L Maclean. «Indo-Pacific red tides, 1985–1988». In: Marine Pollution Bulletin 20.7 (1989). Pollution in the Far East, pp. 304–310.
- [29] Hengfeng Miao e Wenyi Tao. «The mechanisms of ozonation on cyanobacteria and its toxins removal». In: Separation and Purification Technology 66.1 (2009), pp. 187–193.
- [30] Sonja Diercks-Horn, Katja Metfies, Steffi Jäckel e Linda K. Medlin. «The AL-GADEC device: A semi-automated rRNA biosensor for the detection of toxic algae». In: *Harmful Algae* 10.4 (2011), pp. 395–401.
- [31] Jennifer L. Wolny, Michelle C. Tomlinson, Stephanie Schollaert Uz, Todd A. Egerton, John R. McKay, Andrew Meredith, Kimberly S. Reece, Gail P. Scott e Richard P. Stumpf. «Current and Future Remote Sensing of Harmful Algal Blooms in the Chesapeake Bay to Support the Shellfish Industry». In: Frontiers in Marine Science 7 (2020), p. 337.

- [32] Suzan Given, Linwood H. Pendleton e Alexandria B. Boehm. «Regional Public Health Cost Estimates of Contaminated Coastal Waters: A Case Study of Gastroenteritis at Southern California Beaches». In: *Environmental Science & Technology* 40.16 (2006), pp. 4851–4858.
- [33] James R Kahn e Mark Rockel. «Measuring the economic effects of brown tides.» In: Journal of Shellfish Research 7.1 (1988), p. 165.
- [34] J.T. Turner E. Granéli. «Ecology of Harmful Algae». In: Springer, 2006. Cap. 1.
- [35] Raphael M. Kudela. «GEOHAB–The Global Ecology and Oceanography of Harmful Algal Blooms Program: Motivation, Goals, and Legacy». In: Oceanography (mar. 2017).
- [36] Schopf J.W. «The Fossil Record: Tracing the Roots of the Cyanobacterial Lineage». In: The Ecology of Cyanobacteria. (2000).
- [37] H. Paerl e Jef H. «Climate Change: A Catalyst for Global Expansion of Harmful Cyanobacterial Blooms». In: *Environmental microbiology reports* 1 (feb. 2009), pp. 27–37.
- [38] Zorica Svirčev, Dijana Lalić, Gorenka Bojadzija Savic, Nada Tokodi, Damjana Drobac Backovic, Liang Chen, Jussi Meriluoto e Geoffrey Codd. «Global geographical and historical overview of cyanotoxin distribution and cyanobacterial poisonings». In: Archives of Toxicology 93 (set. 2019).
- [39] SJ Giovannoni, S Turner, GJ Olsen, S Barns, DJ Lane e NR Pace. «Evolutionary relationships among cyanobacteria and green chloroplasts». In: Journal of bacteriology 170.8 (1988), pp. 3584–3592.

- [40] Egbert Hoiczyk e Alfred Hansel. «Cyanobacterial Cell Walls: News from an Unusual Prokaryotic Envelope». In: Journal of Bacteriology 182.5 (2000), pp. 1191– 1199.
- [41] Robert Edward Lee. «Phycology». In: Cambridge University Press, 2008. Cap. 2.
- [42] Ruth N Kaplan-Levy, Ora Hadas, Michael L Summers, Jacqueline Rücker e Assaf Sukenik. «Akinetes: dormant cells of cyanobacteria». In: *Dormancy and resistance in harsh environments* (2010), pp. 5–27.
- [43] Krithika Kumar, Rodrigo A Mella-Herrera e James W Golden. «Cyanobacterial heterocysts». In: Cold Spring Harbor perspectives in biology 2.4 (2010), a000315.
- [44] Akiko Tomitani, Andrew H Knoll, Colleen M Cavanaugh e Terufumi Ohno. «The evolutionary diversification of cyanobacteria: molecular–phylogenetic and paleontological perspectives». In: Proceedings of the National Academy of Sciences 103.14 (2006), pp. 5442–5447.
- [45] Donat-P H\u00e4der e Egbert Hoiczyk. «Gliding motility». In: Algal cell motility.
 Springer, 1992, pp. 1–38.
- [46] ANTHONY E Walsby. «Gas vesicles». In: Microbiological reviews 58.1 (1994), pp. 94–144.
- [47] Michael Herdman e Rosmarie Rippka. «[22] Cellular differentiation: Hormogonia and baeocytes». In: Methods in enzymology 167 (1988), pp. 232–242.
- [48] Ian R Davison. «Environmental effects on algal photosynthesis: temperature».
 In: Journal of phycology 27.1 (1991), pp. 2–8.

- [49] TD Brock. «Predicting the ecological consequences of thermal pollution from observations on geothermal habitats». In: Environmental effects of cooling systems at nuclear power plants. International Atomic Energy Agency, Vienna (1975), pp. 599–622.
- [50] Rainer Kurmayer, Li Deng e Elisabeth Entfellner. «Role of toxic and bioactive secondary metabolites in colonization and bloom formation by filamentous cyanobacteria Planktothrix». In: *Harmful algae* 54 (2016), pp. 69–86.
- [51] Tobias G Boatman, Phillip A Davey, Tracy Lawson e Richard J Geider. «The physiological cost of diazotrophy for Trichodesmium erythraeum IMS101». In: *PloS one* 13.4 (2018), e0195638.
- [52] BA Whitton, SLJ Grainger, GRW Hawley e JW Simon. «Cell-bound and extracellular phosphatase activities of cyanobacterial isolates». In: *Microbial Ecology* 21.1 (1991), pp. 85–98.
- [53] Sang Hoon Joo. «Cyclic peptides as therapeutic agents and biochemical tools».
 In: Biomolecules & therapeutics 20.1 (2012), p. 19.
- [54] Wayne W Carmichael, Nik A Mahmood e Edward G Hyde. «Natural toxins from cyanobacteria (blue-green algae)». In: (1990).
- [55] Ingrid Bartram Jamie; Chorus. *Toxic cyanobacteria in water: a guide to their public health consequences, monitoring and management.* Taylor e Francis, 2014.
- [56] Thanh-Luu Pham e Motoo Utsumi. «An overview of the accumulation of microcystins in aquatic ecosystems». In: Journal of environmental management 213 (2018), pp. 520–529.

- [57] Kaarina Sivonen. «Cyanobacterial toxins and toxin production». In: *Phycologia* 35.sup6 (1996), pp. 12–24.
- [58] WW Carmichael, JT Eschedor, GM Patterson e RE Moore. «Toxicity and partial structure of a hepatotoxic peptide produced by the cyanobacterium Nodularia spumigena Mertens emend. L575 from New Zealand». In: Applied and Environmental Microbiology 54.9 (1988), pp. 2257–2263.
- [59] Hanna Mazur-Marzec, Jussi Meriluoto e Marcin Pliński. «The degradation of the cyanobacterial hepatotoxin nodularin (NOD) by UV radiation». In: Chemosphere 65.8 (2006), pp. 1388–1395.
- [60] JE Eriksson, JAO Meriluoto, HP Kujari, K Österlund, K Fagerlund e L Hällbom. «Preliminary characterization of a toxin isolated from the cyanobacterium Nodularia spumigena». In: *Toxicon* 26.2 (1988), pp. 161–166.
- [61] Duncan J Gilroy, Kenneth W Kauffman, Ronald A Hall, Xuan Huang e Fun S Chu. «Assessing potential health risks from microcystin toxins in blue-green algae dietary supplements.» In: *Environmental health perspectives* 108.5 (2000), pp. 435–439.
- [62] S William Pelletier. «Alkaloids: chemical and biological perspectives». In: (1983).
- [63] Ikuko Ohtani, Richard E Moore e Maria TC Runnegar. «Cylindrospermopsin: a potent hepatotoxin from the blue-green alga Cylindrospermopsis raciborskii».
 In: Journal of the American Chemical Society 114.20 (1992), pp. 7941–7942.
- [64] Andrew R Humpage, Frank Fontaine, Suzanne Froscio, Philip Burcham e Ian R Falconer. «Cylindrospermopsin genotoxicity and cytotoxicity: role of cytochro-

me P-450 and oxidative stress». In: Journal of toxicology and environmental health, part A 68.9 (2005), pp. 739–753.

- [65] Geoffrey A Codd, TM Jefferies, CW Keevil e E Potter. Detection methods for cynobacterial toxins. 149. Elsevier, 1994.
- [66] Franca M Buratti, Maura Manganelli, Susanna Vichi, Mara Stefanelli, Simona Scardala, Emanuela Testai e Enzo Funari. «Cyanotoxins: Producing organisms, occurrence, toxicity, mechanism of action and human health toxicological risk evaluation». In: Archives of toxicology 91.3 (2017), pp. 1049–1130.
- [67] Kevin J James, Janet Crowley, Brett Hamilton, Mary Lehane, Olav Skulberg e Ambrose Furey. «Anatoxins and degradation products, determined using hybrid quadrupole time-of-flight and quadrupole ion-trap mass spectrometry: forensic investigations of cyanobacterial neurotoxin poisoning». In: Rapid Communications in Mass Spectrometry: An International Journal Devoted to the Rapid Dissemination of Up-to-the-Minute Research in Mass Spectrometry 19.9 (2005), pp. 1167–1175.
- [68] Enzo Funari e Emanuela Testai. «Human health risk assessment related to cyanotoxins exposure». In: Critical reviews in toxicology 38.2 (2008), pp. 97– 125.
- [69] M Serdula, G Bartolini, RE Moore, J Gooch e N Wiebenga. «Seaweed itch on windward Oahu». In: *Hawaii medical journal* 41.7 (1982), pp. 200–201.

- K.D. Hambright, R.M. Zamor, J.D. Easton e B. Allison. «Algae». In: Encyclopedia of Toxicology (Third Edition). A cura di Philip Wexler. Third Edition.
 Oxford: Academic Press, 2014, pp. 130–141.
- [71] Takeshi Yasumoto. «Fish poisoning due to toxins of microalgal origins in the Pacific». In: *Toxicon (Oxford)* 36.11 (1998), pp. 1515–1518.
- [72] Philip F. Solter e Val R. Beasley. «Chapter 38 Phycotoxins». In: Haschek and Rousseaux's Handbook of Toxicologic Pathology (Third Edition). A cura di Wanda M. Haschek, Colin G. Rousseaux e Matthew A. Wallig. Third Edition. Boston: Academic Press, 2013, pp. 1155–1186.
- [73] Emiko Ito e Hiroshi Nagai. «Morphological observations of diarrhea in mice caused by aplysiatoxin, the causative agent of the red alga Gracilaria coronopifolia poisoning in Hawaii». In: *Toxicon* 36.12 (1998), pp. 1913–1920.
- [74] Emiko Ito, Masayuki Satake e Takeshi Yasumoto. «Pathological effects of lyngbyatoxin A upon mice». In: *Toxicon* 40.5 (2002), pp. 551–556.
- [75] Hirota Fujiki, Masami Mori, Michie Nakayasu, Masaaki Terada, Takashi Sugimura e Richard E Moore. «Indole alkaloids: dihydroteleocidin B, teleocidin, and lyngbyatoxin A as members of a new class of tumor promoters». In: *Proceedings* of the National Academy of Sciences 78.6 (1981), pp. 3872–3876.
- [76] Prasannavenkatesh Durai, Maria Batool e Sangdun Choi. «Structure and effects of cyanobacterial lipopolysaccharides». In: *Marine drugs* 13.7 (2015), pp. 4217– 4230.

- [77] Didier Heumann, Michel Pierre Glauser e Thierry Calandra. «The generation of inflammatory responses». In: *Molecular medical microbiology*. Elsevier, 2002, pp. 687–727.
- [78] G Weise, G Drews, B Jann e K Jann. «Identification and analysis of a lipopolysaccharide in cell walls of the blue-green alga Anacystis nidulans». In: Archiv für Mikrobiologie 71.1 (1970), pp. 89–98.
- [79] Asha Jaja-Chimedza, Miroslav Gantar, Gregory D Mayer, Patrick DL Gibbs e John P Berry. «Effects of cyanobacterial lipopolysaccharides from microcystis on glutathione-based detoxification pathways in the zebrafish (Danio rerio) embryo». In: *Toxins* 4.6 (2012), pp. 390–404.
- [80] Aloysio da S Ferrão-Filho e Betina Kozlowsky-Suzuki. «Cyanotoxins: bioaccumulation and effects on aquatic animals». In: Marine drugs 9.12 (2011), pp. 2729–2772.
- [81] Giovanni Coppini e Nadia Pinardi. «THE EUROPEAN ENVIRONMENT STA-TE AND OUTLOOK 2010 MARINE AND COASTAL ENVIRONMENT». In: (2010).
- [82] Stéphan Jacquet, Jean-François Briand, Christophe Leboulanger, Carol Avois-Jacquet, Laura Oberhaus, Bruno Tassin, Brigitte Vinçon-Leite, Gérard Paolini, Jean-Claude Druart, Orlane Anneville e Jean-François Humbert. «The proliferation of the toxic cyanobacterium Planktothrix rubescens following restoration of the largest natural French lake (Lac du Bourget)». In: *Harmful Algae* 4.4 (2005), pp. 651–672.

- [83] Sylvia Bonilla, Luis Aubriot, Maria Carolina S. Soares, Mauricio González-Piana, Amelia Fabre, Vera L.M. Huszar, Miquel Lürling, Dermot Antoniades, Judit Padisák e Carla Kruk. «What drives the distribution of the bloom-forming cyanobacteria Planktothrix agardhii and Cylindrospermopsis raciborskii?» In: *FEMS Microbiology Ecology* 79.3 (mar. 2012), pp. 594–607.
- [84] Bernhard Ernst, Stefan J Hoeger, Evelyn O'Brien e Daniel R Dietrich. «Abundance and toxicity of Planktothrix rubescens in the pre-alpine Lake Ammersee, Germany». In: *Harmful Algae* 8.2 (2009), pp. 329–342.
- [85] Yao Xu, Zhongxing Wu, Boshi Yu, Xin Peng, Gongliang Yu, Zhihong Wei, Guoxiang Wang e Renhui Li. «Non-microcystin producing Microcystis wesenbergii (Komárek) Komárek (Cyanobacteria) representing a main waterbloom-forming species in Chinese waters». In: *Environmental Pollution* 156.1 (2008), pp. 162– 167.
- [86] Pham Thanh Luu. «Toxicity of non-microcystin producing Microcystis wesenbergii isolated from the Tri An reservoir». In: Vietnam Journal of Science, Technology and Engineering 61.4 (2019), pp. 70–75.
- [87] Madline Kniebusch, HE Markus Meier e Hagen Radtke. «Changing salinity gradients in the Baltic Sea as a consequence of altered freshwater budgets». In: *Geophysical Research Letters* 46.16 (2019), pp. 9739–9747.
- [88] E Funari, M Manganelli e E Testai. «Cianobatteri: linee guida per la gestione delle fioriture nelle acque di balneazione». In: Rapporti ISTISAN. Istituto Superiore di Sanita, Rome 254 (2014).

- [89] Valentina Messineo, Sara Bogialli, Serena Melchiorre, Nicola Sechi, Antonella Lugliè, Paola Casiddu, Maria Antonietta Mariani, Bachisio Mario Padedda, Antonio Di Corcia, Roberto Mazza, Ermanno Carloni e Milena Bruno. «Cyanobacterial toxins in Italian freshwaters». In: *Limnologica* 39.2 (2009), pp. 95– 106.
- [90] Elena Legnani, Diego Copetti, Alessandro Oggioni, Gianni Tartari, Maria Teresa Palumbo e Giuseppe Morabito. «Planktothrix rubescens' seasonal dynamics and vertical distribution in Lake Pusiano (North Italy)». In: Journal of Limnology 64.1 (2005), pp. 61–73.
- [91] ARPA Piemonte. Qualità delle acque di balneazione dei Laghi Piemontesi–Stagione balneare anno 2012. 2012.
- [92] E Funari, M Manganelli, S Scardala, M Stefanelli, F Palazzo, E Testai, S Gemma
 e S Vichi. Indagine per approfondire gli aspetti sanitari associati alle fioriture
 di Planktothrix rubescens nel Lago di Vico. Relazione finale. 2011.
- [93] Çağrı Akyol, E Gozde Ozbayram, Stefano Accoroni, Serena Radini, Anna Laura Eusebi, Stefania Gorbi, Carla Vignaroli, Simone Bacchiocchi, Debora Campacci, Fabiola Gigli et al. «Monitoring of cyanobacterial blooms and assessing polymerenhanced microfiltration and ultrafiltration for microcystin removal in an Italian drinking water treatment plant». In: *Environmental Pollution* (2021), p. 117535.
- [94] Sara Bogialli, Federica Nigro di Gregorio, Luca Lucentini, Emanuele Ferretti, Massimo Ottaviani, Nicola Ungaro, Pier Paolo Abis e Matteo Cannarozzi de Grazia. «Management of a toxic cyanobacterium bloom (Planktothrix rube-

scens) affecting an Italian drinking water basin: a case study». In: *Environmen*tal science and technology 47.1 (2013), pp. 574–583.

- [95] De Pace Rita, Vita Valeria, Bucci Maria Silvia, Gallo Pasquale e Bruno Milena. «Microcystin contamination in sea mussel farms from the italian southern adriatic coast following cyanobacterial blooms in an artificial reservoir». In: Journal of Ecosystems 2014 (2014).
- [96] Kirsten Heimann e Samuel Cirés. «Chapter 33 N2-Fixing Cyanobacteria: Ecology and Biotechnological Applications». In: *Handbook of Marine Microalgae*. A cura di Se-Kwon Kim. Boston: Academic Press, 2015, pp. 501–515.
- [97] SP Hawser, GA Codd, DG Capone e EJ Carpenter. «A neurotoxic factor associated with the bloom-forming cyanobacterium Trichodesmium.» In: *Toxicon:* official journal of the International Society on Toxinology 29.3 (1991), pp. 277– 278.
- [98] Catarina Churro, Joana Azevedo, Vitor Vasconcelos e Alexandra Silva. «Detection of a Planktothrix agardhii bloom in Portuguese marine coastal waters». In: *Toxins* 9.12 (2017), p. 391.
- [99] Maria P Kalaitzidou, Christina I Nannou, Dimitra A Lambropoulou, Konstantinos V Papageorgiou, Alexandros M Theodoridis, Vangelis K Economou, Ioannis A Giantsis, Panagiotis G Angelidis, Spyridon K Kritas e Evanthia J Petridou. «First report of detection of microcystins in farmed mediterranean mussels Mytilus galloprovincialis in Thermaikos gulf in Greece». In: Journal of Biological Research-Thessaloniki 28.1 (2021), pp. 1–14.

- [100] Elena Baralla, Maria Vittoria Varoni, Tiziana Sedda, Valeria Pasciu, Antonello Floris e Maria Piera Demontis. «Microcystins presence in mussels (M. galloprovincialis) and water of two productive mediterranean's Lagoons (Sardinia, Italy)». In: *BioMed research international* 2017 (2017).
- [101] Julia Vergalli, Céline Bertrand, Andréa Borla, Evelyne Franquet e Stéphanie Fayolle. «Salt tolerance of Planktothrix agardhii (Gomont) Anagnostidis and Komárek (cyanoprokaryota) between freshwater and brackish strains in batch cultures». In: Algological Studies (2016), pp. 3–19.
- [102] Catarina Churro, Joana Azevedo, Vitor Vasconcelos e Alexandra D. Silva. «Detection of a Planktothrix agardhii Bloom in Portuguese Marine Coastal Waters». In: *Toxins* 9 (dic. 2017), p. 391.
- [103] Mario Giordano, Mustafa Kansiz, Philip Heraud, John Beardall, Bayden Wood e Don McNaughton. «Fourier transform infrared spectroscopy as a novel tool to investigate changes in intracellular macromolecular pools in the marine microalga Chaetoceros muellerii (Bacillariophyceae)». In: Journal of Phycology 37.2 (2001), pp. 271–279.
- [104] Norman B. Colthup. «Infrared Spectroscopy». In: Encyclopedia of Physical Science and Technology (Third Edition). A cura di Robert A. Meyers. Third Edition. New York: Academic Press, 2003, pp. 793–816.
- [105] Alberto Domenighini e Mario Giordano. «Fourier transform infrared spectroscopy of microalgae as a novel tool for biodiversity studies, species identification,

and the assessment of water quality 1». In: Journal of phycology 45.2 (2009), pp. 522–531.

- [106] Matthew D Rolfe, Christopher J Rice, Sacha Lucchini, Carmen Pin, Arthur Thompson, Andrew DS Cameron, Mark Alston, Michael F Stringer, Roy P Betts, József Baranyi et al. «Lag phase is a distinct growth phase that prepares bacteria for exponential growth and involves transient metal accumulation». In: Journal of bacteriology 194.3 (2012), pp. 686–701.
- [107] Jonna Engström-Öst, Sari Repka e Mirva Mikkonen. «Interactions between plankton and cyanobacterium Anabaena with focus on salinity, growth and toxin production». In: *Harmful Algae* 10.5 (2011), pp. 530–535.
- [108] Barry H Rosen, Keith A Loftin, Jennifer L Graham, Katherine N Stahlhut, James M Riley, Brett D Johnston e Sarena Senegal. Understanding the effect of salinity tolerance on cyanobacteria associated with a harmful algal bloom in Lake Okeechobee, Florida. 2018-5092. US Geological Survey, 2018.
- [109] Jaana Lehtimaki, Pia Moisander, Kaarina Sivonen e Kaisa Kononen. «Growth, nitrogen fixation, and nodularin production by two Baltic Sea cyanobacteria».
 In: Applied and environmental microbiology 63.5 (1997), pp. 1647–1656.
- [110] Wei-Dong Lu, Zhen-Ming Chi e Chuan-Dong Su. «Identification of glycine betaine as compatible solute in Synechococcus sp. WH8102 and characterization of its N-methyltransferase genes involved in betaine synthesis». In: Archives of microbiology 186.6 (2006), pp. 495–506.

- [111] BR Rudolph, I Chandrasekhar, BP Gaber e M Nagumo. «Molecular modelling of saccharide-lipid interactions». In: *Chemistry and physics of lipids* 53.2-3 (1990), pp. 243–261.
- [112] Suleyman I Allakhverdiev, Mikio Kinoshita, Masami Inaba, Iwane Suzuki e Norio Murata. «Unsaturated fatty acids in membrane lipids protect the photosynthetic machinery against salt-induced damage in Synechococcus». In: *Plant physiology* 125.4 (2001), pp. 1842–1853.
- [113] Suresh C Singh, Rajeshwar P Sinha e Donat-P Hader. «Role of lipids and fatty acids in stress tolerance in cyanobacteria». In: Acta protozoologica 41.4 (2002), pp. 297–308.

Elenco delle figure

1.1	Membrane di A) Phormidium uncinatum e B) Escherichia coli a
	confronto. CM, membrana citoplasmatica; EL, S-layer; OM, membrana
	esterna; P, peptidoglicano (Egbert Hoiczyk, 2000)
1.2	Struttura dei ficobilisomi; PE, ficoeritrina; PC, ficocianina; AP,
	alloficocianina (Lea Vernès, 2015).
1.3	Meccanismo di funzionamento delle vescicole gassose: quando si
	trovano in condizioni di scarsa luminosità le vescicole permettono al
	cianobatterio di salire in superficie. Qui, la maggior quantità di luce
	assorbita permette una maggior produzione di soluti e molecole ad alta
	densità che collasseranno le vescicole causando l'affondamento (Graham,
	2000)

1.4Reazione di Mehler: glicerolo viene scomposto dalle reazioni di glicolisicon rilascio di ioni H^+ che riducono le molecole di O_2 derivanti dallareazione fotosintetica, creando un ambiente privo di ossigeno (Lee, 2008).18

1.5 Cianotossine e rispettive specie produttrici (Lucentini e Ottavia	ani, 2011)	20
1.6 Struttura chimica delle 3 forme più comuni di microcistine (Luc	centini e	
Ottaviani, 2011).		21
1.7 Struttura chimica della nodularina (Lucentini e Ottaviani, 2011	[]	22
1.8 Struttura chimica della cilindrospermopsina (Chorus e Welker,	2021) .	23
1.9 Struttura chimica anatossina-a e omoanatossina-a (Lucentini	е	
Ottaviani, 2011)		24
1.10 Struttura chimica dell'anatossina-a(s)		25
1.11Struttura basale delle tossine PSP (Lucentini e Ottaviani, 2011)	25
1.12 Meccanismo d'azione delle STX e delle NEO (Valèrio, 2010).		26
1.13Struttura chimica dell'aplysiatossina (Funari e Testai, 2008).		27
1.14 Struttura molecolare del lipopolis accaride (Maeshima, 2013).		29
1.15 Andamento della popolazione di $P. \ rubescens$ nel lago di Casti	reccioni	
durante il periodo 2014-2019 (Akyol et al., 2021).		37
1.16 Distribuzione dei bloom di <i>Planktothrix spp.</i> in laghi e bacini	italiani	
tra il 1992 e il 2009 (Lucentini e Ottaviani, 2011)		39
2.1 Filamenti di <i>P. rubescens</i> a microscopio ottico diretto, ingrand	limento	
40x.		45

2.2	Cuvette per spettrofotometria.	48
2.3	Camera per conta cellulare.	49
2.4	Spettri di assorbimento: ogni curva di diverso colore rappresenta un	
	diverso campione analizzato.	55
2.5	Derivata seconda: in figura sono evidenti i picchi negativi che si trovano	
	al di sotto dello zero.	56
2.6	Curve fit: le curve a campana di colore verde sono state posizionate in	
	base ai picchi negativi osservati nella derivata seconda.	57
3.1	Andamento di <i>P. rubescens</i> con OD 650 coltivato alle diverse salinità.	59
3.2	Andamento delle densità ottiche (OD750) di <i>P. rubescens</i> coltivato alle	
	diverse salinità.	60
3.3	Andamento delle abbondanze cellulari di <i>P. rubescens</i> coltivato alle	
	diverse salinità.	61
3.4	Concentrazione di MC totali presenti nel pellet (sinistra) e nel terreno	
	di coltura (destra) alle varie salinità.	63
3.5	Concentrazione di ficocianina a diverse salinità.	65
3.6	Concentrazione di alloficocianina alle diverse salinità.	65
3.7	Concentrazione di ficoeritrina alle diverse salinità.	66

3.8	Concentrazione di clorofilla alle diverse salinità.	67
3.9	Rapporti di abbondanza molecolare tra proteine e carboidrati alle varie	
	salinità.	68
3.10	Rapporti di abbondanza molecolari tra proteine e lipidi alle varie salinità.	69
3.11	Rapporti di abbondanza molecolari tra lipidi e carboidrati alle varie	
	salinità.	70
4.1	Osmoliti e loro costo energetico: nel nostro caso, saccarosio e trealosio	
	sono quelli che presentano un costo maggiore in termini energetici,	
	mentre glicina betaina e glicerolo sono quelli più energicamente econo-	
	mici, rispettivamente di 81 e 30 ATP equivalenti contro i 109 dei due	
	disaccaridi.	77