

## **A7. SITUAZIONE NAZIONALE: CORPI IDRICI INTERESSATI DA CIANOBATTERI TOSSICI**

Maura Manganelli (a)\*, Emanuela Viaggiu (b)\*, Rossella Barone (c), Fabio Buzzi (d),  
Francesca Caviglia (e), Roberta Congesti (b), Diego Copetti (f), Roberta De Angelis (g),  
Feliciano Godeas (b), Licia Guzzella (f), Eleonora Masala (h), Luigi Naselli-Flores (c),  
Nico Salmaso (i), Simona Scardala (a)

(a) *Dipartimento di Ambiente e Connessa Prevenzione Primaria, Istituto Superiore di Sanità, Roma*

(b) *Dipartimento Biologia, Università degli Studi di Roma 'Tor Vergata', Roma*

(c) *Dipartimento di Scienze e Tecnologie Biologiche, Chimiche e Farmaceutiche, Università di Palermo, Palermo*

(d) *Dipartimento di Lecco, Agenzia Regionale per la Protezione Ambientale della Lombardia*

(e) *Dipartimento Provinciale del Verbano Cusio Ossola, Agenzia Regionale per la Protezione Ambientale del Piemonte, Verbania*

(f) *Istituto di Ricerca Sulle Acque, Consiglio Nazionale delle Ricerche, Brugherio (MB)*

(g) *Dipartimento tutela delle acque interne e marine, Istituto Superiore per la Protezione e la Ricerca Ambientale, Roma*

(h) *Laboratorio di Prevenzione dell'Azienda Sanitaria Locale della provincia di Lecco, Oggiono (LC)*

(i) *Centro Ricerca ed Innovazione, Fondazione Edmund Mach, San Michele all'Adige (TN)*

\**maura.manganelli@iss.it; emanuela.viaggiu@uniroma2.it*

Nel primo paragrafo di questo capitolo vengono riportati alcuni dati relativi alle fioriture di cianobatteri nei bacini italiani, utili per avere un quadro aggiornato della situazione nazionale e per evidenziare eventuali criticità e/o attività di studio o gestione da intraprendere. Sono stati utilizzati sia dati relativi al monitoraggio per la balneazione, pubblicati sui siti web delle varie agenzie regionali, o forniti direttamente da alcuni coautori, sia dati pubblicati nella letteratura scientifica, per evidenziare trend temporali e, a titolo meramente esemplificativo, descrivere situazioni molto complesse e dinamiche nel tempo.

Nel secondo paragrafo, per le sole specie responsabili della maggior parte delle fioriture in Italia, sono riportate le informazioni sulle basi genetiche e sui fattori ambientali (ove disponibili) che determinano la produzione di tossine. Tali informazioni dovrebbero essere di supporto per avviare eventuali programmi di monitoraggio specifici.

Nel terzo paragrafo, infine, viene descritta la distribuzione dei cianobatteri tossici negli altri continenti, per individuare eventuali similitudini o differenze fra ciò che è presente nel nostro territorio e il resto del mondo.

### **A7.1. Distribuzione di cianobatteri nei bacini italiani: frequenza, abbondanza e produzione di tossine**

La maggior parte dei bacini italiani è interessata dalla presenza di diverse specie di cianobatteri.

La disponibilità di dati sulla presenza dei cianobatteri in Italia è legata alle attività di monitoraggio svolte dalle Regioni, previste dal DM 30 marzo 2010 (Ministero della Salute, 2010) e dal DL.vo 152/2006 e s.m.i in attuazione della Direttiva 2000/60/CE in materia delle acque (Italia, 2006; Europa, 2000).

### A7.1.1. Area settentrionale

La diffusione dei cianobatteri planctonici è favorita da condizioni idrologiche stabili, limitata turbolenza della colonna d'acqua e temperature elevate (eccetto la specie *Planktothrix rubescens* che prolifera anche a temperature basse, fra i 9 e i 14°C). Per questo, nelle zone alpine e subalpine le fioriture di cianobatteri riguardano soprattutto i laghi naturali, e molto meno i bacini idroelettrici artificiali, caratterizzati da temperature minori, maggiore turbolenza ed elevato ricambio idrico (vedi capitolo A1).

La specie più diffusa, in termini di numero di bacini interessati e di abbondanza cellulare, è *P. rubescens*. Nei grandi laghi profondi sudalpini oligotrofi od oligo-mesotrofi (es. Lago Maggiore e Garda) questa specie è raramente in grado di dare luogo a fioriture visibili ad occhio nudo. Nel Lago Maggiore addensamenti superficiali furono rilevati attorno agli anni '60 del secolo scorso in coincidenza con il peggioramento delle condizioni trofiche del lago (Ravera & Vollenveider, 1968), ma i successivi interventi di risanamento, iniziati negli anni '80, hanno prodotto importanti risultati positivi. L'assenza di fioriture visibili nei laghi profondi oligotrofici è dovuta sia alle minori densità di popolazione (con picchi stagionali tra 0 e 20 m generalmente inferiori a 10.000 cell/mL), sia alla forte diluizione operata dai processi di mescolamento profondo durante l'inverno (generalmente > 100 m). Alle limitate biomasse di *P. rubescens*, tipiche di questi ambienti, corrispondono anche limitate concentrazioni di microcistine (MC)\*, generalmente presenti, nello strato tra 0 e 20 m, con valori inferiori a 1 µg/L e maggiormente rappresentate dai congeneri demetil-MC-RR seguiti da concentrazioni inferiori di MC-LR, demetil-MC-LR e MC-YR (Cerasino & Salmaso, 2012; Salmaso *et al.*, 2013). Al contrario, intense fioriture sono state rilevate nel corso degli ultimi 15 anni nel Lago d'Iseo e in laghi di medie dimensioni, come Pusiano e Ledro, caratterizzati da condizioni di meso-eutrofia (Garibaldi *et al.*, 2000; Legnani *et al.*, 2005; Mosello *et al.*, 2010; Carraro *et al.*, 2012).

Nel lago di Pusiano (Lecco) che, nonostante i programmi di risanamento avviati a partire da metà degli anni '80 con conseguente riduzione di nutrienti, si colloca ancora in uno stato di eutrofia, *P. rubescens* provoca spesso fioriture nel periodo tardo autunnale-invernale, che persistono per alcune settimane e che interessano una buona porzione della colonna d'acqua. I dati prodotti dall'Agenzia Regionale per la Protezione Ambientale (ARPA) della Lombardia evidenziano che i valori massimi di densità cellulare si sono avuti nel 2005-2006 in coincidenza con una concentrazione di microcistine >1 µg/L (test ELISA, *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*). Più recentemente valori elevati di MC sono stati misurati (HPLC-DAD, *High Performance Liquid Chromatography-Diode array detector*) nell'autunno 2011 dall'IRSA-CNR (Istituto di Ricerca sulle Acque-Consiglio Nazionale delle Ricerche), quando le concentrazioni medie di MC nello strato superficiale (1-5 m) sono risultate prossime a 5 µg/L (Copetti, com. pers.). Nel Lago di Piano (Como), dove è costantemente presente, *P. rubescens* ha prodotto nel 2008 MC anche a densità cellulari contenute ( $10^5$  cell/L); nel campione integrato dei primi 2 metri di colonna d'acqua è stata rilevata una concentrazione totale di 2,5 µg/L di MC-LR (Volante *et al.*, 2008). In questo piccolo lago densità cellulari molto vicine a quelle delle tipiche fioriture si raggiungono nel periodo tardo autunnale e primaverile.

Nel Lago meso-eutrofico d'Idro è stata osservata una fioritura di *P. rubescens* nel 2004, con formazione di striature di colore rossastro su tutta la superficie del corpo idrico nel periodo invernale e in primavera. Le densità rilevate in superficie sono state nell'ordine di  $10^7$  cell/L. Nel 2009 è stata misurata la concentrazione di MC e circa il 90% di MC tot (0,015 µg/L) era

---

\* Questa classe di tossine comprende numerose varianti, caratterizzate dalla presenza di due amminoacidi diversi, indicati da due lettere dopo MC- (MC-LR, MC-RR, ecc.). Per maggiori dettagli sulle caratteristiche chimico-tossicologiche, vedi i capitoli A2 e C3.

rappresentato da demetil-MC-RR (Cerasino & Salmaso, 2012), generalmente associata a *P. rubescens* (Barco *et al.*, 2004; Manganelli *et al.*, 2010).

Se *P. rubescens* è la specie più diffusa, quella che provoca i maggiori inconvenienti per la balneazione e l'uso ricreativo delle acque è *Dolichospermum lemmermannii*. Nei grandi laghi a sud delle Alpi *D. lemmermannii* fu segnalata per la prima volta nell'ottobre 1990 sotto forma di estese fioriture al largo della costa sud-orientale del Lago di Garda (Salmaso *et al.*, 1994). Successivamente, e seguendo un gradiente altitudinale, questa specie ha colonizzato i Laghi d'Iseo (1997), Maggiore (2005), Como (2006) e anche laghi di medie dimensioni, come Pusiano (2006) (Mosello *et al.*, 2010; Salmaso *et al.*, 2012). Attualmente, questa specie rappresenta una delle principali cause di degrado della qualità delle acque superficiali nei laghi profondi sudalpini nei mesi estivi, nel pieno cioè della stagione balneare e turistica.

Nel corso del primo episodio di bloom di *D. lemmermannii* del 2006 nel Lago di Como (o Lario), la parte più meridionale del ramo occidentale è stata esclusa da questo fenomeno ed era dominata da *Microcystis aeruginosa*, negli strati superficiali, e da *P. rubescens* in prossimità del metalimnio. Gli eventi accaduti in questo lago rappresentano un buon esempio di come la comunità fitoplanctonica sia soggetta a cambiamenti significativi durante gli anni. In effetti, all'inizio degli anni 2000 *M. aeruginosa* è stata la responsabile di due estese fioriture (2000 e 2003). Nell'anno 2000 gli aggregati delle colonie erano delle dimensioni di circa 1 cm, le densità cellulari superficiali erano dell'ordine di  $10^8$  cell/L e il fenomeno è durato circa 15 giorni; i test di tossicità aspecifici effettuati in questo caso con *Daphnia magna*, *Vibrio fischeri* e *Oryza sativa* non avevano dato un esito positivo. Inoltre, contestualmente alla presenza di *M. aeruginosa* in superficie, sono state individuate nella zona metalimnetica densità cellulari di *P. rubescens* di  $10^7$  cell/L. Nell'anno 2003 la fioritura è stata più estesa ed ha interessato tutti e tre i sottobacini. Le densità anche in questo caso sono state dell'ordine di grandezza di  $10^8$  cell/L e nella località di Colico Piona è stata rilevata una concentrazione di MC di 1,3 µg/L (test ELISA). A partire dal 2006 sono cominciate le fioriture di *D. lemmermannii*, che hanno interessato tratti molto estesi della costa, con durate medie per ciascun evento di 15 giorni. L'estensione spaziale delle fioriture è stata progressiva: a luglio 2010 la fioritura ha interessato solo alcune zone del ramo lecchese con il punto di maggior accumulo localizzato nel tratto tra Bellano e Abbadia lariana; nel Luglio 2011 la fioritura si è sviluppata sia nel ramo lecchese che in quello comasco, e anche in questo caso il tratto di costa con il maggior accumulo è stato quello compreso tra Bellano e Abbadia. Nel luglio 2012 un altro bloom ha interessato il ramo orientale e il bacino settentrionale del Lario con densità di  $10^8$  cell/L e la presenza di anatossina (ATX-a) intracellulare in concentrazione pari a 3,2 µg/L; infine nel mese di luglio 2013 la fioritura ha interessato tutto il lago con densità cellulari superiori a  $10^8$  cell/L.

Un altro lago interessato da fioriture di *D. lemmermannii* è il Lago Maggiore, dove, durante una fioritura verificatasi nel 2005, nella parte lombarda del lago, sono state rilevate MC ad una concentrazione  $>1$  µg/L (test ELISA). La situazione di questo lago è comunque in netto miglioramento, almeno per quanto riguarda il lato piemontese. In questa zona, infatti, *D. lemmermannii* è diminuita significativamente dal 2005 (anno in cui la fioritura ha raggiunto densità di  $\sim 2 \times 10^9$  cell/L) al 2009 ( $\sim 6 \times 10^5$  cell/L). Dopo un nuovo picco nel 2010 ( $\sim 1 \times 10^8$  cell/L) si è attestata nuovamente a densità basse nel biennio 2011-2012 ( $\sim 2-3 \times 10^5$  cell/L). Altre specie di cianobatteri tossici, *Dolichospermum planctonicum* e *Pseudanabaena* sp., sono state trovate nel mese di agosto 2012 con densità estremamente basse ( $5,4 \times 10^4$  e  $1 \times 10^4$  cell/L, rispettivamente) solo nel comune di Stresa (Lido Carciano) (ARPA Piemonte, 2012).

Altri esempi dei problemi causati da *D. lemmermannii* sono quelli relativi alle fioriture documentate nel luglio-agosto 2006 e nel luglio 2010 nel Lago di Pusiano. L'elevata densità cellulare, nell'ordine di  $10^8$  cell/L, ha comportato una sensibile alterazione della colorazione

dell'acqua fino ad oltre 10 m dalla riva. La fioritura si è protratta per oltre 3 settimane e sulla costa si sono depositati ampi strati di schiume maleodoranti molto probabilmente a seguito della lisi cellulare e del conseguente rilascio della frazione intracellulare di geosmina. Nelle ore più ventose della giornata l'odore acre, simile a quello di muffa, si è diffuso fino a circa 1 km dalla zona della fioritura.

Altre fioriture di specie tossiche sono state segnalate nel lago di Annone ovest, un piccolo lago eutrofico della Brianza lecchese. Dal 2004 ad oggi si sono verificate fioriture massicce di *Woronichinia naegeliana*, generalmente nel periodo tardo autunnale, anche se la più significativa è quella riscontrata nel mese di agosto 2004 con densità pari a  $10^8$  cell/L. La ricerca delle tossine, dapprima effettuata con metodo immunoenzimatico e successivamente mediante analisi con HPLC ha dato sempre esito negativo. Nel 2009 si è verificata una fioritura di *Raphidiopsis mediterranea* con valori di densità molto elevati di  $5 \times 10^8$  cell/L, mentre la densità di *Woronichinia* è rimasta molto bassa, e in un campione concentrato con retino è stata trovata una concentrazione di ATX-a pari a  $10 \mu\text{g/L}$ .

Una situazione interessante, da segnalare, è quella del lago di Annone est, un altro piccolo lago della Brianza che riceve le acque dal lago Annone ovest. Diversamente dal suo affluente, qui sono state segnalate imponenti fioriture di *Aphanizomenon flos-aquae* ad agosto 2004 e 2009. La densità cellulare raggiunta è stata dell'ordine di  $10^8$  cell/L nei primi 5 metri della colonna d'acqua. Nel campione concentrato mediante retino, raccolto nel 2009 nei primi 2 metri della colonna d'acqua, la densità cellulare era superiore a  $10^8$  cell/L e la concentrazione di ATX-a era  $290 \mu\text{g/L}$ .

Nel lago di Sartirana, piccolo lago polimittico eutrofico, nel mese di marzo 2007 *Limnothrix redekei* ha raggiunto valori di densità pari a  $6,5 \times 10^5$  cell/L. In altri momenti sono state riscontrate densità cellulari elevate di *Cylindrospermopsis raciborskii* e *R. mediterranea*, che date le condizioni di trofia e la tipologia del lago potrebbero dare luogo a delle vere e proprie fioriture, anche se non si hanno informazioni relative alla loro tossicità.

Nel lago di Castellaro, piccolo lago polimittico ipertrofico, *C. raciborskii* ha dato luogo a due fioriture nel mese di settembre degli anni 2010 e 2012 con valori di densità cellulare dell'ordine di  $10^8$  cell/L, nuovamente senza informazioni sulla tossicità.

Nella stagione 2012, dai dati forniti dalla sezione della Regione Piemonte che svolge i controlli per la balneazione, il lago Viverone è stato interessato a giugno da fioriture fitoplanctoniche di durata molto limitata, con densità fra  $75$  e  $90 \times 10^6$  cell/L in cui i generi *Aphanizomenon* e *Anabaena* erano dominanti. A distanza di pochi giorni, la concentrazione cianobatterica era già scesa a  $20 \times 10^6$  cell/L rendendo non necessaria la valutazione della eventuale presenza di MC. Da quel momento fino alla fine della stagione nel mese di settembre, non si sono più presentati episodi di fioriture significative, anche se i cianobatteri sono sempre stati presenti, in concentrazioni molto basse.

Nel lago di Candia, invece, abbondanze cianobatteriche molto elevate, con picchi di  $2 \times 10^7$  cell/L a maggio e valori oltre  $10^7$  cell/L a luglio si sono mantenuti per tutta la stagione balneare. Le fioriture erano sempre sostenute da popolazioni miste di vari generi di cianobatteri, passando da una dominanza di *Microcystis* spp. ad una di *Gomphosphaeria/Snowella* spp. Non sono disponibili dati sulla tossicità di queste fioriture (ARPA Piemonte, 2012).

Durante la stagione balneare 2010, nel piccolo lago di Santa Maria (comuni di Revine Lago e Tarzo, provincia di Treviso) sono stati riscontrati i seguenti due episodi di fioritura algale di cui si riportano le specie dominanti: *Aphanizomenon gracile* ( $11 \times 10^6$  cell/L) e *D. planctonicum* ( $5,6 \times 10^6$  cell/L). Durante la stagione balneare 2011, gli episodi di fioritura sono stati tre con *Merismopedia tenuissima* ( $51,3 \times 10^6$  cell/L giugno;  $18,2 \times 10^6$  cell/L settembre) e *D. planctonicum* ( $11,1 \times 10^6$  cell/L luglio) (ARPA Veneto, 2014).

## A7.1.2. Area centrale

### A7.1.2.1. Laghi vulcanici

I laghi di origine vulcanica sono quasi tutti localizzati nel Lazio (laghi di Bolsena, Vico, Bracciano, Albano, Nemi, Monterosi, Martignano, Mezzano), oltre ai laghi di Monticchio, in Basilicata e al lago di Averno in Campania.

Nel Lazio, il lago di Vico e il lago di Albano sono stati più recentemente interessati da fioriture di cianobatteri; le ultime informazioni sul lago di Nemi risalgono ad uno studio del 2002-2003, che pur rilevando la presenza di diverse specie di cianobatteri, constatava un miglioramento rispetto alla situazione rilevata negli anni '80 (Margaritora *et al.*, 2005). Per gli altri laghi, che pure potrebbero sostenere fioriture (trasparenza <1 m e/o concentrazioni di fosforo totale, *Total Phosphorus*, TP, >20 µg/L) non esistono al momento segnalazioni in tal senso (Regione Lazio, 2014).

Il lago di Vico, un lago meso-eutrofico, con una profondità massima di 50 m, è interessato da fioriture di *P. rubescens*. Nei periodi 2005-2007 e 2009-2010 si è verificato un aumento significativo delle densità cellulari, quando il massimo metalimnetico estivo e quello superficiale invernale hanno raggiunto valori di 10<sup>8</sup> cell/L (Capelli *et al.*, 2007; Funari *et al.*, 2011). Le concentrazioni di MC, in prevalenza (>90%) dementi-MC-RR, rilevate mensilmente nel 2009-2010, hanno superato il limite di 1 µg/L nel 50% dei campioni, oscillando fra 0,8 e 6 µg/L, con concentrazioni intracellulari fra 0,01 e 0,43 pg/cell (Funari *et al.*, 2011). La frazione di cellule con il gene *mcyB* per la produzione di microcistine, rispetto a quelle che ne sono prive, è significativamente diminuita nel 2010, ma non la concentrazione di MC. Inoltre, è da notare che nel periodo di mescolamento totale delle acque (in inverno) la frazione di cellule tossiche tendeva ad essere maggiore in profondità piuttosto che in superficie (Funari *et al.*, 2011).

Nel lago di Albano, eutrofico, con una profondità massima di 170 m, sono state osservate più specie di cianobatteri, dominanti in stagioni e anni diversi. In uno studio condotto fra novembre 2003 e novembre 2007 *C. raciborskii* è stata la specie dominante solo in un mese, luglio 2004, per poi essere sostituita, sempre nei periodi estivi-autunnali, da *Chrysochloris ovalisporum* (ex *Aphanizomenon ovalisporum*), e ricomparire sporadicamente a densità molto inferiori (Messineo *et al.*, 2010). È stata rilevata la presenza di cilindrospermopsina (CYN) in concomitanza di entrambe le specie, con concentrazione intracellulare in *C. raciborskii* di 0,003 pg/cell rispetto ai 0,13 pg/cell in *C. ovalisporum* (Messineo *et al.*, 2010). Anche *P. rubescens* è stata osservata nel lago Albano in modo significativo, dominante in superficie nei mesi invernali e a livello del metalimnio durante i periodi più caldi, in coincidenza della stratificazione termica (Messineo *et al.*, 2006; Ellwood *et al.*, 2009). Fra il 2001 e il 2005 sono sempre state rilevate MC in presenza di *P. rubescens*, con un massimo di 14,2 µg/L a -15 m a luglio 2004 e con concentrazioni intracellulari in schiume superficiali fino a 1,5 pg/cell (Messineo *et al.*, 2006).

Un problema emergente riguarda anche la presenza di specie bentoniche lungo i litorali lacustri e fluviali. Nel perifiton colonizzante le pietre (epilite) del litorale del lago di Albano sono stati riscontrati cianobatteri appartenenti ai generi *Anabaena*, *Aphanothece*, *Calothrix*, *Cylindrospermum*, *Lyngbya*, *Nostoc*, *Microcoleus*, *Phormidium*, *Pseudanabaena* e *Synechocystis* (Godeas, 2012). Le analisi – eseguite mediante spettrometria di massa MALDI-TOF (*Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight*) su campioni di epilite prelevati in quattro stagioni diverse (da estate 2009 a primavera 2010) – non hanno rilevato la presenza di cianopeptidi, anche se è noto in letteratura che molte di queste specie bentoniche possono produrre cianotossine (CTX) e sostanze di rilevanza sanitaria (Mez *et al.*, 1997; Mez *et al.*, 1998; Baker *et al.*, 2001; Oudra *et al.*, 2002; Quesada *et al.*, 2004; Dasey *et al.*, 2005;

Gugger *et al.*, 2005; Surakka *et al.*, 2005; Lopes *et al.*, 2010; Manganelli *et al.*, 2012; Quiblier *et al.*, 2013).

Il lago di Averno, nel complesso dei Campi Flegrei (Napoli), ha una profondità massima di 35 m. In questo lago si sono verificate fioriture di *P. rubescens* in marzo-giugno 2007 e *Microcystis* spp. in ottobre-novembre 2008 (Ferranti *et al.*, 2008; Gallo *et al.*, 2009). Durante le fioriture di *P. rubescens* (non ci sono dati sulle densità raggiunte) sono state caratterizzate due nuove forme di anabenoeptine (B e F) e una nuova variante di MC-RR (Ferranti *et al.*, 2008; Ferranti *et al.*, 2009), mentre durante le fioriture di *Microcystis* (anche in questo caso non ci sono informazioni sulla densità del bloom) è stata trovata CYN, sia in acqua (0,54 e 1,8  $\mu\text{g/L}$ ) che negli estratti di cianobatteri (334 ng/g peso fresco) (Gallo *et al.*, 2009). Gli autori suppongono che la CYN sia stata prodotta da *Aphanizomenon*, presente a densità troppo basse rispetto a *Microcystis*, e per questo non osservata nei campioni analizzati.

#### A7.1.2.2. Laghi artificiali

Nelle Marche ci sono diversi invasi artificiali, il cui utilizzo va da quello irriguo a quello di tipo potabile e ricreativo. Essi sono interessati da fioriture di *P. rubescens*, nonostante siano caratterizzati generalmente da una condizione di oligotrofia. Dati sul lago di Gerosa risalenti al 2006 hanno mostrato una dinamica annuale di *P. rubescens* simile ad altri laghi profondi, con densità cellulari inferiori a quelle riportate per i laghi più eutrofici, con un massimo superficiale invernale di circa  $6 \times 10^7$  cell/L e una popolazione costante metalimnetica di circa  $10^7$  cell/L. Durante la fioritura invernale si sono avuti comunque fenomeni di formazione di schiume superficiali. È stato suggerito che le fioriture siano state possibili, nonostante concentrazioni di azoto (N) e fosforo (P) quasi sempre al di sotto del limite di rivelabilità, grazie ad un'intensa attività di riciclo dei batteri (Manganelli *et al.*, 2010). Dal 1998 *P. rubescens* dà origine a fioriture periodiche anche nel Lago Fiastrone e nei bacini ad esso collegati. I dati relativi al 2011 hanno mostrato la presenza di popolazioni durante tutto l'anno, con le stesse dinamiche sopra descritte: elevate densità cellulari in profondità durante il periodo estivo e in superficie durante il periodo invernale. Nel Lago Fiastrone la concentrazione di MC, in superficie, non ha mai superato valori di 0,2  $\mu\text{g/L}$  mentre nel Lago Castreccioni, in due campionamenti di profondità, sono stati raggiunti i 2,5  $\mu\text{g/L}$ . Anche in questi invasi i livelli di fosforo totale e azoto sono tipici di acque oligotrofiche (ARPAM, 2011).

#### A7.1.2.3. Laghi alluvionali

La specie *C. raciborskii*, di origine tropicale e sub-tropicale, da anni risulta essere il cianobatterio dominante nel Lago Trasimeno durante il periodo estivo, a partire da giugno inoltrato, fino alla fine di settembre. Nella stagione balneare 2012, a fronte di una riduzione delle densità medie massime di *C. raciborskii* ( $6 \times 10^7$  cell/L vs  $10^8$  cell/L nel triennio precedente) la specie *Planktothrix agardhii* ha iniziato a proliferare da fine agosto fino a diventare dominante alla fine di settembre, con valori massimi di densità fino a  $6 \times 10^7$  cell/L. Nel triennio precedente, 2009-2011, erano già state osservate delle variazioni nella composizione in specie della comunità di cianobatteri tossici, con la comparsa, seppure sporadica, di specie di *Microcystis* (*Microcystis* cf. *ichthyoblabe*, *Microcystis aeruginosa* e *Microcystis* spp.). Inoltre, *P. agardhii* mostrava una lieve e graduale riduzione dal 2009 al 2011, con densità medie intorno ai  $5-8 \times 10^6$  cell/L (ARPA Umbria, 2012).

CYN sono state rilevate in tracce una sola volta, a settembre 2004 (Manti *et al.*, 2005). Più recentemente, per la prima e unica volta nel mese di settembre 2011, sono state rilevate MC in concentrazioni molto basse (Manganelli, com. pers.). In questo caso la sola specie presente era

*P. agardhii*. Le MC trovate in una sola occasione fanno pensare a possibili variazioni nel rapporto fra genotipi tossici e non tossici delle popolazioni di *P. agardhii*.

Il lago costiero di acqua dolce di Massaciuccoli (Toscana) è interessato dalla presenza di *M. aeruginosa*. Nel 2003 sono stati registrati livelli di MC fino a 160 µg/L in acqua, mentre valori ben più elevati sono stati riscontrati nell'epatopancreas di esemplari appartenenti alla specie *Mugil cephalus* e nella porzione cefalica del gambero di acqua dolce *Procambrus clarkii* (Simoni *et al.*, 2004).

### A7.1.3. Area meridionale e insulare

Proliferazioni metalimnetiche estive di *P. rubescens* nel Lago di Occhito, un invaso artificiale sul confine tra Puglia e Molise, durante la stratificazione termica, sono già state descritte nel capitolo A1. A giugno 2009, densità significative di *P. rubescens* erano rilevate per tutta la lunghezza dell'invaso (circa 13 km) in uno strato fra 7 e 14 m di profondità, al limite della zona eufotica (Copetti *et al.*, 2010). In primavera (aprile 2009), in condizioni di debole stratificazione termica, i dati raccolti sottodiga indicavano valori di densità medi superiori a  $80 \times 10^6$  cell/L, con un picco di circa  $95 \times 10^6$  cell/L situato a 5 m di profondità nell'incipiente termocline e concentrazioni di MC totali pari a 30 µg/L (Copetti *et al.*, 2012; Guzzella *et al.*, 2011). Le densità di *P. rubescens* e i livelli di MC sono diminuiti nel tempo, anche se a tutto il 2011 sono rimasti su valori significativi (densità fra  $20-40 \times 10^6$  cell/L e MC fra 0,5-1 µg/L, test ELISA) (Boglialli *et al.*, 2013).

Nel 2009, a seguito della fuoriuscita di acqua dal bacino a causa di forti piogge, e al suo arrivo al mare, dove sono presenti numerosi impianti di mitilicoltura, è stato avviato un programma di monitoraggio nell'acqua e negli organismi degli impianti, per controllare i livelli eventuali di MC (De Pace *et al.*, 2014). MC sono state rinvenute sia in acqua di mare (fra 0,1 e 0,6 µg/L nei periodi maggio-luglio 2009 e gennaio-giugno 2010) che nei mitili degli impianti (fra ~3 e 60 ng/g, nello stesso periodo) (test ELISA).

#### A7.1.3.1. Isole

Imponenti fioriture superficiali di *P. rubescens* sono state registrate con regolarità nei mesi autunnali e invernali in diversi bacini artificiali siciliani eutrofici a partire dal 2005/2006. In particolare, nel Lago Pozzillo, il maggiore bacino artificiale siciliano, sono stati riscontrati valori di densità superiori a  $50 \times 10^9$  cell/L ( $\approx 5600$  mm<sup>3</sup>/L) alla fine di dicembre 2005 (Naselli-Flores *et al.*, 2007). *P. rubescens* in quel periodo formava una patina galleggiante di colore viola scuro spessa circa 60 cm su gran parte della superficie lacustre. La specie è stata contemporaneamente osservata in altri tre bacini artificiali con dinamiche paragonabili: inizio della crescita al termine della stratificazione estiva, picco tra gennaio e febbraio e termine della fioritura all'inizio del nuovo periodo di stratificazione (fine marzo). Misure effettuate su campioni raccolti al picco della fioritura hanno rivelato la presenza di varianti demetilate di MC-RR (95%), MC-LR (3%) e una variante di MC sconosciuta (2%). La concentrazione totale di MC (calcolata come MC-LR equivalenti, MC-LReq) era di 34 µg/L, corrispondente ad una quota cellulare di MC pari a 6 µg/mm<sup>3</sup>. Le ragioni di queste fioriture superficiali di *P. rubescens* sono probabilmente da ricercare anche in un aumento delle precipitazioni autunnali in linea con quanto predetto da una serie di modelli climatici (Tin, 2006). Le elevate precipitazioni autunnali registrate negli ultimi anni in Sicilia hanno marcato l'inizio della circolazione invernale causando una diminuzione della trasparenza dell'acqua. La presenza di un inoculo metalimnetico di *P. rubescens* durante il periodo estivo, l'elevata torbidità della colonna d'acqua, l'ingresso di nutrienti dal bacino imbrifero e l'abbassamento delle temperature dei corpi idrici hanno generato condizioni simili a quelle

presenti nel metalimnio in tutta la colonna d'acqua favorendo lo sviluppo delle fioriture superficiali.

Osservazioni condotte su un bacino artificiale siciliano ipereutrofico nel periodo 1998-2002 hanno evidenziato la presenza, nel periodo compreso tra giugno e ottobre, di gruppi fitoplanctonici costituiti quasi esclusivamente da *Microcystis* spp. (Naselli-Flores & Barone, 2003). Queste fioriture, che formavano aggregati galleggianti spessi diverse decine di centimetri su gran parte della superficie lacustre, hanno fatto registrare picchi di densità cellulare superiori a  $10^{10}$  cell/L e concentrazioni di tossine (misurate MC-LReq) superiori a 2.500 µg/L (Naselli-Flores *et al.*, 2007). Misure gestionali volte ad impedire la rottura estiva del termoclino, adottate dal 2003 in poi dall'ente gestore del corpo idrico, si sono rivelate efficaci nel ridurre drasticamente i valori sopracitati (Naselli-Flores & Barone, 2005; Naselli-Flores, 2014).

Nel Biviere di Gela, uno stagno naturale, *C. ovalisporum* fiorisce irregolarmente in estate quando la temperatura dell'acqua supera i 27°C. La specie ha cominciato a manifestarsi quando la vegetazione acquatica del lago, a causa di una alterazione del bilancio idrico, si è estinta trasformando il lago da un ambiente dominato da piante acquatiche e caratterizzato da elevati valori di trasparenza ad un ambiente torbido dominato dal fitoplancton (Barone *et al.*, 2010). I periodi tardo estivi (fine agosto-settembre) sono generalmente dominati da *C. raciborskii* con valori di biovolume al di sotto di 10 mm<sup>3</sup>/L.

Molti bacini artificiali della Sardegna sono stati interessati negli anni da fioriture di cianobatteri, con variazioni annuali nelle specie dominanti. Nel lago Alto Flumendosa, per esempio, le cui acque sono utilizzate oltre che per la produzione di energia elettrica anche per l'allevamento di trote, per l'irrigazione e per uso potabile, fra gli anni 90 e 2010 è sempre stata presente una comunità cianobatterica ricca ed estremamente variabile. Le specie dominanti sono, alternativamente, *P. rubescens*, *W. naegaeliana*, *Microcystis botrys*, *Dolichospermum* spp. Negli anni è stata comunque osservata una tendenza alla diminuzione della densità cellulare (intorno ad un ordine di grandezza) (Begliutti *et al.*, 2007; Meregalli *et al.*, 2002; Lugliè *et al.*, 1997; Scardala *et al.*, 2013). In uno studio condotto fra il 2011 e la primavera del 2013, le specie dominanti in superficie sono state *P. rubescens* nei mesi invernali e *W. naegaeliana* nei mesi primaverili-estivi, con presenza costante a densità molto inferiori di *M. botrys* e *Dolichospermum* spp. Un'analisi multidisciplinare, che ha analizzato il profilo delle MC prodotte e la presenza dei geni per la tossicità nelle diverse specie, ha permesso di attribuire la produzione delle poche MC rilevate a *P. rubescens* e *M. botrys* (Scardala *et al.*, 2013).

In una serie di campionamenti effettuati fra la fine degli anni 90 e il 2004 in molti altri laghi della Sardegna, la specie dominante era *M. aeruginosa*, e le varianti di MC più abbondanti erano conseguentemente MC-LR e MC-YR (Messineo *et al.*, 2009).

## A7.2. Principali specie di cianobatteri tossici in Italia e indicazioni sulla produzione di tossine

Informazioni sulla produzione di cianotossine da parte delle specie tossiche e sui fattori che più le influenzano possono essere molto utili per prevedere e conoscere l'eventuale tossicità della fioritura, uno dei parametri necessari per prendere le opportune misure di prevenzione e recupero. Nonostante l'enorme quantità di studi svolti negli ultimi anni non sono ancora stati completamente chiariti tutti i meccanismi e i fattori di controllo che regolano la formazione e produzione delle cianotossine. Ma nonostante questa carenza di informazioni e di conoscenze, alcuni aspetti cominciano ad essere riconosciuti.

Nei seguenti paragrafi vengono riportate le informazioni al momento disponibili sulla produzione di tossine delle specie più importanti nel nostro Paese.

### **A7.2.1. Specie che formano fioriture superficiali durante il periodo di balneazione**

#### **A7.2.1.1. *Dolichospermum lemmermannii***

I morfotipi planctonici del genere *Anabaena* sono stati recentemente trasferiti nel genere *Dolichospermum*, per distinguerli dalle specie bentoniche, che hanno mantenuto il vecchio nome (Wacklin *et al.*, 2009).

Nei laghi dell'Italia settentrionale e in parte anche per i laghi delle zone meridionali e insulari, la specie più importante dal punto di vista della balneazione e delle attività ricreative estive dovuto allo sviluppo di fioriture superficiali nei mesi più caldi, è *D. lemmermannii*. Tuttavia, si hanno solo due segnalazioni occasionali sulle tossine presenti durante le sue fioriture, una relativa al lago di Como nel 2012, quando sono state rilevate concentrazioni di 3,2 µg/L di ATX-a, e una relativa al Lago Maggiore nel 2005, quando invece sono state trovate concentrazioni superiori a 1 µg/L di MC. È evidente che vi è una carenza di informazioni sulla produzione quali- e quantitativa delle cianotossine soprattutto in virtù della maggiore diffusione di questi organismi nei vari laghi italiani.

È comunque riportato anche in letteratura che ceppi di questo cianobatterio possono produrre tossine differenti.

In Danimarca, da alcuni ceppi isolati durante una fioritura che ha causato la morte di alcuni uccelli è stata identificata l'anatossina-a(s) (Henriksen *et al.*, 1997; Onodera *et al.*, 1997), che ha caratteristiche neurotossiche e per la quale sono disponibili poche informazioni (*vedi* capitolo A2), né tantomeno sono disponibili informazioni sulla genetica e sul ruolo ambientale di questa tossina. *D. lemmermannii* è stata anche associata alla presenza di saxitossine (STX), sempre in Danimarca, dove sono state trovate concentrazioni fra 5,9 and 224,1 µg/g peso secco di STXequivalenti (Kaas & Henriksen, 2000) e in acque interne finlandesi (Rapala *et al.*, 2005), dove è stata trovata in concentrazioni fra 103 e 930 µg/g peso secco. I laghi nei quali è stata trovata la tossina appartenevano ad un ampio spettro di trofia, da oligotrofici a ipereutrofici, tutti però caratterizzati da un elevato rapporto N:P, dove quindi il fosforo era il nutriente limitante.

In un lago oligotrofico finlandese la produzione di MC è stata associata alla presenza di *D. lemmermannii* (Lindholm *et al.*, 2003); altre osservazioni sulla produzione di MC e ATX-a sono relative solo a ceppi di *Anabaena* spp., isolati da altri laghi finlandesi in diversi anni (Rapala & Sivonen, 1998; Rapala *et al.*, 1997). I ceppi di *Anabaena* produttori di MC hanno mostrato una notevole variabilità per le varianti prodotte e anche una diversa risposta ai fattori chimico-fisici come la temperatura, l'intensità di luce e la concentrazione di nutrienti (Rapala *et al.*, 1997). I due ceppi di *Anabaena* spp. testati rispondevano a concentrazioni crescenti di fosforo sia con un aumento dei tassi di crescita che con un aumento di quota cellulare di MC. In ogni ceppo aumentavano i congeneri dominanti, rispettivamente MC-LR e MC-RR in *Anabaena* sp. 90 e le loro varianti demetilate nel ceppo 202A1. La mancanza di azoto nei terreni di coltura induceva una maggior produzione di tossine in entrambi i ceppi. Le risposte a variazioni di temperatura sono risultate più complesse. Nel ceppo 90 temperature maggiori di quella ottimale di crescita (25°C) riducevano significativamente la produzione sia di MC-LR che di MC-RR, ma temperature più basse riducevano molto di più la MC-RR rispetto alla MC-LR, che diminuiva lievemente. Nell'altro ceppo tutte e due le varianti venivano ridotte a temperature diverse da quella ottimale (Rapala *et al.*, 1997).

### A7.2.1.2. *Microcystis* spp.

La tossicità delle fioriture di *Microcystis* può essere molto variabile, in quanto dipende dalla presenza o meno di genotipi tossici, dal tasso di produzione di MC e dal profilo dei congeneri prodotti, che hanno livelli di tossicità molto diversi (vedi capitolo A2). La produzione di MC in *Microcystis* è stata correlata positivamente con il tasso di crescita (Orr & Jones, 1998; Oh *et al.*, 2000), indirettamente ai fattori ambientali che limitano il tasso di crescita (Oh *et al.*, 2000) e al numero di individui tossici presenti nella popolazione totale (quelli che possiedono il cluster di geni *mcy*) (Hotto *et al.*, 2008; Okello *et al.*, 2010). La presenza nella popolazione di diversi genotipi è influenzata a sua volta dal tipo e dalla concentrazione di nutrienti. Concentrazioni elevate di N e P inorganici sembrano favorire la crescita di ceppi tossici (Davis *et al.*, 2010). L'elevata densità cellulare sembra promuovere l'espressione del gene *mcyE* e la conseguente produzione di MC, anche nel giro di poche ore. Wood *et al.*, (2011) hanno osservato, infatti, che nell'arco temporale di una giornata, durante la fase di accumulo in superficie delle colonie di *Microcystis*, la quota intracellulare di MC è passata da 0,02 a 0,64 pg/cell in sole 5 ore (Wood *et al.*, 2011). Se la relazione fra densità cellulare e aumento nella produzione di tossine venisse confermata da altri studi, ci si potrebbe aspettare che nelle schiume superficiali la concentrazione di MC sia più alta di quanto si possa prevedere da dati sulla concentrazione media di MC per cellula e questo potrebbe avere implicazioni sull'esposizione ad aerosol.

Le MC sono le tossine più studiate e sono, pertanto, disponibili molte informazioni sia sulla loro genetica che sul loro possibile ruolo ecologico. Alla base della sintesi delle MC c'è la sintesi peptidica non-ribosomale mediata dalla peptide sintetasi non-ribosomale (*Non Ribosomal Peptide Synthetase*, NRPS), codificata da uno dei più grandi cluster genici conosciuti, il cluster genico *mcy*. In *Microcystis* comprende 10 geni trascritti con modalità bidirezionale. Ciascun modulo è responsabile per la attivazione, la solfurazione, la modifica e la condensazione di uno specifico amminoacido alla catena. Orloghi dei geni *mcy* per la MC-sintetasi sono stati caratterizzati e sequenziati in molti altri cianobatteri tossici inclusi *Planktothrix*, *Nostoc*, *Anabaena* e *Nodularia* e ad oggi sono disponibili informazioni riguardanti anche la sintesi delle altre tossine (Neilan *et al.*, 2013). L'ipotesi di utilizzare metodi molecolari nel monitoraggio delle specie tossiche ha trovato perciò applicazione affiancando alla ricerca di cianotossine l'identificazione degli individui potenzialmente in grado di produrle.

Relativamente al loro ruolo ecologico, sono state formulate diverse ipotesi. Le MC rilasciate da cellule lisate sembrano svolgere un ruolo nella comunicazione intraspecifica in situazioni di stress, in quanto inducono risposte fisiologiche implicate in meccanismi di resistenza nelle cellule adiacenti ancora integre (Schatz *et al.*, 2007). Inoltre, le MC avrebbero anche più di un ruolo intracellulare: conferiscono una maggiore fitness in caso di limitazione da CO<sub>2</sub> (Jahnichen *et al.*, 2007) e in caso di stress ossidativo si legano covalentemente ad una serie di proteine del metabolismo del carbonio e dell'azoto, svolgendo un'azione protettiva (Zilliges *et al.*, 2011). Neilan *et al.* (2013) suggeriscono che, durante una fioritura, le regolazioni fini che avvengono a livello di espressione genica di *M. aeruginosa*, influenzate dall'intensità della luce e dalla disponibilità di ferro, hanno ripercussioni più generali sulla composizione relativa della popolazione in genotipi tossici e non tossici. I due genotipi, tossico e non tossico, coesistono durante le fioriture in quanto ognuno è più idoneo in condizioni diverse. In condizione di elevata densità cellulare, la CO<sub>2</sub> diviene un fattore limitante per la crescita e il genotipo tossico sembra favorito perchè sembra possedere una maggiore affinità per la CO<sub>2</sub> (Jahnichen *et al.*, 2007). Un'altra strategia per sopperire alla carenza di CO<sub>2</sub>, è di disporsi negli strati più superficiali del bacino (Van de Waal *et al.*, 2011), dove le cellule tossiche hanno la possibilità di proteggersi dall'elevata intensità della luce (Zilliges *et al.*, 2011). D'altra parte, se il genotipo tossico ha una maggiore richiesta di N e P (per la produzione di tossine e pigmenti fotosintetici), può svilupparsi solo in condizioni di concentrazioni elevate di nutrienti, condizioni che si

verificano all'inizio di una fioritura. Verso la fine della fioritura, quando ormai i nutrienti sono largamente consumati, sembra favorito il genotipo non tossico (Davis *et al.* 2010).

*Microcystis* è uno dei generi più diffusi in Italia (Viaggiu *et al.*, 2011), ma non sembra aver dato luogo a fioriture importanti negli anni più recenti. Soprattutto nelle regioni settentrionali, dove in alcuni casi è stata sostituita da altri generi (es. il Lago di Como), la sua presenza sembra essere significativa solo in alcuni laghi minori (es. il Lago di Montorfano, Como). In alcuni invasi artificiali siciliani, azioni di prevenzione e risanamento intraprese hanno dato risultati positivi, riducendo drasticamente le densità cianobatteriche e conseguentemente le concentrazioni di cianotossine.

### **A7.2.1.3. *Cylindrospermopsis raciborskii***

*C. raciborskii* è una specie di origine tropicale, inizialmente trovata in Africa centrale e nei laghi Australiani. A partire da metà degli anni '90, è stata descritta anche in molte aree temperate europee, compresa l'Italia (Borics *et al.*, 2000; Dokulil & Mayer, 1996; Briand *et al.*, 2002; Fastner *et al.*, 2003; Kokocinski *et al.*, 2009; Saker *et al.*, 2003; Manti *et al.*, 2005) e in molti laghi Sud-Americani (Castro *et al.*, 2004). In coltura è stato osservato che i ceppi delle diverse aree geografiche producono tossine diverse: il ceppo australiano produce CYN (Saker & Griffiths, 2000), quello brasiliano produce STX (Lagos *et al.*, 1999) e quello europeo tossine ancora sconosciute (Fastner *et al.*, 2003; Antal *et al.*, 2011; Acs *et al.*, 2013). Recentemente 4 ceppi di *C. raciborskii*, isolati da un lago ungherese, sono stati testati con 4 saggi biologici diversi e aspecifici. La loro tossicità è stata confrontata con quella di un ceppo produttore di ATX (*Oscillatoria* spp. PCC 6506) e un ceppo produttore di CYN (*C. raciborskii* AQS). I livelli di EC<sub>50</sub> (*Effective Concentration*: concentrazione in grado di ridurre parametri funzionali specifici del 50%)/LC<sub>50</sub> (*Lethal Concentration*: concentrazione alla quale muore il 50% degli individui testati) misurati sugli estratti dei 4 ceppi, pur non essendo presenti nè ATX nè CYN (analisi eseguite con HPLC-MS/MS *tandem mass*), erano comparabili con i livelli ottenuti con *Oscillatoria* PCC 6506 e superiori di un ordine di grandezza ai livelli di *C. raciborskii* AQS (Acs *et al.*, 2013). Inoltre, uno studio su estratti acquosi di un bloom di *C. raciborskii* in un lago ungherese e su un ceppo isolato da un altro lago, ha confermato un'azione neurotossica, simile a quella delle anatoxine (Vehovszky *et al.*, 2013).

Nel caso di *C. raciborskii*, l'analisi molecolare non è sempre utile ad individuare il tipo di tossine prodotte dai vari ceppi. Per esempio, gli studi su due ecotipi di *C. raciborskii* sudamericani hanno evidenziato la produzione di STX invece di CYN. Questi ecotipi possiedono un cluster di geni *cyr* simile al 99% ad un ceppo australiano e uno tedesco di *C. raciborskii* e ad un ceppo di *Aphanizomenon* spp., tutti produttori di CYN (Piccini *et al.*, 2013).

In Italia, nonostante *C. raciborskii* sia da anni la specie dominante nel Lago Trasimeno (PG) con abbondanti fioriture durante il periodo estivo, solo una volta, a settembre 2004, sono state rilevate tracce di CYN (Manti *et al.*, 2005). Nel lago di Albano è stata osservata un'unica fioritura a luglio 2004, di  $\sim 5 \cdot 10^6$  cell/L, con una concentrazione di CYN pari a 0,003 pg/cell (Messineo *et al.*, 2010). In alcuni piccoli laghi settentrionali dove si sono registrate sporadiche fioriture di *C. raciborskii*, non si hanno dati sulle tossine. Considerata dunque la scarsa conoscenza sulla produzione di tossine da parte di questo organismo nei bacini italiani, si riportano alcune delle informazioni disponibili sulle interazioni fra diversi fattori ambientali con la produzione di CYN e STX e con la regolazione della trascrizione genica.

Analizzando l'effetto di diversi fattori ambientali sulla produzione di CYN e sul tasso di crescita in *C. raciborskii*, un elemento sembra essere costante: il tasso di crescita risponde generalmente nel modo inverso rispetto alla produzione di tossine. In 6 ceppi australiani di *C. raciborskii* un aumento di temperatura da 25 a 35°C ha stimolato la velocità di crescita ma ha inibito quasi totalmente la produzione di CYN (Saker & Griffiths, 2000). In un altro studio,

colture di *Cylindrospermopsis* cresciute con una fonte di azoto, costituita da ammonio, hanno mostrato valori elevati nel tasso di crescita e una bassa concentrazione di CYN, mentre colture cresciute in assenza di azoto, hanno mostrato un basso tasso di crescita e una alta concentrazione di CYN (Saker & Neilan, 2001). Anche la luce sembra esercitare un effetto opposto sui tassi di crescita e sulla produzione di tossine. In uno studio di Dyble *et al.*, (2006), sono state testate diverse intensità di luce su colture cresciute in assenza di N. Il maggiore tasso di crescita coincideva con l'intensità di luce minore contrariamente alla concentrazione di CYN, che era massima alla massima intensità testata.

Il cluster di geni per la produzione della CYN è stato individuato in molte specie, con una similarità fra il 75 e il 95%, ma con delle differenze nell'organizzazione dei geni (Neilan *et al.*, 2013). La luce e la disponibilità di fosforo inorganico sembrano influenzare la trascrizione in *C. ovalisporum*. Una esposizione, nell'arco di 48 ore, ad una elevata intensità di luce stimola la trascrizione di alcuni geni coinvolti, mentre sembra che questa sia inibita per periodi di esposizione più brevi (8 ore) (Shalev-Malui *et al.*, 2008). La limitazione di P sembra aumentare la trascrizione e la produzione di CYN (Bar-Yosef *et al.*, 2010) ma è stato anche osservato un effetto contrario, con una riduzione nella produzione di CYN (Bacsi *et al.*, 2006). La disponibilità di azoto non sembra variare significativamente la trascrizione di 4 geni del cluster in *C. raciborskii* (Stucken *et al.*, 2010).

Le STX sono prodotte da *C. raciborskii* in Sud America (Carneiro *et al.*, 2009; Castro *et al.*, 2004), da *Aphanizomenon* spp. in Portogallo (Dias *et al.*, 2002) successivamente identificata come *Aphanizomenon issatschenkoi* (Valerio *et al.*, 2009) e *Raphidiopsis brookii* in Brasile (Yunes *et al.*, 2009). I pochi studi disponibili riguardanti i fattori ambientali in grado di influenzare la produzione di STX sono relativi a queste specie di cianobatteri, poco confrontabili, e forniscono dati a volte contraddittori. Per esempio, in *C. raciborskii* è stato osservato che a temperature maggiori di quella ottimale di crescita (25°C) la quota cellulare di STX si riduce (Castro *et al.*, 2004) mentre aumenta in *Aphanizomenon* spp. (Dias *et al.*, 2002). Sempre in *C. raciborskii* anche la salinità e la durezza dell'acqua influenzano in modo variabile la produzione di STX; per esempio, una salinità crescente determina un aumento nella produzione di STX. Questo suggerisce, anche in base al meccanismo di azione della tossina sulla pompa cationica della membrana, un ruolo di queste molecole nel mantenimento dell'equilibrio omeostatico cellulare (Pomati *et al.*, 2004; Carneiro *et al.*, 2013). L'aumento di durezza dell'acqua, per un aumento di CaCO<sub>3</sub>, inibisce sia la crescita che la produzione di STX, mentre maggiori concentrazioni di MgCO<sub>3</sub> aumentano il metabolismo, la crescita e la produzione di tossine (Carneiro *et al.*, 2013). Se la composizione in ioni sembra influenzare in modo simile tassi di crescita e produzione di STX (aumentano o diminuiscono entrambi), l'intensità di luce ha effetti differenti. A 100 e a 150  $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$  sono stati osservati tassi di crescita simili e la massima e la minima produzione di STX, rispettivamente (Carneiro *et al.*, 2009). Inoltre, all'intensità di luce di controllo (50  $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) corrispondeva un tasso di crescita minore e una produzione elevata di STX (vicina al massimo osservato a 100  $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). Sia a 50 che a 100  $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$  la produzione di tossine seguiva un marcato ciclo circadiano (diminuzione di produzione al buio e aumento alla luce) (Carneiro *et al.*, 2009). Questi risultati, anche se complessi e a volte contraddittori, forniscono comunque delle indicazioni su alcuni dei fattori ambientali che possono essere importanti nel determinare la tossicità di una fioritura di specie che producono STX.

#### **A7.2.1.4. *Aphanizomenon flos-aquae*, *Chrysochloris ovalisporum***

Alcune informazioni sulle diverse tossine prodotte dal genere *Aphanizomenon*, STX e CYN, sono state descritte nei paragrafi precedenti. Oltre alle tossine già citate, *Aphanizomenon* spp. può produrre MIC e ATX-a.

Anche in Italia, la specie *C. ovalisporum*, responsabile di molte fioriture nel Lago di Albano, è stata associata in questo lago alla produzione di CYN, con una concentrazione intracellulare molto variabile, fra 0,03 e 424,53 µg/g (Messineo *et al.*, 2010). Informazioni relative agli effetti di luce e disponibilità di fosforo sulla produzione di CYN sono state riportate nel paragrafo precedente.

La specie *Aph. flos-aquae* invece, che è stata responsabile di più di una fioritura nel Lago di Annone (Italia settentrionale) sembrerebbe produrre ATX-a. Dati in letteratura sulle specie produttrici di ATX fanno riferimento ad *Aphanizomenon* sp. (Rapala *et al.*, 1993; Rantala-Ylinen *et al.*, 2011) o alla specie *Cuspidothrix issatschenkoi* (Wood *et al.*, 2007; Ballot *et al.*, 2010; Gagnon, 2012; Gagnon & Pick, 2012). I pochi dati disponibili suggeriscono che la produzione di tossina sia indipendente dalla crescita cellulare. La produzione di tossina sembra favorita dalla limitazione da N e inibita da temperature elevate, che non sembrano avere effetti sulla crescita. Elevate intensità di luce inibiscono la produzione di tossina in *Anabaena* ma non in *Aphanizomenon* (Rapala *et al.*, 1993). Il cluster di geni per la produzione di ATX presenta delle similarità nelle sequenze ma una diversa organizzazione dei geni, sia in *Oscillatoria* PCC6506 (Mejean *et al.*, 2009) che in *Anabaena* sp. 37 (Rantala-Ylinen *et al.*, 2011). Per i meccanismi di regolazione non ci sono ancora dati esaustivi in letteratura. I dati disponibili al momento, pertanto, pur non essendo sufficienti a dare indicazioni sui fattori che influenzano la produzione di ATX-a, possono comunque essere utili per il riconoscimento in campioni naturali delle specie produttrici.

In Germania e in Francia *Aph. flos-aquae* produce CYN (Preußel *et al.*, 2006; Brient *et al.*, 2009). Similmente a quanto osservato per la produzione di ATX, aumenti di temperatura da 16 a 25°C corrispondono ad una diminuzione della produzione di CYN, in un range approssimativamente fra 0,1 e 0,3 pg/cell (calcolato assumendo un volume medio per cellula di 200 µm<sup>3</sup>, in quanto i dati sono espressi per volume), senza influenzare i tassi di crescita (Preußel *et al.*, 2009).

## **A7.2.2. Specie che formano fioriture superficiali in momenti diversi dal periodo di balneazione**

### **A7.2.2.1. *Planktothrix rubescens***

Di tutte le specie che non rappresentano un particolare pericolo durante la balneazione, ma che comunque possono rappresentare un problema sanitario in altri momenti dell'anno, anche in relazione all'utilizzo delle acque per scopi potabili, *P. rubescens* è senz'altro la più importante. Nel capitolo A1 si è estesamente parlato della sua ecologia, pertanto qui saranno riportati gli aspetti più importanti legati alla sua tossicità. Essendo principalmente produttrice di MC, alcune delle osservazioni già riportate per *Microcystis* valgono anche per questa specie. Per esempio, la concentrazione di fosforo agisce indirettamente sulla produzione di tossine attraverso l'effetto sui tassi di crescita (Briand *et al.*, 2005). Anche in questo caso, riveste molta importanza il rapporto relativo fra genotipi tossici e non tossici (Briand *et al.*, 2008, Manganelli *et al.*, 2010). Il numero di individui con geni *mcy* non attivi potrebbe spiegare la mancanza di correlazioni fra il numero di individui tossici (possessori del gene) e la concentrazione di MC (Kurmayer *et al.*, 2004). In uno studio annuale sul Lago di Gerosa, un lago oligotrofico, è stata osservata una correlazione positiva fra la concentrazione di fosforo e il numero di individui tossici e un rapporto tossici/non tossici significativamente maggiore nelle stazioni di profondità (Manganelli *et al.*, 2010). Analoga situazione è stata parzialmente verificata anche nel lago meso-eutrofico di Vico (Funari *et al.*, 2011). Se quanto osservato venisse confermato anche in altri studi simili, la distribuzione nella colonna d'acqua delle cellule potrebbe avere una importanza strategica per quel che riguarda le modalità di campionamento. Un altro aspetto specifico di *P. rubescens*,

osservato più volte negli invasi delle nostre regioni, riguarda la produzione relativa delle varianti di MC. Generalmente la maggior parte delle MC prodotte sono: le MC-RR e le sue varianti demetilate e in modo variabile ma meno significativo le MC-LR, dementi-MC-LR e MC-YR (Briand *et al.*, 2005; Ernst *et al.*, 2009; Manganeli *et al.*, 2010). Questi diversi profili sembrano correlati a polimorfismi nel cluster genico della demetilazione (Kurmayer *et al.*, 2005).

Non ci sono dati sull'eventuale regolazione dell'espressione, come è stato invece dimostrato in *Microcystis* (Wood *et al.*, 2011).

### A7.2.3. Specie bentoniche presenti in piccoli bacini

Negli ultimi 20 anni, a livello globale è stato documentato un crescente numero di cianobatteri bentonici produttori di tossine sia in ambienti lotici che lentic (acque correnti e non). Alcuni avvelenamenti di animali in prossimità di questi ambienti sono stati associati all'ingestione di questi organismi. Specie bentoniche di *Phormidium* sp. e *Oscillatoria* sp. che producevano ATX-a hanno causato la morte di cani che andavano ad abbeverarsi (Edwards *et al.*, 1992; Gugger *et al.*, 2005; James *et al.*, 2005; Puschner *et al.*, 2008). Nelle sorgenti calde, sulle rive del lago alcalino Bogoria, in Kenia, le MC e le ATX prodotte da *Phormidium terebriformis*, *Oscillatoria willei*, *Spirulina subsalsa* e *Synechococcus bigranulatus*, sono state ritenute una possibile causa della morte dei fenicotteri minori (Metcalf *et al.*, 2006).

Le cianotossine più comunemente prodotte dai cianobatteri bentonici sono ATX e MC ma sono stati identificati anche cianobatteri bentonici che producono CYN e STX (Heath *et al.*, 2010).

Patine coerenti di cianobatteri, dette comunemente *mat*, possono formarsi sul sedimento e sulle rocce del fondale di fiumi e laghi. Queste *mat* possono svilupparsi anche in laghi oligotrofici (Mez *et al.*, 1997), le cui acque possono essere sufficientemente trasparenti da permettere la penetrazione della luce. Spesso gli alti tassi di fotosintesi raggiunti da queste *mat* comportano che l'ossigeno prodotto e intrappolato al loro interno li renda sufficientemente leggeri da raggiungere la superficie (Chorus & Bartram, 1999) andando così a rappresentare un rischio per la salute delle persone e degli animali durante l'uso ricreativo delle acque.

I cianobatteri bentonici, come le specie planctoniche, producono tossine diverse in regioni diverse. Per esempio, due popolazioni australiane di *Lyngbya wollei* producevano CYN e deossiCYN a livelli significativi (Seifert *et al.*, 2007), mentre la stessa specie negli Stati Uniti produceva STX (Carmichael *et al.*, 1997). In California, in bacini per acqua potabile, sono stati isolati cianobatteri bentonici filamentosi che producevano elevate quantità di MC-LR per unità di biomassa (1,15 to 4,15 µg/mg di carbonio) (Izaguirre *et al.*, 2007). Numerose specie tossiche che producono MC, *Anabaena subcylindrica*, *Anabaena variabilis*, *Calothrix parietina*, *Nostoc spongiaeforme*, *Plectonema boryanum*, *Phormidium corium* e *Phormidium tenue* sono state isolate da *mat* sviluppatasi nel Nilo e in canali di irrigazione. Dai sedimenti di questi stessi bacini sono stati isolati ceppi tossici di *M. aeruginosa* (Mohamed *et al.*, 2006; Mohamed *et al.*, 2007). Colonie di cellule appartenenti a genotipi tossici di quest'ultima si rinvenivano durante il periodo invernale, anche in grande quantità, nei sedimenti di laghi temperati, dove costituiscono l'inoculo per le successive fioriture limnetiche estive (Brunberg *et al.*, 2002; Latour & Giraudet, 2004; Verspagen *et al.*, 2004; Tan, 2012; Torres *et al.*, 2013).

Una nuova specie di un genere ritenuto esclusivamente planctonico come *Planktothrix*, è stata recentemente isolata da un biofilm proveniente da un fiume neozelandese (*Planktothrix* sp. VUW25) (Wood *et al.*, 2010). Questo ceppo produce MC e si ritiene sia stato responsabile della morte di alcuni cani che si erano abbeverati al fiume.

Sono state riscontrate cianotossine anche in altri generi bentonici come *Fischerella* e *Aphanothece* (MC) (Heath *et al.*, 2010).

Alla luce di queste evidenze sarebbe quindi opportuno cominciare a considerare le specie bentoniche nei piani di monitoraggio dei cianobatteri tossici delle risorse d'acqua.

### **A7.3. Differenze e similitudini fra la situazione italiana e altri Paesi**

Le fioriture algali tossiche (*Harmful Algal Blooms*, HAB) sono sempre più frequenti nei corpi idrici eutrofici in primavera, in estate e in inverno e sono in aumento in tutto il mondo (Gumbo *et al.*, 2008). I generi maggiormente coinvolti e che producono MC sono: *Microcystis*, *Anabaena*, *Planktothrix* e *Nostoc*.

Come è stato detto nel capitolo A1, l'eutrofizzazione è uno dei fattori che può favorire la proliferazione di cianobatteri. In Europa i rapporti sullo stato delle acque della EEA (*European Environment Agency*) del 2010 e 2012, riportano che, nonostante una tendenza alla diminuzione dell'introduzione di nutrienti nei terreni agricoli o in acque di trattamento, circa il 20-30% dei laghi e fiumi è ancora in condizioni eutrofiche (Collins, 2010; EEA, 2012). Anche negli USA il 20% dei laghi monitorati ha ancora problemi di eutrofizzazione (USEPA, 2009), determinando condizioni favorevoli per lo sviluppo massivo di cianobatteri (Chorus & Bartram, 1999). Oltre ai processi di eutrofizzazione, anche le conseguenze dei cambiamenti climatici globali (temperatura elevata, aumentate concentrazioni atmosferiche di anidride carbonica, elevati flussi UV) sono stati messi in relazione con l'ecologia e la crescita dei cianobatteri (Bláha *et al.*, 2009).

Una prima valutazione sullo sviluppo di cianobatteri tossici e sulla produzione di cianotossine (Chorus, 2005) ha evidenziato come questi organismi siano diffusi nella maggior parte dei corpi idrici europei, con un forte impatto sull'utilizzo di quest'ultimi come risorsa idrica sia finalizzato alla potabilizzazione, all'allevamento e all'acquacoltura, sia all'uso ricreativo-turistico e di conservazione.

A livello europeo, gli sforzi della ricerca di settore hanno aumentato la capacità di gestione del rischio. Resta ancora da migliorare la divulgazione delle informazioni tra gli Stati Membri relativa alla diffusione delle competenze tecniche e la condivisione di procedure di intervento per la gestione del rischio relativo a cianobatteri tossici e cianotossine (Carvalho *et al.*, 2013; WHO, 2003). Per questo è stata avviata CyanoCOST, un'azione a livello europeo (COST *European Cooperation in Science and Technology*) per coordinare e mettere in rete le competenze fra i vari paesi sulla gestione del rischio per esposizione ai cianobatteri e alle cianotossine ([www.cyanocost.com](http://www.cyanocost.com)).

Oltre che in acque eutrofiche, con concentrazioni non limitanti di fosforo e con un rapporto N/P compreso tra 10 e 15 (Merel *et al.*, 2013), sono noti casi di sviluppo massivo di cianobatteri tossici sia in ambienti oligotrofici (*Oscillatoria* spp. forme bentoniche; Mez *et al.*, 1998) sia in laghi profondi subalpini mesotrofici. In questi laghi, *P. rubescens* è la specie dominante nel lago di Zurigo (Svizzera), nel Mondsee (Austria), Ginevra (Francia e Svizzera), Nantua (Francia), e Bourget (Francia) (Briand *et al.*, 2005).

Il genere *Planktothrix* è cosmopolita e si sviluppa abbondantemente non solo nei laghi subalpini Europei, ma anche in diversi laghi della Germania e dei paesi nordici (Hossain *et al.*, 2012). Il genere comprende nove specie: *P. agardii*, *P. iwanoffiana*, *P. lacustris*, *P. miyadaii*, *P. mougeotii*, *P. penornata*, *P. planctonica*, *P. pseudoargardii* e *P. rubescens* (Hossain *et al.*, 2012). Le più diffuse nei laghi temperati dell'emisfero settentrionale, pur possedendo nicchie ecologiche molto diverse, sono *P. rubescens* e *P. agardii*. La prima si riferisce generalmente ai genotipi rossi ricchi di ficoeritrina, e si trova in laghi profondi, stratificati, oligo-mesotrofici; la

seconda indica generalmente i genotipi verdi ricchi in ficocianina e si trova in ambienti meno profondi, meso-eutrofici (Kurmayer *et al.*, 2005). Negli habitat dell'emisfero settentrionale *P. rubescens* è la specie più importante per la produzione di MC (Fastner *et al.*, 1999). Da uno studio effettuato su alcuni laghi del nord Europa con profondità variabili in cui le cellule di *Planktothrix* spp. sono state identificate morfologicamente in base alla pigmentazione (rossa e verde) e molecularmente in base alla presenza o meno del gene *mcy*, è risultato che la maggior parte degli ecotipi rossi, provenienti da laghi profondi, erano quasi tutti tossici al 100%, mentre le popolazioni miste (con ecotipi rossi e verdi) provenienti da laghi meno profondi presentavano una elevata variabilità nella percentuale di genotipi tossici (Ostermaier *et al.*, 2012). Nel lago di Zurigo durante il periodo 1990-2008, gli ecotipi rossi erano sempre dominanti e presentavano una frazione di organismi tossici in media  $106 \pm 8\%$  (Ostermaier *et al.*, 2012). Gli autori suggeriscono che l'ecotipo rosso è dominante nei laghi profondi perché, rispetto all'ecotipo verde, è in grado di produrre vescicole gassose che resistono alla elevata pressione idrostatica. La popolazione con il genotipo tossico sarebbe mantenuta costante anche grazie alla funzione antiossidante delle MC, secondo quanto osservato da Zilliges *et al.* in *Microcystis* (2011). Durante il periodo di rimescolamento della colonna d'acqua, quando i filamenti sarebbero più esposti ad un'elevata intensità luminosa, le MC svolgerebbero una funzione protettiva (Ostermayer *et al.*, 2012). Quest'ipotesi potrebbe contribuire a spiegare perché la percentuale di individui tossici non sempre è correlabile con la concentrazione di MC. Questa mancanza di correlazione è stata osservata anche in due laghi dell'Italia centrale dove, tuttavia, le popolazioni di *P. rubescens*, sempre ecotipi rossi, presentavano un'elevata variabilità in termini di presenza del gene *mcyB*, raramente inferiore al 50% (Manganelli *et al.*, 2010; Funari *et al.*, 2011).

Oltre a cianobatteri filamentosi come quelli appartenenti ai generi *Planktothrix* e *Cylindrospermopsis*, le forme coloniali come *Microcystis* sono quelle che generalmente danno luogo a fioriture nei laghi poco profondi (Paerl *et al.*, 2011). Varie specie di *Microcystis* spp. sono, spesso, responsabili principali delle fioriture nelle acque eutrofiche e molti ceppi sono in grado di produrre MC. Nell'attuale sistema tassonomico Cyanophyta circa 30 specie del genere *Microcystis* sono state descritte da Komárek e Anagnostidis nel 1999 (Xu *et al.*, 2008). Nelle acque giapponesi, sono state osservate sei morfospesie, che secondo l'attuale tassonomia del Codice Botanico (Xu *et al.*, 2008) possono dare origine a fioriture: *M. aeruginosa* (Kuzing) Lemmermann, *Microcystis viridis* (A. Brown) Lemmermann, *Microcystis wesenbergii* (Komárek) Komárek, *Microcystis flos-aquae* (Wittrock) Kirchner, *Microcystis ichthyoblabe* Kutzing e *Microcystis novacekii* (Komárek) Compere, (Xu *et al.*, 2008). Di tutte queste specie, è stato dimostrato che sia le popolazioni naturali, durante le fioriture, sia i ceppi isolati in coltura di *M. aeruginosa* e *M. viridis* sono produttori di MC (Xu *et al.*, 2008).

*M. wesenbergii*, prima specie ad essere descritta da Komárek nel 1958 basandosi sulla morfologia dei margini della colonia, ha un'ampia distribuzione in tutto il mondo, tra cui l'Asia, l'Europa, l'America e l'Oceania (Xu *et al.*, 2008). Secondo Watanabe del 1996 *M. wesenbergii* non è una specie tossica (Xu *et al.*, 2008). Campioni di *M. wesenbergii* provenienti da alcuni laghi della Repubblica Ceca contenevano poche o in alcuni casi nessuna MC (Xu *et al.*, 2008). D'altra parte, però in alcuni laghi danesi fioriture epatotossiche di *Microcystis* sono state caratterizzate dalla presenza dominante di *M. wesenbergii* (Xu *et al.*, 2008). A differenza di ciò che accade nei laghi europei, dove *M. wesenbergii* è la specie meno frequente, nei laghi cinesi *M. wesenbergii* è la specie principale durante le fioriture (Xu *et al.*, 2008).

Nel genere *Microcystis* ci sono specie in cui la proporzione di cellule potenzialmente produttrici di MC può differire notevolmente da un lago all'altro. Per esempio, nel Lago di Wannsee (Germania) questa percentuale era tra lo 0 e il 40 %, come per il Lago Oneida (Stati Uniti), e il Lago di Mikata (Giappone). Al contrario, grandi variazioni nel tempo (6-93%) di

cellule in grado di produrre MC sono state trovate nel bacino Grangent (Francia). Tuttavia il cambiamento nei rapporti fra cellule produttrici e non produttrici MC potrebbe spiegare solo il 54 % della variabilità osservata nelle concentrazioni di MC, suggerendo che parte di questa sia dovuta alla variabilità di MC intracellulare. Questi risultati sono coerenti con quanto già affermato precedentemente, che i livelli di rischio legati alla presenza di peptidi tossici durante proliferazioni dei cianobatteri dipendono sia dalla proporzione di cellule produttrici MC e non produttrici, sia dalla quantità di MC prodotte da parte delle cellule tossiche (Sabart *et al.*, 2010).

Alcune specie dei generi *Aphanizomenon*, *Nodularia* e *Anabaena*, sono responsabili di estese fioriture nel Mar Baltico, che è uno dei bacini salmastri più grandi al mondo e dove lo sviluppo massivo di diverse popolazioni di cianobatteri è andato aumentando dalla fine degli anni '70 del secolo scorso (Sukenic *et al.*, 2007). La sua salinità è molto inferiore a quella delle acque marine a causa del forte apporto fluviale circostante e del limitato scambio con le acque marine del Mare del Nord. Le fioriture avvengono sul finire dell'estate, anche se *Anabaena* spp. è presente, generalmente, per poco meno del 10% del totale della comunità (Halinen *et al.*, 2007). In questo bacino l'insieme delle fioriture di *Aph. flos-aquae* e *Nodularia spumigena* può coprire una superficie maggiore di 100.000 km<sup>2</sup> (Halinen *et al.*, 2007). Diverse specie di *Anabaena* spp. sono presenti nelle acque costiere del Mar Baltico, nella sua parte più centrale e nel Golfo di Finlandia dove è stata riscontrata la loro presenza nei soli mesi estivi (Halinen *et al.*, 2007). All'ingresso del Golfo di Finlandia è stata rilevata la presenza di MC-LR in basse concentrazioni e non è stato possibile identificare con certezza la specie produttrice, anche se tale produzione è stata attribuita probabilmente ad *Anabaena* spp. (Halinen *et al.*, 2007). Esperimenti condotti in laboratorio su ceppi di *Anabaena* spp. isolati dal mar Baltico hanno dimostrato che molti degli isolati producevano MC (Halinen *et al.*, 2007; Engström-Öst *et al.*, 2011). Inoltre, ceppi di *Anabaena* produttori di MC sono stati identificati anche in Canada, Danimarca, Egitto, Finlandia, Francia e Norvegia (Sivonen & Jones 1999). Attualmente si ritiene che la presenza di tossine nel Mar Baltico sia dovuta soprattutto a *Nodularia spumigena*, che produce nodularina (Sivonen *et al.*, 1989), considerata la bassa densità di *Anabaena*, e considerato che *Aph. flos-aquae* in quell'area non produce tossine (Halinen *et al.*, 2007; Sivonen *et al.*, 1989).

Nell'ambito dei generi *Cylindrospermopsis* e tra i già citati *Aphanizomenon* e *Anabaena* sono stati identificati ceppi in grado di produrre CYN (Campo *et al.*, 2013). È stato osservato che i ceppi appartenenti al genere *Cylindrospermopsis* formano, all'interno della famiglia dei cianobatteri eterocistici Nostocales, un gruppo di origine monofiletica, mentre i ceppi appartenenti ai generi *Aphanizomenon* e *Anabaena* mostrano un'origine polifiletica. I ceppi di *Cylindrospermopsis* raggruppano in *cluster* in linea con le loro origini geografiche. La produzione di CYN sembra essere ristretta ai ceppi asiatici e australiani.

*Chrysochlorum* (ex *Aphanizomenon*) *ovalisporum* (Forti), isolata per la prima volta da un lago vicino Istanbul, è considerata una specie tropicale invasiva di alcune regioni europee. Viene generalmente trovata in acque termicamente stratificate, i cui i valori di temperatura oscillano tra i 26°C e 30°C, risultando ottimali per la sua crescita. Popolazioni di questa specie sono state ritrovate in diverse regioni dell'area Mediterranea, del Nord America e dell'Australia. *C. ovalisporum*, generalmente, si distribuisce nelle zone eufotiche grazie alla presenza di vescicole gassose. Quando le condizioni ambientali diventano sfavorevoli per la crescita e per il mantenimento delle popolazioni, differenzia gli acineti che garantiscono la sopravvivenza della popolazione. Poiché sono sempre più frequenti lavori che riportano la produzione di CYN da parte di *C. ovalisporum*, si ritiene fondamentale, oltre ad utilizzare gli strumenti analitici attualmente disponibili per la determinazione di questa tossina, sviluppare metodiche veloci e sensibili per il monitoraggio della presenza e della proliferazione di *C. ovalisporum* nei vari corpi idrici.

Attualmente è molto difficile distinguere morfologicamente le varie specie appartenenti a questo genere. Ci sono specie, poi, che mostrano caratteristiche fenotipiche intermedie tra i due generi *Aphanizomenon/Chrysochlorum* e *Anabaena*. Per esempio *Anabaena bergii*, non tossica, è morfologicamente molto simile a *C. ovalisporum* ma, nonostante le strette relazioni filogenetiche, i due taxa sono da considerarsi ben distinti sia per la morfologia che per la genetica e per la produzione di tossine (Stuken *et al.*, 2009). In studi recenti, nel Lago Kinneret (Israele), le strategie di sorveglianza e di gestione del rischio associato alla presenza di CYN prodotte da *C. ovalisporum* sono state complicate dalla difficoltà a distinguere ceppi tossici da quelli non tossici (Campo *et al.*, 2013). Attualmente *C. ovalisporum*, oltre ad essere rilevata in Israele, viene riportata anche in Australia, Spagna e Italia mentre *A. bergii* è stata osservata in Australia (Kokocinski *et al.*, 2013).

In Europa, sono state trovate, tra le specie che producono CYN, *Aph. flos-aquae* in Germania e *Anabaena lapponica* in Finlandia. Inoltre recenti studi hanno indicato *Aphanizomenon gracile* come potenziale produttore di questa tossina nelle acque tedesche. A parte la Germania, la Spagna, la Finlandia e l'Italia, la CYN è stata rilevata anche in altre località europee, tra cui il Portogallo, la Francia, e la Repubblica Ceca, dove *Anabaena planctonica* e *Aph. flos-aquae* var. *klebahnii* sono stati segnalati come potenziali produttori di CYN (Kokocinski *et al.*, 2013). Pertanto è probabile che la CYN sia ampiamente distribuita nelle acque europee, anche se l'elenco dei potenziali produttori di questa tossina rimane incompleto. Inoltre, ceppi di *C. raciborskii* produttori di CYN non sono stati ancora isolati sebbene venga comunemente rilevata in diverse regioni europee (Kokocinski *et al.*, 2013). In Polonia, CYN è stata ritrovata nel 2006 in due Laghi eutrofici poco profondi (Kokocinski *et al.*, 2009), e l'analisi molecolare, se pur preliminare, delle popolazioni presenti nei due laghi ha dimostrato che *Aphanizomenon* spp. era il principale responsabile della produzione di CYN nei laghi polacchi (Mankiewicz - Boczek *et al.*, 2012). Kokociński & Soininen (2012) in un recente studio hanno osservato che *C. raciborskii* e *Aphanizomenon* spp. erano comunemente presenti nei laghi eutrofici della Polonia occidentale.

Le fioriture di *C. raciborskii* sono sempre più frequenti nelle regioni tropicali, subtropicali e nei laghi delle regioni temperate proprio a causa di un'invasiva diffusione di questa specie (Bonilla *et al.*, 2012). Ad oggi non sono chiari i meccanismi con cui si sono verificate diffusi di *C. raciborskii* nelle regioni temperate (Bonilla *et al.*, 2012). A tal proposito sono state proposte diverse cause tra le quali; l'aumento della temperatura nei corpi idrici causato dai cambiamenti climatici, una particolare resistenza nella sopravvivenza di questa specie durante eventi di trasporto, le caratteristiche ecofisiologiche della specie, l'esistenza di ecotipi in grado di adattarsi a diverse condizioni ambientali (Bonilla *et al.*, 2012; Piccini *et al.*, 2013).

## A7.4. Conclusioni

La descrizione della situazione italiana rispetto a quella mondiale e di alcuni dei meccanismi di produzione e regolazione delle cianotossine, evidenzia un quadro molto complesso e in continua evoluzione. Se da un lato sono poche le situazioni critiche nel nostro contesto nazionale, non si può escludere che la densità di ceppi più tossici o che producono tossine diverse sia al momento tenuta sotto controllo da ceppi meno pericolosi, che risultano più idonei nelle circostanze attuali. Nel caso di cambiamenti significativi dell'habitat i ceppi meno abbondanti potrebbero prendere il sopravvento e dar luogo a nuovi casi critici.

Un altro aspetto da tener presente è che il numero di tossine attualmente conosciuto è probabilmente destinato ad aumentare, per i progressi che si continuano a fare nel campo tecnologico. In tale contesto, è fondamentale pianificare dei programmi di monitoraggio di volta

in volta modellati sia sulle caratteristiche delle specie presenti, in termini di tossicità e dinamica delle popolazioni, che sulle caratteristiche dell'area interessata, in termini di uso delle acque e vie di esposizione.

## Bibliografia

- Ács A, Kovács AW, Csepregi JZ, Törő N, Kiss G, Győri J, Vehovszky Á, Kovács N, Farkas A. The ecotoxicological evaluation of *Cylindrospermopsis raciborskii* from Lake Balaton (Hungary) employing a battery of bioassays and chemical screening. *Toxicon* 2013;70(0):98-106.
- Antal O, Karisztli-Gácsi M, Farkas A, Kovács A, Ács A, Törő N, *et al.* Screening the toxic potential of *Cylindrospermopsis raciborskii* strains isolated from Lake Balaton, Hungary. *Toxicon* 2011;57(6):831-40.
- ARPA Piemonte. *Qualità delle acque di balneazione dei Laghi Piemontesi – Stagione balneare anno 2012*. Torin: Agenzia Protezione Ambiente Regione Piemonte; 2012. Disponibile all'indirizzo: [www.arpa.piemonte.it/approfondimenti/temi-ambientali/acqua/acque-di-balneazione/qualita-delle-acque-di-balneazione-dei-laghi-piemontesi.-stagione-balneare-2012;](http://www.arpa.piemonte.it/approfondimenti/temi-ambientali/acqua/acque-di-balneazione/qualita-delle-acque-di-balneazione-dei-laghi-piemontesi.-stagione-balneare-2012;) ultima consultazione 17/12/2014.
- ARPA Umbria. *Qualità delle acque di balneazione dei laghi umbri. Stagione balneare 2012*. Perugia: Agenzia Regionale per la Protezione Ambientale Umbria; 2012.
- ARPA Veneto. *Scheda informativa punto di campionamento n. 577*. Aggiornata al 29 maggio 2014. Venezia: Direzione Tecnica – Servizio Osservatorio Acque Marine e Lagunari. Agenzia Regionale per la Prevenzione e la Protezione Ambientale del Veneto; 2014. Disponibile all'indirizzo: [http://www.arpa.veneto.it/acqua/docs/balneazione\\_schede\\_punti/revine\\_lago\\_tarzo/577.pdf;](http://www.arpa.veneto.it/acqua/docs/balneazione_schede_punti/revine_lago_tarzo/577.pdf) ultima consultazione 25/06/2014.
- ARPAM. *Programma di Sorveglianza algale Laghi: Fiastrone, Borgiano e Castreccioni. 2011*. Ancona: Agenzia Regionale per la Protezione Ambientale delle Marche, Servizio Acque, Dipartimento di Macerata; 2011.
- Bácsi I, Vasas G, Surányi G, M-Hamvas M, Máthé C, Tóth E, *et al.* Alteration of cylindrospermopsin production in sulfate- or phosphate-starved cyanobacterium *Aphanizomenon ovalisporum*. *FEMS microbiol lett* 2006;259(2):303-10.
- Baker PD, Steffensen DA, Humpage AR, Nicholson BC, Falconer IR, Lanthois B, Fergusson KM, Saint CP Preliminary evidence of toxicity associated with benthic cyanobacterium *Phormidium* in south Australia. *Environ Toxicol* 2001;16:506-11.
- Ballot A, Fastner J, Wiedner C. Paralytic shellfish poisoning toxin-producing cyanobacterium *Aphanizomenon gracile* in Northeast Germany. *Appl Environ Microbiol* 2010;76(4):1173-80.
- Barco M, Flores C, Rivera J, Caixach J. Determination of microcystin variants and related peptides present in a waterbloom of *Planktothrix (Oscillatoria) rubescens* in a Spanish drinking reservoir by LC/ESI-MS. *Toxicon* 2004;44:881-6.
- Barone R, Castelli G, Naselli-Flores L. Red sky at night cyanobacteria delight: the role of climate in structuring phytoplankton assemblage in a shallow, Mediterranean lake (Biviere di Gela, southeastern Sicily). *Hydrobiologia* 2010;639:43-53.
- Bar-Yosef Y, Sukenik A, Hadas O, Viner-Mozzini Y, Kaplan A. Enslavement in the Water Body by Toxic *Aphanizomenon ovalisporum*, Inducing Alkaline Phosphatase in Phytoplanktons. *Curr Biol* 2010;20(17):1557-61.
- Begliutti B, Buscarinu P, Marras G, Sechi GM, Sulis A. Reservoirs water-quality characterization for optimization Modelling under drought conditions Part I – reservoirs trophic state characterization. In: Rossi G, Vega T, Bonaccorso B (Ed.). *Methods and tools for drought analysis and management*. Dordrecht: Springer; 2007. p. 239-61.

- Bogialli S, Nigro di Gregorio F, Lucentini L, Ferretti E, Ottaviani M, Ungaro N, Abis PP, Cannarozzi de Grazia M. Management of a Toxic Cyanobacterium Bloom (*Planktothrix rubescens*) Affecting an Italian Drinking Water Basin: A Case Study. *Environ Sci Technol* 2013;47:574-83.
- Bonilla S, Aubriot L, Soares M C S, González-Piana M, Fabre A. What drives the distribution of the bloom-forming cyanobacteria *Planktothrix agardhii* and *Cylindrospermopsis raciborskii*? *FEMS Microbiol Ecol* 2012;79:594-607.
- Borics G, Grigorszky I, Szabó S, Padišák J. Phytoplankton associations in a small hypertrophic fishpond in East Hungary during a change from bottom-up to top-down control. *Hydrobiologia* 2000;424(1):79-90.
- Briand E, Yepremian C, Humbert JF, Quiblier C. Competition between microcystin- and non-microcystin-producing *Planktothrix agardhii* (cyanobacteria) strains under different environmental conditions. *Environ Microbiol* 2008;10(12):3337-48.
- Briand JF, Jacquet S, Flinois C, Avois-Jacquet C, Maissonnette C, Leberre B, et al. Variations in the microcystin production of *Planktothrix rubescens* (cyanobacteria) assessed from a four-year survey of Lac du Bourget (France) and from laboratory experiments. *Microb Ecol* 2005;50(3):418-28.
- Briand JF, Robillot C, Quiblier-Llobéras C, Humbert JF, Couté A, Bernard C. Environmental context of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanobacteria) blooms in a shallow pond in France. *Wat Res* 2002;36(13):3183-92.
- Brient L, Lengronne M, Bormans M, Fastner J. First occurrence of cylindrospermopsin in freshwater in France. *Environ Toxicol* 2009;24(4):415-20.
- Brunberg AC, Blomqvist P. Benthic overwintering of *Microcystis* colonies under different environmental conditions. *J Plank Res* 2002;24(11):1247-52.
- Campo E, Lezcano MA, Agha R, Cires S, Quesada A, El-Shehawy R. First TaqMan assay to identify and quantify the cylindrospermopsin-producing cyanobacterium *Aphanizomenon ovalisporum* in water. *Adv Microbiol* 2013;3:430-7.
- Capelli G, Mazza R, Di Corcia A. *Studio di caratterizzazione e relativo monitoraggio delle acque dei corpi idrici superficiali e delle falde soggiacenti le aree di ricarica del bacino lacustre di Vico. Relazione finale*. Roma: Università Roma Tre, Università La Sapienza, Regione Lazio; 2007.
- Carmichael WW, Evans WR, Yin QQ, Bell P, Moczydlowski E. Evidence for paralytic shellfish poisons in the freshwater cyanobacterium *Lyngbya wollei* (Farlow ex Gomont) comb. nov. *Appl Environ Microbiol* 1997;63:3104-10.
- Carneiro RL, dos Santos MEV, Pacheco ABF, Azevedo SMFdOe. Effects of light intensity and light quality on growth and circadian rhythm of saxitoxins production in *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanobacteria). *J Plank Res* 2009;31(5):481-8.
- Carneiro RL, Pacheco AB, de Oliveira e Azevedo SM. Growth and saxitoxin production by *Cylindrospermopsis raciborskii* (cyanobacteria) correlate with water hardness. *Mar Drugs* 2013;11(8):2949-63.
- Carraro E, Guyennon N, Hamilton D, Valsecchi L, Manfredi EC, Viviano G, Salerno F, Tartari G, Copetti D. Coupling high-resolution measurements to a three dimensional lake model to assess the spatial and temporal dynamics of the cyanobacterium *Planktothrix rubescens* in a medium-sized lake. *Hydrobiologia* 2012;698:77-95.
- Carvalho L, McDonald C, de Hoyos C, Mischke U, Phillips G, Borics G, Poikane S., Skjelbred B, Lyche Solheim A, Van Wichelen J, Cardoso AC. Sustaining recreational quality of European lakes: minimising the health risks from algal blooms through phosphorus control. *J Appl Ecol* 2013;50:315-23.
- Castro D, Vera D, Lagos N, García C, Vásquez M. The effect of temperature on growth and production of paralytic shellfish poisoning toxins by the cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* C10. *Toxicon* 2004;44(5):483-9.

- Cerasino L, Salmaso N. Diversity and distribution of cyanobacterial toxins in the Italian subalpine lacustrine district. *Oceanol Hydrobiol Studies* 2012;41:54-63.
- Chorus I (Ed.). *Current approaches to cyanotoxin risk assessment, risk management and regulations in different countries*. Dessau: Federal Environmental Agency; 2005.
- Chorus I, Bartram J (Ed.). *Toxic cyanobacteria in water: a guide to their public health consequences, monitoring and management*. London, New York: E&FN Spon; 1999. (Published on behalf of WHO)
- Collins R (Ed). *The European environment — state and outlook 2010. Freshwater quality (SOER 2010)*. Copenhagen: European Environmental Agency; 2010.
- Copetti D, Guzzella L, Mingazzini M, Vignati D, Mastroianni D, Tartari G, Palumbo MT, Valsecchi L, Guyennon N, Ghislanzoni L, Legnani D, Pozzoni F. *Studio limnologico e valutazione della produzione di microcistine associate a una intensa fioritura di P. rubescens nel Lago Occhito. Rapporto Finale*. Roma: IRSA-CNR; 2010.
- Copetti D, Valsecchi L, Ghislanzoni L, Pozzoni F, Carraro E, Guyennon N, Tartari G, Guzzella L. Intense *Planktothrix rubescens* blooms in a South Italy multiple-uses reservoir and their impact on the agricultural irrigation network. In: *Program and book of abstracts of the 16 the Workshop of the International Association of Phytoplankton Taxonomy and Ecology (IAP)*. San Michele all'Adige (Trento). 21-28 August, 2012, 27.
- Dasey M, Ryan N, Wilson J, McGregor G, Fabbro L, Neilan BA, Burns BP, Kankaanpaa H, Morrison LF, Codd GA, Rissik D, Bowling L. Investigations into the taxonomy, toxicity and ecology of benthic cyanobacterial accumulations in Myall Lake, Australia. *Mar Freshwater Res* 2005;56:45-55.
- Davis TW, Harke MJ, Marcoval MA, Goleski J, Orano-Dawson C, Berry DL, *et al*. Effects of nitrogenous compounds and phosphorus on the growth of toxic and non-toxic strains of *Microcystis* during cyanobacterial blooms. *Aquat Microb Ecol* 2010;61(2):149-62.
- De Pace R, Vita V, Bucci MS, Gallo P, Bruno M. Microcystin contamination in sea mussel farms from the Italian Southern Adriatic coast following cyanobacterial blooms in an artificial reservoir. *J Ecosyst* 2014; Article ID 374027. Disponibile all'indirizzo: <http://dx.doi.org/10.1155/2014/374027>, ultima consultazione 17/12/2014.
- Dias E, Pereira P, Franca S. Production of paralytic shellfish toxins by *Aphanizomenon* sp. LMECYA 31 (cyanobacteria). *J Phycol* 2002;38(4):705-12.
- Dokulil M, Mayer J. Population dynamics and photosynthetic rates of a *Cylindrospermopsis-Limnothrix* association in a highly eutrophic urban lake, Alte Donau, Vienna, Austria. *Algol Stud* 1996;83:179-95.
- Dyble J, Tester PA, Litaker RW. Effects of light intensity on cylindrospermopsin production in the cyanobacterial HAB species *Cylindrospermopsis raciborskii*. *African J Mar Sci* 2006;28(2):309-12.
- Edwards C, Beattie KA, Scrimgeour CM, Codd GA. Identification of anatoxin-A in benthic cyanobacteria (blue-green algae) and in associated dog poisonings at Loch Insh, Scotland. *Toxicol* 1992;30(10):1165-75.
- EEA. *European waters - assessment of status and pressures*. Copenhagen: European Environmental Agency; 2012. (EEA Report n. 8/2012).
- Ellwood NTW, Albertano P, Galvez R, Funicello R, Mosello R. Water chemistry and trophic evaluation of Lake Albano (Central Italy): a four year water monitoring study. *J. Limnol* 2009;68(2):288-303.
- Engström-Öst J, Repka S, Mikkonen M. Interactions between plankton and cyanobacterium *Anabaena* with focus on salinity, growth and toxin production. *Harmful Algae* 2011;10:530-5.
- Ernst B, Hoeger SJ, O'Brien E, Dietrich DR. Abundance and toxicity of *Planktothrix rubescens* in the pre-alpine Lake Ammersee, Germany. *Harmful Algae* 2009;8(2):329-42.

- Europa. Direttiva 2000/60/CE del Parlamento Europeo e del Consiglio del 22 ottobre 2000 che istituisce un quadro per l'azione comunitaria in materia di acque. *Gazzetta Ufficiale delle Comunità europee* n. L 327/1 del 22 dicembre 2000.
- Fastner J, Heinze R, Humpage AR, Mischke U, Eaglesham GK, Chorus I. Cylindrospermopsin occurrence in two German lakes and preliminary assessment of toxicity and toxin production of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanobacteria) isolates. *Toxicon* 2003;42(3):313-21.
- Fastner J, Neumann U, Wirsing B, Weackesser J. Microcystins (hepatotoxic heptapeptides) in German freshwater bodies. *Environ Toxicol* 1999;14:13-22.
- Ferranti P, Fabbrocino S, Cerulo MG, Bruno M, Serpe L, Gallo P. Characterisation of biotoxins produced by a cyanobacteria bloom in Lake Averno using two LC-MS-based techniques. *Food Additives and Contaminants*, 2008;25(12):1530-7.
- Ferranti P, Fabbrocino S, Nasi A, Caira S, Bruno M, Serpe L, Gallo P. Liquid chromatography coupled to quadruple time-of-flight tandem mass spectrometry for microcystin analysis in freshwaters: method performances and characterisation of a novel variant of microcystin-RR. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2009;23:1328-36.
- Funari E, Manganelli M, Scardala S, Stefanelli M, Palazzo F, Testai E, Gemma S, Vichi S. *Indagine per approfondire gli aspetti sanitari associati alle fioriture di Planktothrix rubescens nel Lago di Vico. Relazione finale*. Roma: Istituto Superiore di Sanità, Provincia di Viterbo; 2011.
- Gagnon A, Pick F. Effect of nitrogen on cellular production and release of the neurotoxin anatoxin-a in a nitrogen-fixing cyanobacterium. *Frontiers in Microbiol* 2012;3:Article 211.
- Gagnon A. *The cyanotoxin anatoxin-a: factors leading to its production and fate in freshwaters*. [Ph.D. Thesis]. Ottawa: Carleton Institute of Biology; 2012.
- Gallo P, Fabbrocino S, Cerulo MG, Ferranti P, Bruno M, Serpe L. Determination of cylindrospermopsin in freshwaters and fish tissue by liquid chromatography coupled to electrospray ion trap mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2009;23:3279-84.
- Garibaldi L, Buzzi F, Morabito G, Salmaso N, Simona M. I cianobatteri fitoplanctonici dei laghi profondi dell'Italia Settentrionale. In: Funari E (Ed.). *Aspetti sanitari della problematica dei cianobatteri nelle acque superficiali italiane*. Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2000. (Rapporti ISTISAN 00/30). p. 117-35.
- Godeas F. *Littoral epilithon of volcanic Lake Albano: seasonal variation of phototrophic biomass in relation to environmental variables*. PhD Thesis, Rome University of Rome Tor Vergata, 2012.
- Gugger M, Lenoir S, Berger C, Ledreux A, Druart J, Humbert J, et al. First report in a river in France of the benthic cyanobacterium Phormidium favosum producing anatoxin-a associated with dog neurotoxicosis. *Toxicon* 2005;45:919-28.
- Gumbo RJ, Ross G, Cloete ET. Biological control of Microcystis dominated harmful algal blooms. *Afr J Biotechnol* 2008;7(25):4765-73.
- Guzzella L, Ghislanzoni L, Pozzoni F, Valsecchi L, Copetti D. Cianobatteri e tossine algali nel lago di Occhito. *Acqua & Aria* 2011;4:6-21.
- Halinen K, Jokela J, Fewer DP, Wahlsten M, Sivonen K. Direct evidence for production of microcystins by *Anabaena* strains from the Baltic Sea. *App Environ Microbiol* 2007;73(20):6543-50.
- Heath MW, Wood SA, Ryan KG. Polyphasic assessment of fresh-water benthic mat-forming cyanobacteria isolated from New Zealand. *FEMS Microbiol Ecol* 2010;73(1):95-109.
- Henriksen P, Carmichael W, An J, Moestrup O. Detection of an anatoxin-a(s) like anticholinesterase in natural blooms and cultures of cyanobacteria blue-green algae from Danish Lakes and in the stomach contents of poisoned birds. *Toxicon* 1997;35(6):901-13.

- Hossaine Y, Jewel AS, Fulunda B, Ahamed F, Rahman S, Jasmine S, Ohtomi J. Dynamics of Cyanobacteria *Planktothrix* species (Oscillatoriales: Phormidiaceae) in Earthen fish ponds, Northwestern Bangladesh. *Sains Malaysiana* 2012;41(3):277-84.
- Hotto AM, Satchwell MF, Berry DL, Gobler CJ, Boyer GL. Spatial and temporal diversity of microcystins and microcystin-producing genotypes in Oneida Lake, NY. *Harm Algae* 2008;7(5):671-81.
- Italia. Decreto legislativo 3 aprile 2006, n. 152. Norme in materia ambientale. *Gazzetta Ufficiale* n. 88, del 14 aprile 2006.
- Izaguirre G, Jungblut A-D, Neilan BA. Benthic cyanobacteria (Oscillatoriaceae) that produce microcystin-LR, isolated from four reservoirs in southern California. *Wat Res* 2007;41(2):492-8.
- Jahnichen S, Ihle T, Petzoldt T, Benndorf J. Impact of inorganic carbon availability on microcystin production by *Microcystis aeruginosa* PCC 7806. *Appl Environ Microbiol* 2007;73(21):6994-7002.
- James K, Crowley J, Hamilton B, Lehane M, Skulberg O, Furey A. Anatoxins and degradation products, determined using hybrid quadrupole time-of-flight and quadrupole ion-trap mass spectrometry: forensic investigations of cyanobacterial neurotoxin poisoning. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2005;19:1167-75.
- Kaas H, Henriksen P. Saxitoxins (PSP toxins) in Danish lakes. *Wat Res* 2000;34(7):2089-97.
- Kahru M. Using satellites to monitor large-scale environmental change in the Baltic Sea. In: Kahru M, Brown CW (Ed.). *Monitoring algal blooms: new techniques for detecting large-scale environmental change*. Berlin: Springer-Verlag; 1997. p. 43-61
- Karlsson KM, Kankaanpää H, Huttunen M, Meriluoto J. First observation of microcystin-LR in pelagic cyanobacterial blooms in the northern Baltic Sea. *Harmful Algae* 2005;4:163-6.
- Kokociński M, Dziga D, Spooł L, Stefaniak K, Jurczak T, Mankiewicz-Boczek J, Meriluoto J. First report of the cyanobacterial toxin cylindrospermopsin in the shallow, eutrophic lakes of western Poland. *Chemosphere* 2009;74(5):669-675.
- Kokociński M, Mankiewicz-Boczek J, Jurczak T, Spooł L, Meriluoto J, Rejmonczyk E, Hautala H, Vehniäinen M, Pawełczyk J, Soininen J. *Aphanizomenon gracile* (Nostocales), a cylindrospermopsin producing cyanobacterium in Polish lakes. *Environ Sci Pollut Res* 2013;20:5243-64.
- Kokociński M, Soininen J. Environmental factors related to the occurrence of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Nostocales, Cyanophyta) at the north-eastern limit of its geographical range. *Eur J Phycol* 2012;47:12-21.
- Kurmayer R, Christiansen G, Fastner J, Borner T. Abundance of active and inactive microcystin genotypes in populations of the toxic cyanobacterium *Planktothrix* spp. *Environ Microbiol* 2004;6(8):831-41.
- Kurmayer R, Christiansen G, Gumpenberger M, Fastner J. Genetic identification of microcystin ecotypes in toxic cyanobacteria of the genus *Planktothrix*. *Microbiology*. 2005;151(Pt 5):1525-33.
- Laamanen M, Kuosa H. Annual variability of biomass and heterocysts of the N<sub>2</sub>-fixing cyanobacterium *Aphanizomenon flos-aquae* in the Baltic Sea with reference to *Anabaena* spp. and *Nodularia spumigena*. *Boreal Env Res* 2005;10:19-30.
- Lagos N, Onodera H, Zagatto P, Andrinolo D, Azevedo S, Oshima Y. The first evidence of paralytic shellfish toxins in the freshwater cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii*, isolated from Brazil. *Toxicon* 1999;37:1359-73.
- Latour D, Giraudet H. Factors influencing the spatio-temporal distribution of benthic *Microcystis aeruginosa* colonies (Cyanobacteria) in the hypertrophic Grangent Reservoir (Loire, France). *C R Biol* 2004;327(8):753-61.

- Legnani E, Copetti D, Oggioni A, Tartari G, Palumbo MT, Morabito G. *Planktothrix rubescens*' seasonal and spatial distribution in Lake Pusiano (North Italy). *J Limnol* 2005;64:61-73.
- Lindholm T, Vesterkvist P, Spoof L, Lundberg-Niinistö C, Meriluoto J. Microcystin occurrence in lakes in Åland, SW Finland. *Hydrobiologia* 2003;505:129-38.
- Lopes VR, Fernandez N, Martins RF, Vasconcelos V Primary screening of the bioactivity of brackishwater cyanobacteria: toxicity of crude extract to *Artemia salina* larvae and *Paracentrotus lividus* embryos. *Mar drugs* 2010;8:471-82.
- Lugliè A, Manca B, Sechi N. Studi limnologici sul Lago Alto Flumendosa (Sardegna centrale): stato trofico e fitoplancton. *Bollettino della Società sarda di scienze naturali*, 1997;31:83-100.
- Manganelli M, Scardala S, Stefanelli M, Palazzo F, Funari E, Vichi S, Buratti FM, Testai E. Emerging health issues of cyanobacterial blooms. *Ann Ist Super Sanità* 2012;48(4):415-28.
- Manganelli M, Scardala S, Stefanelli M, Vichi S, Mattei D, Bogialli S, Ceccarelli P, Corradetti E, Petrucci I, Gemma S, Testai E, Funari E. Health risk evaluation associated to *Planktothrix rubescens*: An integrated approach to design tailored monitoring programs for human exposure to cyanotoxins. *Wat Res* 2010;44(5):1297-1306.
- Mankiewicz-Boczek J, Kokociński M, Gągała I, Pawełczyk J, Jurczak T, Dziadek J. Preliminary molecular identification of cylindrospermopsin-producing Cyanobacteria in two Polish lakes (Central Europe). *FEMS Microbiol Lett* 2012;326:173-9.
- Manti G, Mattei D, Messineo V, Melchiorre S, Bogialli S, N. Sechi, Casiddu P, Lugliè A, Di Brizio M, Bruno, M. First report of *Cylindrospermopsis raciborskii* in Italy. *Harmful Algae News*, 2005;28:8-9.
- Margaritora FG, Fumanti B, Alfinito S, Tartari G, Vagaggini D, Seminara M, Cavacini P, Vuillermoz E, Rosati M. Trophic condition of the volcanic Lake Nemi (Central Italy): environmental factors and planktonic communities in a changing environment. *J Limnol*, 2005;64(2):119-128.
- Mazur H, Pliński M, *Nodularia spumigena* blooms and the occurrence of hepatotoxin in the Gulf of Gdańsk. *Oceanologia* 2003;45:305-16.
- Mejean A, Mann S, Maldiney T, Vassiliadis G, Lequin O, Ploux O. Evidence that biosynthesis of the neurotoxic alkaloids anatoxin-a and homoanatoxin-a in the cyanobacterium *Oscillatoria* PCC 6506 occurs on a modular polyketide synthase initiated by L-proline. *J Am Chem Soc* 2009;131(22):7512-3.
- Meregalli M, Trebini F, Manca B, Lugliè A. Stato trofico e fitoplancton nel Lago Alto Flumendosa. *Atti della Associazione italiana Oceanologia Limnologia*, 2002;15:87-96.
- Merel S, Walker D, Chicana R, Snyder S, Baurès E, Thomas O. State of knowledge and concerns on cyanobacterial blooms and cyanotoxins. *Environ Int* 2013;59:303-27
- Messineo V, Bogialli S, Melchiorre S, Sechi N, Lugliè A, Casiddu P, Mariani MA, Padedda BM, Di Corcia A, Mazza R, Carloni E, Bruno M. Cyanobacterial toxins in Italian freshwaters. *Limnologica* 2009;39:95-106.
- Messineo V, Mattei D, Melchiorre S, Salvatore G, Bogialli S, Salzano R, Mazza R, Capelli G, Bruno M. Microcystin diversity in a *Planktothrix rubescens* population from Lake Albano (Central Italy). *Toxicon*, 2006;48:160-174.
- Messineo V, Melchiorre S, Di Corcia A, Gallo P, Bruno M. Seasonal succession of *Cylindrospermopsis raciborskii* and *Aphanizomenon ovalisporum* blooms with cylindrospermopsin occurrence in the volcanic Lake Albano, Central Italy. *Environ Toxicol*, 2010;25(1):18-27.
- Metcalf JS, Morrison LF, Krienitz L, Ballot A, Krause E, Kotut K, *et al.* Analysis of the cyanotoxins anatoxin-a and microcystins in Lesser Flamingo feathers. *Toxicol Environ Chem* 2006;88(1):159-67.

- Mez K, Beattie K, Codd G, Hanselmann K, Hauser B, Naegeli H, *et al.* Identification of microcystin in benthic cyanobacteria linked to cattle deaths on alpine pastures in Switzerland. *Europ J Phycol* 1997;32(2):111-7.
- Mez K, Hanselmann K, Preisig HR Environmental conditions in high mountain lakes containing toxic benthic cyanobacteria. *Hydrobiologia* 1998;368:1-15.
- Ministero della Salute. Decreto 30 marzo 2010. Definizione dei criteri per determinare il divieto di balneazione, nonché modalità e specifiche tecniche per l'attuazione del decreto legislativo 30 maggio 2008, n. 116, di recepimento della direttiva 2006/7/CE, relativa alla gestione della qualità delle acque di balneazione. *Gazzetta Ufficiale - Serie Generale* n. 119, del 24 maggio 2010.
- Mohamed ZA, El-Sharouny HM, Ali WSM. Microcystin concentrations in the Nile River sediments and removal of microcystin-LR by sediments during batch experiments. *Arch Environ Contam Toxicol* 2007;52:489-95.
- Mohamed ZA, El-Sharouny HM, Ali WSM. Microcystin production in benthic mats of cyanobacteria in the Nile River and irrigation canals, Egypt. *Toxicon* 2006;47(5):584-90.
- Mosello R, Ambrosetti W, Arisci S, Bettinetti R, Buzzi F, Calderoni A, Carrara E, De Bernardi R, Galassi S, Garibaldi L, Leoni B, Manca M, Marchetto A, Morabito G, Oggioni A, Pagnotta R, Ricci D, Rogora M, Salmaso N, Simona M, Tartari G, Veronesi M, Volta P. Evoluzione recente della qualità delle acque dei laghi profondi sudalpini (Maggiore, Lugano, Como, Iseo e Garda) in risposta alle pressioni antropiche e alle variazioni climatiche. *Biologia Ambientale* 2010;24:167-77.
- Naselli-Flores L, Barone R, Chorus I, Kurmayer R. Toxic cyanobacterial blooms in reservoirs under a semiarid mediterranean climate: the magnification of a problem. *Environ Toxicol* 2007;22:399-404.
- Naselli-Flores L, Barone R. Pluriannual morphological variability of phytoplankton in a highly productive Mediterranean reservoir (Lake Arancio, Southwestern Sicily). *Hydrobiologia* 2007;578:87-95.
- Naselli-Flores L, Barone R. Steady-state assemblages in a Mediterranean hypertrophic reservoir. The role of *Microcystis* ecomorphological variability in maintaining an apparent equilibrium. *Hydrobiologia* 2003;502:133-43.
- Naselli-Flores L, Barone R. Water-level fluctuations in Mediterranean reservoirs: setting a dewatering threshold as a management tool to improve water quality. *Hydrobiologia* 2005;548:85-99.
- Naselli-Flores L. Morphological analysis of phytoplankton as a tool to assess the ecological state of aquatic ecosystems. the case of Lake Arancio, Sicily, Italy. *Inland Waters* 2014;4(1):15-26.
- Neilan BA, Pearson LA, Muenchhoff J, Moffitt MC, Dittmann E. Environmental conditions that influence toxin biosynthesis in cyanobacteria. *Environ Microbiol* 2013;15(5):1239-53.
- Oh H-M, Lee SJ, Jang M-H, Yoon B-D. Microcystin Production by *Microcystis aeruginosa* in a Phosphorus-Limited Chemostat. *Appl Environ Microbiol* 2000;66(1):176-9.
- Okello W, Portmann C, Erhard M, Gademann K, Kurmayer R. Occurrence of microcystin-producing cyanobacteria in Ugandan freshwater habitats. *Environ Toxicol* 2010;25(4):367-80.
- Onodera H, Oshima Y, Henriksen P, Yasumoto T. Confirmation of anatoxin-a(s), in the cyanobacterium *Anabaena lemmermannii*, as the cause of bird kills in Danish lakes. *Toxicon* 1997;35:1645-8.
- Orr PT, Jones GJ. Relationship between microcystin production and cell division rates in nitrogen-limited *Microcystis aeruginosa* cultures. *Limnol Oceanogr* 1998;43(7):1604-14.
- Ostermaier V, Schanz F, Köster O, Kurmayer R. Stability of toxin gene proportion in red-pigmented populations of the cyanobacterium *Planktothrix* during 29 years of re-oligotrophication of Lake Zürich. *BMC Biology* 2012;10:100-16.
- Oudra B, Loudiki M, Vasconcelos V, Sabour B, Sbiyyaa B, Oufdou K, Mezriouli N. Detection and quantification of microcystins from cyanobacteria strains isolated from reservoirs and ponds in Morocco. *Environ Toxicol* 2002;17:32-9.

- Paerl H W, Hall N S, Calandrino E S. Controlling harmful cyanobacterial blooms in a world experiencing anthropogenic and climatic-induced change. *Sci Tot Environ* 2011;409:1739-45.
- Piccini C, Aubriot L, D'Alessandro B, Martigani F, Bonilla S. Revealing toxin signatures in cyanobacteria: report of genes involved in cylindrospermopsin synthesis from saxitoxin-producing *Cylindrospermopsis raciborskii*. *Advanc Microbiol* 2013;3:289-96.
- Pomati F, Rossetti C, Manarolla G, Burns BP, Neilan BA. Interactions between intracellular Na<sup>+</sup> levels and saxitoxin production in *Cylindrospermopsis raciborskii* T3. *Microbiology* 2004;150(2):455-61.
- Preußel K, Stüken A, Wiedner C, Chorus I, Fastner J. First report on cylindrospermopsin producing *Aphanizomenon flos-aquae* (Cyanobacteria) isolated from two German lakes. *Toxicon* 2006;47(2):156-62.
- Preußel K, Wessel G, Fastner J, Chorus I. Response of cylindrospermopsin production and release in *Aphanizomenon flos-aquae* (Cyanobacteria) to varying light and temperature conditions. *Harmful Algae* 2009;8(5):645-50.
- Puschner B, Hoff B, Tor ER. Diagnosis of anatoxin-a poisoning in dogs from North America. *J Vet Diagn Invest* 2008;20(1):89-92.
- Quesada A, Sanchis D, Carrasco D. Cyanobacteria in Spanish reservoirs. How frequently are they toxic? *Limnetica* 2004;23(1-2):109-18.
- Quiblier C, Wood S, Echenique-Subiabre I, Heath M, Villeneuve A, Humbert JF. A review of current knowledge on toxic benthic freshwater cyanobacteria- Ecology, toxin production and risk management. *Wat Res* 2013;47:5464-79.
- Rantala-Ylinen A, Känä S, Wang H, Rouhiainen L, Wahlsten M, Rizzi E, Berg K, Gugger M, Sivonen K. Anatoxin-a Synthetase gene cluster of the cyanobacterium *Anabaena* sp. strain 37 and molecular methods to detect potential producers. *Appl Environ Microbiol* 2011;77(29):7271-8.
- Rapala J, Robertson A, Negri A, Berg K, Tuomi P, Lyra C, *et al.* First report of saxitoxin in Finnish lakes and possible associated effects on human health. *Environ Toxicol* 2005;20:331-40.
- Rapala J, Sivonen K, Luukkainen R, Niemelä SI. Anatoxin-a concentration in *Anabaena* and *Aphanizomenon* under different environmental conditions and comparison of growth by toxic and non-toxic *Anabaena* strains — a laboratory study. *J Appl Phycol* 1993;5(6):581-91.
- Rapala J, Sivonen K, Lyra C, Niemela S. Variation of microcystins, cyanobacterial hepatotoxins, in *Anabaena* spp. as a function of growth stimuli. *Appl Environ Microbiol* 1997;63(6):2206-12.
- Rapala J, Sivonen K. Assessment of environmental conditions that favour hepatotoxic and neurotoxic *Anabaena* spp strains cultured under light limitation at different temperatures. *Microb Ecol* 1998;36:181-92.
- Ravera O, Vollenweider RA. *Oscillatoria rubescens* D.C. as an indicator of Lago Maggiore eutrophication. *Schweiz Zeit Hydrol* 1968;30:374-80.
- Regione Lazio. Decreto Presidente Regione Lazio 24 aprile 2014, n. T00122. Individuazione e classificazione delle acque destinate alla balneazione e dei punti di monitoraggio, ai sensi del D.Lgs 116/08 e del Decreto attuativo 30.03.2010. Stagione balneare 2014. *Bollettino Ufficiale Regione Lazio* n. 36, 6 maggio 2014. p. 8.
- Sabart M, Pobel D, Briand E, Combourieu B, Salenc M J, Humbert J F, Latour D. Spatiotemporal variations in microcystin concentrations and in the proportions of microcystin-producing cells in several *Microcystis aeruginosa* populations. *Appl Environ Microbiol* 2010;76(14):4750-9.
- Saker ML, Griffiths DJ. The effect of temperature on growth and cylindrospermopsin content of seven isolates of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Nostocales, Cyanophyceae) from water bodies in northern Australia. *Phycologia* 2000;39(4):349-54.

- Saker ML, Neilan BA. Varied diazotrophies, morphologies, and toxicities of genetically similar isolates of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Nostocales, Cyanophyceae) from Northern Australia. *Appl Environ Microbiol* 2001;67(4):1839-45.
- Saker ML, Nogueira IC, Vasconcelos VM, Neilan BA, Eaglesham GK, Pereira P. First report and toxicological assessment of the cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* from Portuguese freshwaters. *Ecotoxicol Environ Safe* 2003;55(2):243-50.
- Salmaso N, Boscaini A, Shams S, Cerasino L. Strict coupling between the development of *Planktothrix rubescens* and microcystin quota in two nearby lakes south of the Alps (lakes Garda and Ledro). *Ann Limnol - Int J Limnol* 2013;49(4):309-18.
- Salmaso N, Buzzi F, Garibaldi L, Morabito G, Simona M. Effects of nutrient availability and temperature on phytoplankton development: A case study from large lakes south of the Alps. *Aquatic Sciences* 2012;74:555-70.
- Salmaso N, Cavolo F, Cordella P. Fioriture di *Anabaena* e *Microcystis* nel Lago di Garda. Eventi rilevati e caratterizzazione dei periodi di sviluppo. *Acqua & Aria* 1994;1:17-28.
- Scardala S, Stefanelli M, Palazzo F, Orrù A, Cabras P, Vichi S, Testai E, Funari E, Manganelli M. Microcystin congeners profiles in Alto Flumendosa Lake (Sardinia, Italy): their importance in monitoring programs. In: *Abstract book of the 9th International Conference on Toxic Cyanobacteria*, Pilanesberg, South Africa, 11-16 August 2013. Port Elizabeth, South Africa: Nelson Mandela Metropolitan University; 2013. p. 103.
- Schatz D, Keren Y, Vardi A, Sukenik A, Carmeli S, Borner T, *et al.* Towards clarification of the biological role of microcystins, a family of cyanobacterial toxins. *Environ Microbiol* 2007;9(4):965-70.
- Seifert M, McGregor G, Eaglesham G, Wickramasinghe W, Shaw G. First evidence for the production of cylindrospermopsin and deoxy-cylindrospermopsin by the freshwater benthic cyanobacterium, *Lyngbya wollei* (Farlow ex Gomont) Speziale and Dyck. *Harmful Algae* 2007;6(1):73-80.
- Shalev-Malul G, Lieman-Hurwitz J, Viner-Mozzini Y, Sukenik A, Gaathon A, Lebendiker M, *et al.* An AbrB-like protein might be involved in the regulation of cylindrospermopsin production by *Aphanizomenon ovalisporum*. *Environ Microbiol* 2008;10(4):988-99.
- Simoni F, di Paolo C, Mancino A, Simoni F, Falaschi A. Microcystin concentrations in water and ichthyofauna of Massaciuccoli Wetlands (Tuscany). *Harmful Algae News* 2004;25:4-6.
- Sivonen K, Jones G. Cyanobacterial toxins. In: Chorus I, Bartram J (Ed.). *Toxic cyanobacteria in water: a guide to their public health consequences, monitoring and management*. London, New York: E&FN Spon; 1999. (Published on behalf of WHO). p. 41-111.
- Sivonen K, Kononen K, Carmichael WW, Dahlem AM, Rinehart KL, Kiviranta J, Niemela SI. Occurrence of the hepatotoxic cyanobacterium *Nodularia spumigena* in the Baltic Sea and structure of the toxin. *Appl Environ Microbiol* 1989;55:1990-5.
- Stal LJ, Albertano P, Bergman B, von Bröckel K, Gallon JR, Hayes PK, Sivonen K, Walsby AE. BASIC: Baltic Sea cyanobacteria. An investigation of the structure and dynamics of water blooms of cyanobacteria in the Baltic Sea—responses to a changing environment. *Continental Shelf Res* 2003;23:1695-714.
- Stucken K, John U, Cembella A, Murillo AA, Soto-Liebe K, Fuentes-Valdés JJ, *et al.* The smallest known genomes of multicellular and toxic cyanobacteria: comparison, minimal gene sets for linked traits and the evolutionary implications. *PLoS ONE* 2010;5(2):e9235.
- Stüken A, Campbell RJ, Quesada A, Sukenik A, Dadheech PK, Wiedner C. Genetic and morphologic characterization of four putative cylindrospermopsin producing species of the cyanobacterial genera *Anabaena* and *Aphanizomenon*. *J Plank Res* 2009;31(5): 465-480.
- Surakka A, Sihvonen LM, Lehtimäki JM, Vuorela P, Sivonen K. Benthic cyanobacteria from the Baltic Sea contain cytotoxic *Anabaena*, *Nodularia*, and *Nostoc* strains and an apoptosis-inducing *Phormidium* strain. *Environ Toxicol* 2005;20:285-92.

- Tan X. Comparison of benthic recruitment with pelagic growth of bloom-forming cyanobacteria. *African J Microbiol Res* 2012;6(14):3425-30.
- Tin T. Mediterranean and climate change. In: *Proceedings of the Workshop Mediterranean: Water and Drought*, Zaragoza (Spain), February 23-24, 2006. Sevilla: CENTA; 2006.
- Torres GS, Adamek Z. Factors promoting the recruitment of benthic cyanobacteria resting stages: a review. *Croatian J Fisheries* 2013;71:182-6.
- USEPA. *National Lakes Assessment: A Collaborative Survey of the Nation's Lakes*. U.S. Environmental Protection Agency, Office of Water and Office of Research and Development, Washington, D.C. 2009.
- Valerio E, Chambel L, Paulino S, Faria N, Pereira P, Tenreiro R. Molecular identification, typing and traceability of cyanobacteria from freshwater reservoirs. *Microbiol* 2009;155(2):642-56.
- Van de Waal DB, Verspagen JMH, Finke JF, Vournazou V, Immers AK, Kardinaal WEA, *et al.* Reversal in competitive dominance of a toxic versus non-toxic cyanobacterium in response to rising CO<sub>2</sub>. *ISME J* 2011;5:1438-50.
- Vehovszky Á, Kovács AW, Farkas A, Győri J, Szabó H, Vasas G. Pharmacological studies confirm neurotoxic metabolite(s) produced by the bloom-forming *Cylindrospermopsis raciborskii* in Hungary. *Environ Toxicol* 2013:n/a-n/a.
- Verspagen JMH, Snelder EOFM, Visser PM, Huisman J, Mur LR, Ibelings BW. Recruitment of benthic microcystis (cyanophyceae) to the water column: internal buoyancy changes or resuspension? *J Phycol* 2004;40:260-70.
- Viaggiu E, Morabito G, Della Libera S. Specie tossiche. In: Lucentini L, Ottaviani M (Ed.). *Cianobatteri in acque destinate a consumo umano. Stato delle conoscenze per la valutazione del rischio. Volume 1*. Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2011. (Rapporti ISTISAN 11/35 Pt. 1). p. 11-25.
- Volante M, Fumagalli R, Girola A, Rotasperti A, Giovenzana S, Cuda S, Mirrione M, Lotta MD, Lombardini M, Farsaci C. Monitoraggio di tossine algali nei laghi mediante tecnica HPLC con estrazione SPE "on-line". 2012 *Bollettino degli Esperti Ambientali* Anno 63 2012/2.
- Wacklin P, Hoffmann L, Komárek J. Nomenclatural validation of the genetically revised cyanobacterial genus *Dolichospermum* (Ralfs ex Bornet et Flahault) comb. nova. *Fottea* 2009;9(1):59-64.
- WHO. *Guidelines for safe recreational water environment. Volume 1, Coastal and fresh waters*. Geneva: World Health Organization; 2003.
- Wood SA, Heath MW, Holland PT, Munday R, McGregor G, Ryan KG. Identification of a benthic microcystin producing filamentous cyanobacterium (Oscillatoriales) associated with a dog poisoning in New Zealand. *Toxicon* 2010;55:897-903.
- Wood SA, Rasmussen JP, Holland PT, Campbell R, Crowe ALM. First report of the cyanotoxin anatoxin-a from *Aphanizomenon issatschenkoi* (cyanobacteria). *J Phycol* 2007;43(2):356-65.
- Wood SA, Rueckert A, Hamilton DP, Cary SC, Dietrich DR. Switching toxin production on and off: intermittent microcystin synthesis in a *Microcystis* bloom. *Environ Microbiol Rep* 2011;3(1):118-24.
- Xu Y, Wu Z, Yu B, Peng X, Yu G, Wei Z, Wang G, Li R. Non-microcystin producing *Microcystis wesenbergii* (Komárek) Komárek (Cyanobacteria) representing a main waterbloom-forming species in Chinese waters. *Environ Pollut* 2008;156:162-7.
- Yunes JS, De La Rocha S, Giroldo D, Silveira SBd, Comin R, Bicho MdS, *et al.* Release of carbohydrates and proteins by a subtropical strain of *Raphidiopsis brookii* (Cyanobacteria) able to produce saxitoxin at three nitrate concentrations. *J Phycol* 2009;45(3):585-91.
- Zilliges Y, Kehr J-C, Meissner S, Ishida K, Mikkat S, Hagemann M, *et al.* The cyanobacterial hepatotoxin microcystin binds to proteins and increases the fitness of *Microcystis* under oxidative stress conditions. *PLoS ONE* 2011;6(3):e17615.