FONDAZIONE INIZIATIVE ZOOPROFILATTICHE E ZOOTECNICHE
BRESCIA

ALLE ORIGINI DELLA VITA: LE ALGHE

Maurizio Zavanella

97

EDITO A CURA DELLA
FONDAZIONE INIZIATIVE ZOOPROFILATTICHE
E ZOOTECNICHE - BRESCIA

ALLE ORIGINI DELLA VITA:
LE ALGHE

FONDAZIONE INIZIATIVE ZOOPROFILATTICHE E ZOOTECNICHE
- BRESCIA -

Direttore scientifico: Prof. E. LODETTI

ALLE ORIGINI DELLA VITA:
LE ALGHE

MAURIZIO ZAVANELLA

Collaboratori:

GIUSEPPE ARCANGELI
EMANUELA VIAGGIU
SONIA FLAMINIA LAVAGNOLI
DARIA BARBERIS
ALESSANDRA MARINO
CLAUDIO MACCA
DANIELA DAGRADI

EDITO A CURA DELLA
FONDAZIONE INIZIATIVE ZOOPROFILATTICHE
E ZOOTECNICHE - BRESCIA
Via Istria, 3/b - 25125 Brescia
www.fondiz.it

La seconda parte e l'appendice di questo quaderno
sono stampate su Shiro Alga Carta Favini.

FAVINI

Una parte di questo quaderno è stata stampata su Shiro Alga Carta
nata dalle alghe infestanti della Laguna di Venezia; è una carta ecologica unica;
offre infatti una soluzione innovativa brevettata da FAVINI
per la protezione di fragili ecosistemi lagunari.
Le alghe eccedenti vengono mescolate con fibre certificate FSC®.

www.favini.com

ISBN 978-88-97562-11-5

© Fondazione Iniziative Zooprofilattiche e Zootecniche - Brescia, marzo 2015

Tipografia Camuna - Brescia 2015

NOTE BIOGRAFICHE DEGLI AUTORI

MAURIZIO ZAVANELLA Laureato in Scienze Biologiche a Padova, ha diretto il Dipartimento di Batteriologia dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia-Romagna, avviando nel 1976 il Reparto di Microbiologia degli Alimenti, dotato di un laboratorio d'analisi biologiche e immunologiche sulle biotossine marine.

maurizio.zavanella@libero.it

GIUSEPPE ARCANGELI Ha conseguito la laurea in Medicina Veterinaria presso l'Università di Milano nel 1987. Da dicembre 2006 è Responsabile del Laboratorio Igiene della Trasformazione dei Prodotti della Pesca dell'IZS delle Venezie - Adria (Rovigo). Da luglio 2009 è Responsabile del Laboratorio di Referenza Nazionale di Patologia dei Molluschi. Da gennaio 2012 è Direttore del Centro di Referenza Nazionale per lo studio e la diagnosi delle malattie dei pesci, molluschi e crostacei - Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie – Legnaro (Padova). *garcangeli@izsvenezie.it*

EMANUELA VIAGGIU Laureata in Scienze Biologiche presso l'Università "Tor Vergata" di Roma nel 1997, ha conseguito nel 2009 il Dottorato di Ricerca in Biologia Evoluzionistica ed Ecologia. È legale rappresentante presso la Società AlgaRes srl, *Spin Off* dell'Università degli Studi di Roma "Tor Vergata".

Vanta numerosi incarichi di collaborazione professionale presso la medesima Università e presso l'Istituto Superiore di Sanità, dove ha lavorato in particolare sulle microalghe tossiche in acque dolci. *viaggiu@uniroma2.it*

SONIA FLAMINIA LAVAGNOLI Laureata in Medicina Veterinaria all'Università di Parma, dopo il Diploma di Perfezionamento in Zooprofilassi presso la Scuola per la Ricerca Scientifica di Brescia, ha ottenuto le Specializzazioni in Igiene e Tecnologia delle Carni, Sanità Pubblica Veterinaria e in Legislazione Veterinaria all'Università di Milano.

È Dirigente Veterinario dell'Azienda ULSS 20 di Verona – Servizio di Igiene degli Allevamenti e Produzioni Zootecniche - dove lavora con particolare interesse per il benessere animale e la compatibilità ambientale degli allevamenti zootecnici. *sonia.lavagnoli@alice.it*

DARIA BARBERIS Laureata in Scienze Biologiche all'Università di Milano, con Specializzazioni in Microbiologia e Virologia e in Biochimica e Chimica Clinica.

Dirige l'U.O. di Chimica presso il Laboratorio di Sanità Pubblica dell' ASL di Brescia.

daria.barberis@aslbrescia.it

ALESSANDRA MARINO Laureata in Chimica all'Università di Pavia con Specializzazione in Metodologie chimiche di controllo ed analisi presso l'Università di Bologna, lavora presso il Laboratorio di Sanità Pubblica dell'ASL di Brescia. *alessandra.marino@aslbrescia.it*

CLAUDIO MACCA Medico Responsabile dell'Unità di Dietetica e Nutrizione Clinica degli Spedali Civili di Brescia. Specializzato in Medicina Interna e in Endocrinologia, è Docente nei Corsi di Specializzazione della Facoltà di Medicina e Chirurgia dell'Università degli Studi di Brescia.

Presidente ADI Lombardia (ADI - Associazione Italiana di Dietetica e Nutrizione Clinica) e Fondatore della Filosofia Dietetica CucinaLineareMetabolica (*www.cucinalineareme-tabolica.it*).

DANIELA DAGRADI Laureata nel 1974 in Farmacia presso l'Università di Milano, con abilitazione a Trieste. Ha seguito Corsi di Medicina Naturale, Fitoterapia, Alimentazione e Omeopatia in tutta la carriera di Farmacista titolare e collaboratrice, nonché Scuole tenute da Docenti Universitari di Trieste, Siena, Milano.

Viaggiatrice di vocazione, ha al suo attivo mezzo giro del mondo in barca a vela, toccando luoghi da cui ha appreso la farmacognosia autoctona.

Tiene conferenze di fitoterapia e nutrizione in circoli culturali, all'Ateneo di Brescia presso il Gruppo Naturalistico. Con aziende del settore naturale tiene corsi per Farmacisti. Collabora attualmente presso la Farmacia Schiavo di Brescia. *dagradi.d@gmail.com*

PRESENTAZIONE

"Le alghe": un titolo che forse evoca
solo immagini (e ricordi) di vacanze
al mare o sui laghi!
Ma il "quaderno" percorre vie
meno romantiche e più concrete,
sulle quali biologi e chimici
stanno già camminando per conoscere
meglio e dominare un fantastico
mondo che nasce dall'acqua.
Qualcosa di millenario, che assomiglia
tanto al nostro futuro…

Il Segretario Generale
dr. Stefano Capretti

INDICE

PARTE PRIMA

Capitolo 1
Alghe e microalghe: produzione, raccolta e prodotti derivati 3

Capitolo 2
Microalghe nelle acque marine e dolci in Italia 11

Capitolo 3
Le biotossine algali 25

Capitolo 4
Utilizzo delle alghe in alimentazione umana, zootecnia, agricoltura, farmacologia e cosmesi, energie alternative, edilizia e altri usi 117

PARTE SECONDA - Metodi di laboratorio

A - *Diagnosi delle biotossine di origine algale* 163

B - *Controllo delle alghe nelle acque* 189

C - *Le alghe in laboratorio: coltura e osservazione delle microalghe* 199

D - *I Cianobatteri: ai confini della microbiologia* 211

Osservazioni personali sui Cianobatteri 229

APPENDICE

Le alghe in cucina 239

PREFAZIONE

Migliaia di specie di alghe popolano mari e laghi del nostro pianeta, interagendo con gli altri organismi dell'ecosistema, tra cui i batteri.

Alcune, di piccole dimensioni, le microalghe, sono quelle più coinvolte dal punto di vista medico-scientifico. Possono invadere la superficie delle acque, contaminando con potenti biotossine patogene pesci, crostacei e molluschi, che diventano occasionalmente alimenti pericolosi per l'uomo.

Questo non avviene sempre. Difatti, grazie a un elevato contenuto di proteine e carboidrati, con le alghe si preparano cibi per l'uomo e mangimi per gli animali, pratica nota anticamente presso popolazioni dell'Africa e del Centro America.

Inoltre, con l'aiuto della chimica, vengono ricavati farmaci, cosmetici, reagenti e… la carta di questo quaderno!

Le alghe sono una risorsa alternativa non trascurabile nel panorama delle fonti rinnovabili d'energia, perché già adesso servono a produrre *biogas* e *biodiesel*: in futuro, forse, riscalderanno le pareti di vetro delle case attraverso la fotosintesi !

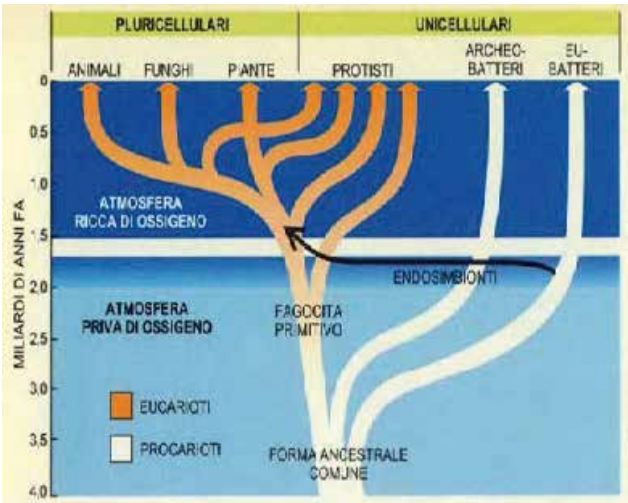
Motivi sufficienti per stimolare una maggior conoscenza di questi esseri viventi, sia negli aspetti negativi che positivi di oggi e, soprattutto, di domani.

Sicuri che non finiranno mai di stupirci.

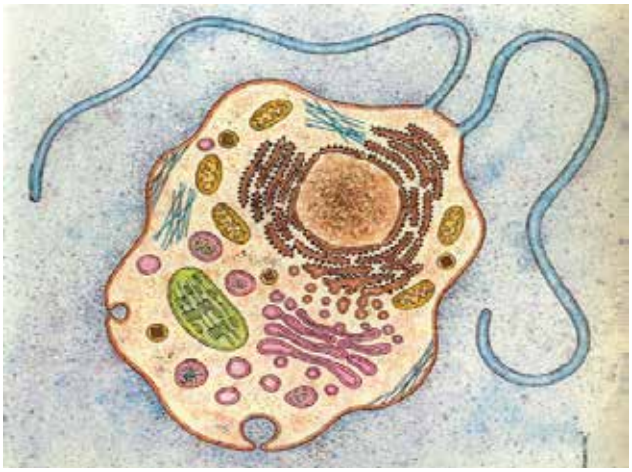
NOTA SUL TITOLO DEL QUADERNO

"*Alle origini della vita: le alghe*" assomiglia al titolo di un libro importante, nel quale il biochimico belga **Christian de Duve** (1917-2013, Premio Nobel 1974 per la Medicina) si propone di chiarire il suo pensiero sulle origini della vita.

Uscito nel 2005 con il titolo *Singularities: Landmarks on the Pathways of Life*, il libro di de Duve ipotizza l'esistenza di un "*ultimo progenitore universale comune*", dal quale sarebbero derivati tutti gli organismi viventi. Essi dipenderebbero da processi di biosintesi comuni, anche se variamente modificati ed avrebbero un codice genetico comune, pur con differenze più o meno grandi fra le varie unità tassonomiche. Le sue idee erano già presenti in precedenti lavori.



Christian de Duve – La nascita delle cellule eucariote, Le Scienze 1996, 334, 44.



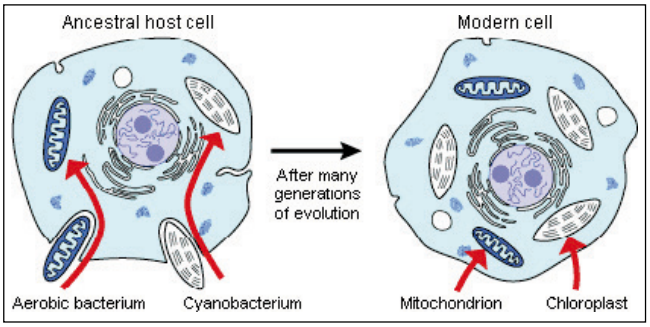
"Advanced form of life existed on earth 3,5 billion years ago. In rocks of that age, fossilized imprints have been found of bacteria that look uncannily ***like cyanobacteria****, the most highly evolved photosynthetic organisms present in the world today"* (De Duve, 1995).

Sull'origine della vita, oltre alla teoria di de Duve, sono state avanzate con vario successo numerose ipotesi, che peraltro presentano molti punti in comune (Martin W. & Muller M.,1998; Moreira D. & Lopez Garcia P. 1998; Woese C.R., 1998; Doolittle W.F., 2000).

"Una ***pre-alga*** *fagocitica in grado di praticare la fotosintesi di giorno o durante l'estate artica e la fagocitosi di notte o durante l'inverno artico (o in qualsiasi ambiente buio)".*

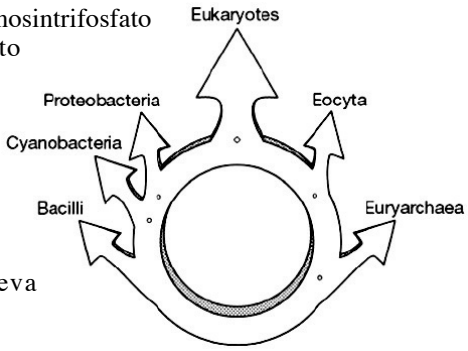
Così il biologo britannico **Thomas Cavalier-Smith** aveva definito l'archetipo delle cellule nel 1975: *un Cianobatterio, in pratica un'alga blu-verde*.

La teoria dell' *endosimbiosi* della biologa americana **Lynn Margulis Sagan** (1967) rimane fondamentale. Si basa sull' ipotesi di un' "aggressione" fra cellule primordiali che, convivendo in simbiosi, hanno generato successivamente altre cellule più complesse.



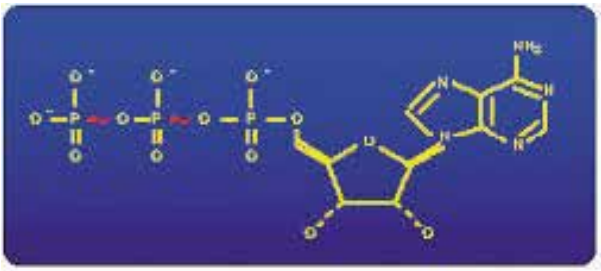
Similmente alla Margulis, **Rivera M.C.** & **Lake J.A**. (2004) sono arrivati alla conclusione che il genoma delle cellule eucariote (le attuali cellule evolute, fornite di mitocondri e cloroplasti) risulterebbe dalla fusione dei genomi di *due partners*, uno fotosintetico (verosimilmente un **cianobatterio**), l'altro un organismo arcaico, probabilmente un proteobatterio.

Questa teoria racchiude molte altre ipotesi sulla nascita delle prime forme di vita sulla Terra e cerca di spiegare (attraverso la *chimica cosmica* prebiotica) l'origine dell'ossigeno, generato dai **cianobatteri** e del fosforo (precursore di uno dei "mattoni della vita", l'adenosintrifosfato o ATP), catturato dai proteobatteri nella "polvere cosmica" apportata, forse, da comete o meteoriti (Botta & Bada, 2002).



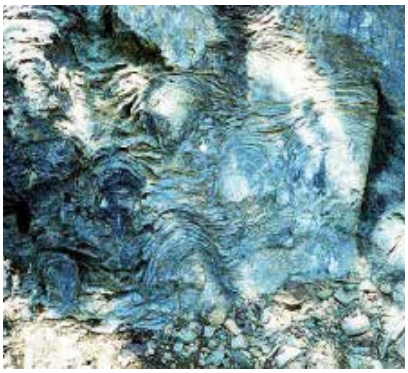
De Duve aveva

definito l'ATP "*una valuta chimica che ha partecipato alla costruzione dell'RNA, probabilmente la prima molecola portatrice di informazioni nello sviluppo della vita*" .



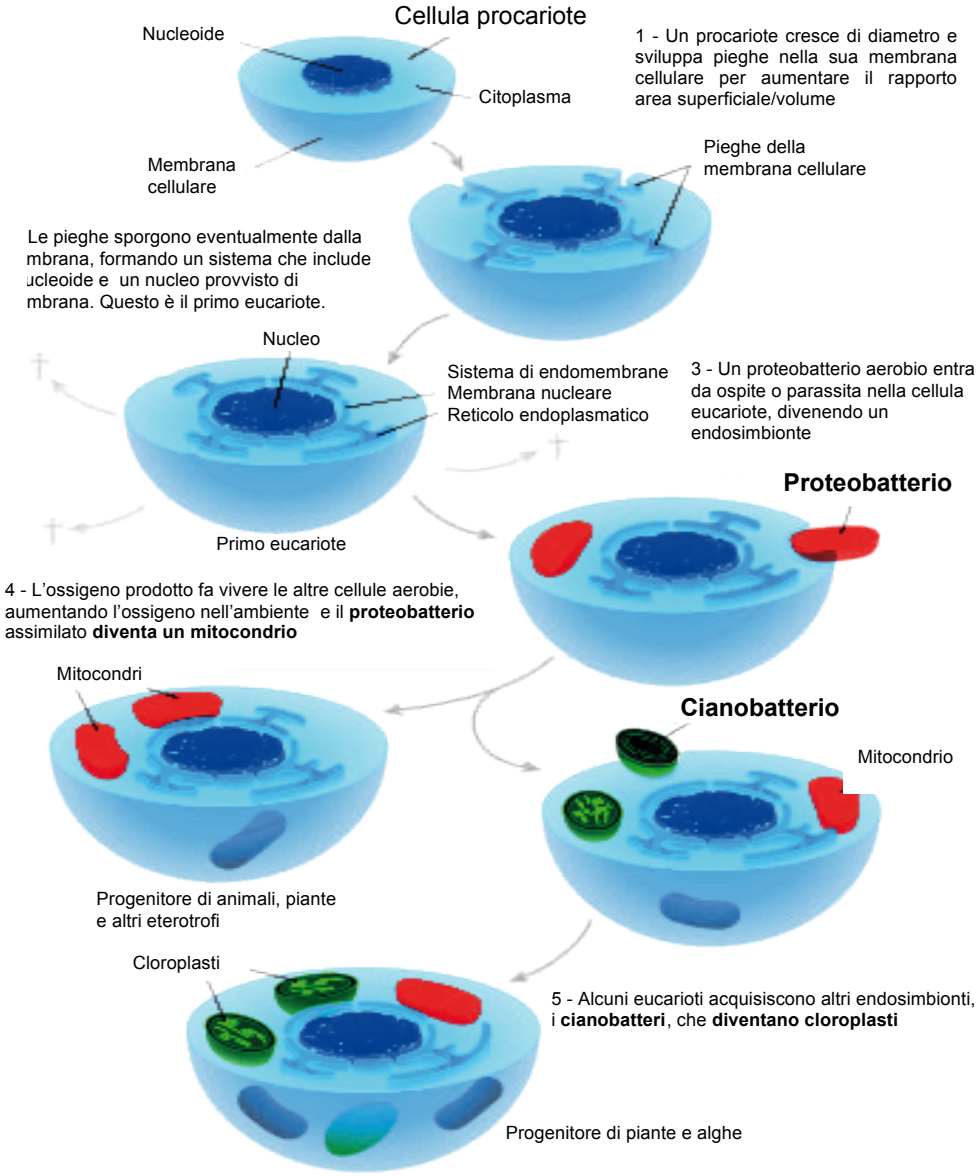
Prof. J.L. Bada.

Sotto i ghiacci della Groenlandia, **Mojzsis** *e Coll.* (1996) hanno rinvenuto microfossili certamente di natura biologica, databili con l'analisi del carbonio a >3,800 milioni d'anni fa. Non sono riusciti tuttavia a stabilire la struttura dei reperti (batteri o alghe?).



"Eleven taxa (including eight heretofore undescribed species) of cellularly preserved filamentous microbes, among the oldest fossils known, have been discovered in a bedded chert unit of the Early Archean Apex Basalt of northwestern Western Australia. This prokaryotic assemblage establishes that trichomic ***cyanobacterium-like*** *microorganisms were extant and morphologically diverse at least as early as* ***3465*** *million years ago and suggests that oxygen-producing photoautotrophy may have already evolved by this early stage in biotic history"* (Schopf, 1993).

Si chiamano *chert* le rocce contenenti alghe fossili studiate dal paleontologo americano **J. William Schopf** dell'Università di Los Angeles (California), che ha pubblicato i risultati su *Nature* (2002), destando numerose polemiche. Schopf ha applicato tecniche innovative di spettroscopia Laser-Raman, classificando i reperti nella famiglia delle *Oscillatoriaceae*, appartenente ai **Cianobatteri, cioè alle alghe blu-verdi**.



Teoria dell'endosimbiosi (schema)

La fotomicrografia ottica, allestita in sottile sezione petrografica, mostra una cellula microbica mineralizzata a forma di filamento carbonioso cilindrico provvista di membrana.

BIBLIOGRAFIA

1) Botta O.& Bada J.L. , Extraterrestrial organic compounds in meteorites, *Surv. In Geophys*. 2002, *23*, 411-467.
2) Cavalier-Smith T., The origin of nuclei and of eukaryotic cells, *Nature* 1975, *256*, 463-468.
3) De Duve C., The beginnings of the life on earth, *American Scientist*, 1995, *83*, 428-437.
4) Doolittle W.F., The nature of universal ancestor and the evolution of the proteome, *Curr. Opin. Struct. Biol*. 2000, *10*, 355-358.
5) Martin W. & Muller M.,The hydrogen hypothesis for the first eukaryothe, *Nature* 1998, *392*, 37-41.
6) Mojzsis S.J. *e Coll*., Evidence for life on earth before 3,800 million years ago, *Nature* 1996, *384*, 55-59.
7) Moreira D. & Lopez Garcia P., Symbiosis between methanogenic archea and d-proteobacteria as the origin of the eukaryotes. The syntrophic hypothesis, *J. Mol. Evol*. 1998, *47*, 517-530.
8) Rivera M.C. & Lake J.A., The ring of life provides evidence for a genome fusion origin of eukaryotes, *Nature* 2004, *431*, 152-155.
9) Sagan Margulis L., On the origin of mitosing cells, *J. Theor. Biol*. 1967,*14*, 225-274.
10) Schopf J.W., Microfossils of the Early Archean Apex Chert: New Evidence of the Antiquity of Life, *Science 1993*, *260*, 640-646.
11) Schopf J.W., Laser- Raman of earliest fossiles, *Nature* 2002, 416,73-76.
12) Woese C.R., The universal ancestor, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1998, *95*, 6854-6859.

PARTE PRIMA

Nella pagina precedente:

San Giorgio in Alga

Il nome di quest'isola della Laguna di Venezia (1,33 ettari, di proprietà del Comune) deriva dal patrono - San Giorgio - e dal fatto che attorno vi crescano molte alghe, ben visibili dalle foto satellitari. Verso il Mille i monaci Benedettini vi fondarono un monastero e una chiesa, sostituiti dagli Agostiniani, che rimasero fino alla fine del 1300. Nel Cinquecento l'isola ebbe grande prestigio, divenendo residenza di patrizi veneziani. Devastata da un incendio nel '700, fu trasformata in forte militare dagli Austriaci e quindi abbandonata al degrado attuale.

L'isola è ben visibile dal canale navigabile che unisce Fusina (sulla terraferma) con la Giudecca.

Capitolo 1

ALGHE E MICROALGHE. PRODUZIONE, RACCOLTA E PRODOTTI DERIVATI

GIUSEPPE ARCANGELI

GENERALITÀ

Negli ecosistemi acquatici le alghe costituiscono la fonte primaria di materia organica per tutti gli altri organismi e, grazie alla fissazione di anidride carbonica, contribuiscono a contenere l'innalzamento dei livelli di CO_2 nell'atmosfera.

Finora sono state descritte circa 40.000 specie di alghe, ma la stima è che non rappresentino più del 20% di quelle presenti sul pianeta.

Il termine "Alghe" non ha alcun significato tassonomico, ma indica un insieme di vegetali, alquanto primitivi, che, pur accomunati da alcune caratteristiche, si presentano molto diversi tra loro dal punto di vista morfologico, fisiologico, ecologico e biochimico. Tra le alghe ci sono infatti individui unicellulari dalle dimensioni di pochissimi micrometri ed altri che possono misurare oltre 50 metri.

La maggior parte delle alghe è autotrofa, altre possono essere eterotrofe, altre ancora sono fagotrofe. É quindi difficile dare una definizione di ciò che si intende con il termine "Alga".

Di seguito una proposta di classificazione, tratta da Lee (1989) che suddivide le alghe in 4 gruppi:

1) contiene alghe procariote, le *Cyanophyta* (Cianobatteri) caratterizzate da un'organizzazione cellulare senza un nucleo.
2) contiene alghe eucariote, con cloroplasto attorniato soltanto dalle due membrane dell'involucro del cloroplasto. Si ritiene che il cloroplasto derivi dalla cattura di un cianobatterio, che per qualche ragione non è stato digerito, ma è rimasto come simbionte. La simbiosi è risultata vantaggiosa per ambedue: per il protozoo perché riceve la fotosintesi, per il cianobatterio perché vive in un ambiente protetto. Vi appartengono *Glaucophyta, Rhodophyta* (Alghe rosse) e *Chlorophyta* (Alghe verdi).
3) contiene alghe eucariote, in cui il cloroplasto è attorniato anche da una membrana del reticolo endoplasmatico. Vi appartengono *Euglenophyta* (Euglene) e *Dinophyta* (Dinoflagellate).
4) contiene alghe in cui il cloroplasto è attorniato anche da due membrane del reticolo endoplasmatico. Vi appartengono *Cryptophyta* (Criptoficee), *Chrysophyta* (Crisoficee), *Prymnesiophyta* (Aptoficee).

In questo capitolo verranno trattate solo le alghe oggetto di allevamento o raccolta per uso alimentare o industriale e verranno divise per praticità di esposizione in alghe (macroalghe) e microalghe (alghe unicellulari).

1. ALGHE (MACROALGHE)

Introduzione

La coltivazione di alghe è diffusa in tutto il mondo. Più di 25 paesi producono oltre 20 diversi tipi di alghe per utilizzi tra i più disparati. Senza dubbio la produzione di carragenine,

alginati ed agar è per quantitativo di gran lunga maggiore rispetto agli altri impieghi: additivi per il suolo, fertilizzanti, biocarburanti, impiego in farmaceutica e per preparazioni culinarie.

Le **alghe brune** (*Phaeophyceae*) sono il gruppo maggiormente allevato, costituendo più della metà della produzione totale. La specie *Saccharina japonica* (ex *Laminaria japonica*), detta anche "*kombu*" è la più famosa, utilizzata essiccata come cibo oppure come fonte di alginati, mannitolo e iodio, seguita dalla *Undaria pinnatifida*, detta "*wakame*". La Cina è il maggior produttore di alghe brune, seguita dalla Corea e dal Giappone. Anche in Europa viene prodotta una piccola quantità di alghe brune da Francia, Russia e Spagna.

Insalata di Kombu (http://thejanechannel.com)

Le **alghe rosse** (*Rhodophyta*) ricoprono quasi il resto della produzione mondiale e sono in forte crescita in paesi come le Filippine e l'Indonesia.

I generi allevati sono: *Euchema, Kappaphycus e Gracilaria*, da cui vengono estratti idrocolloidi (altrimenti detti "ficocolloidi"), tra cui iota-carragenina, kappa-carragenina e agar-agar. La cosiddetta alga "*nori*" (*Porphyra*), detta anche "lattuga di mare", è usata per le preparazioni di *sushi*.

Insalata di Wakame (http://wallfoods.blogspot.it)

Le **alghe verdi** (*Chlorophyta*) sono prodotte in ridotta quantità, meno dello 0,1 % della produzione mondiale. Alcune di queste, come i generi *Ulva* e *Monostroma*, sono impiegate come additivi per cibi. La specie *Caulerpa lentillifera*, nota anche come "uva di mare", è particolarmente apprezzata sulle tavole dei giapponesi. *Ulva* in Sud-Africa viene impiegata come alimento per l'*Abalone*, un gasteropode marino di elevato valore gastronomico.

Sushi preparato con alga Nori (www.housesushi.com)

Cenni di biologia

Le alghe pluricellulari sono classificate in genere insieme alle piante (organismi pluricellulari fotosintetici) e, in effetti, esse rappresentano l'anello di congiunzione tra i protisti e le piante vere e proprie.

A differenza di queste ultime, pur essendo pluricellulari, le cellule delle alghe non si organizzano a formare tessuti e organi specializzati (radici, fusto e foglie); la struttura delle alghe pluricellulari è più semplice (il corpo delle alghe viene detto *tallo*: da cui il termine tallofite) e ciò permette di distinguere le alghe dalle piante acquatiche più evolute. Secondo altri studiosi, alghe unicellulari e alghe pluricellulari possono invece essere classificate in un gruppo a parte.

Le alghe pluricellulari, oltre alla clorofilla, contengono anche altri pigmenti, per cui possono assumere colorazioni diverse. Tra le alghe pluricellulari, quelle verdi sono più "vicine" alle piante, perché contengono clorofilla a e b (assenti nelle altre alghe) ed hanno l'amido come sostanza di riserva.

Di seguito le principali caratteristiche dei tre grandi gruppi di alghe allevate:

Alghe brune: 2000 specie. Possiedono pigmenti come la fucoxantina e i caroteni, che donano la colorazione scura assorbendo i raggi blu-verdi. Molecola di riserva: laminarina. Sono tipiche dei mari più freddi e alcune specie possono arrivare anche a delle dimensioni notevoli, raggiungendo la lunghezza di diverse decine di metri. Le Alghe Brune (che possiedono la fucoxantina) si estendono a profondità maggiori rispetto alle Alghe Verdi, mentre le Alghe Rosse (che possiedono la ficoeritrina) crescono fino alle massime profondità raggiunte da qualsiasi alga.

Alghe rosse: 4.000 specie. Sono prevalentemente confinate ad *habitat* marini e contribuiscono anche alla formazione delle barriere coralline. In particolare, possiedono un pigmento, la ficoeritrina, che dona loro la specifica colorazione rossa. Presenti anche xantofille e caroteni. Molecola di riserva: amido delle floridee, simile al glicogeno. I cicli vitali della maggior parte delle alghe rosse sono estremamente complessi e comportano un'alternanza di generazioni. In generale le alghe rosse hanno una riproduzione asessuata, liberando nell'acqua spore.

Alghe verdi: 6.700 specie. Sono le maggiori indiziate quando si considerano le alghe come progenitrici delle piante, nella veste in cui le conosciamo oggi. Infatti la presenza di pigmenti (quali la clorofilla a e b) e il modo in cui questi organismi accumulano le sostanze di riserva sottoforma di amido, suggeriscono l'esistenza di un legame filogenetico con le piante terrestri. Altri pigmenti: caroteni, xantofille, ficoeritrina. *Ulva lactuca*, il cui ciclo riproduttivo viene spesso riportato come esempio di ciclo vitale in cui l'alternanza di generazioni aploidi e diploidi ha lo stesso peso, è un'alga pluricellulare verde. In realtà esistono anche delle forme unicellulari di alghe verdi, come i generi *Clamydomonas* e *Acetabularia*.

Un esempio di sfruttamento delle macro-alghe: la produzione di agar-agar

L'agar-agar, o più semplicemente agar, (denominato dai giapponesi col nome di "*kanten*") è un polisaccaride usato come gelificante naturale e ricavato da alghe rosse appartenenti a diversi generi (tra i quali *Gelidium, Gracilaria, Gelidiella, Pterocladia, Sphaerococcus*).

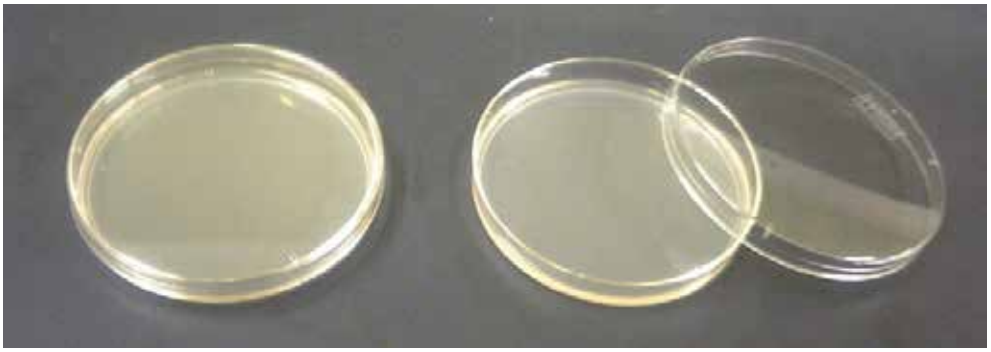
L'agar-agar ha un alto contenuto di mucillagini e di carragenina (nota anche come "alginato") ed è ric-

co di minerali. Viene impiegato nella preparazione di gelatine alimentari.

Non potendo essere digerito dagli enzimi presenti nella maggior parte di batteri e miceti, viene utilizzato in batteriologia come solidificante dei terreni colturali.

Alga del genere: Gelidium.

Alga del genere: Gracilaria.



2. MICROALGHE (ALGHE UNICELLULARI)

Introduzione

Le alghe unicellulari appartengono al regno dei protisti, come i protozoi e i funghi inferiori. Le microalghe sono un gruppo estremamente eterogeneo e questa diversità si riflette anche sui diversi tipi di metaboliti che producono. Molte specie sono impiegate per la produzione di prodotti di elevato valore commerciale, come amminoacidi, sali minerali, carotenoidi e acidi grassi, integratori per l'uomo e per gli animali, componenti di composti bioattivi come antibiotici e farmaci anti-cancro. Altre specie sono invece impiegate per usi su vasta scala, come trattamento degli impianti di depurazione, utilizzo come biocombustibili e fertilizzanti.

I generi più impiegati ad oggi a livello mondiale sono: *Chlorella, Spirulina*, *Dunaliella, Haematococcus* ed il settore è in crescita. Gli elevati costi di produzione comportano elevati prezzi al commercio ed in particolare quelle impiegate per l'allevamento delle fasi giovanili di pesci e molluschi bivalvi (alghe dei generi *Isocrysis, Tetraselmis, Skeletonema*).

Cenni di biologia

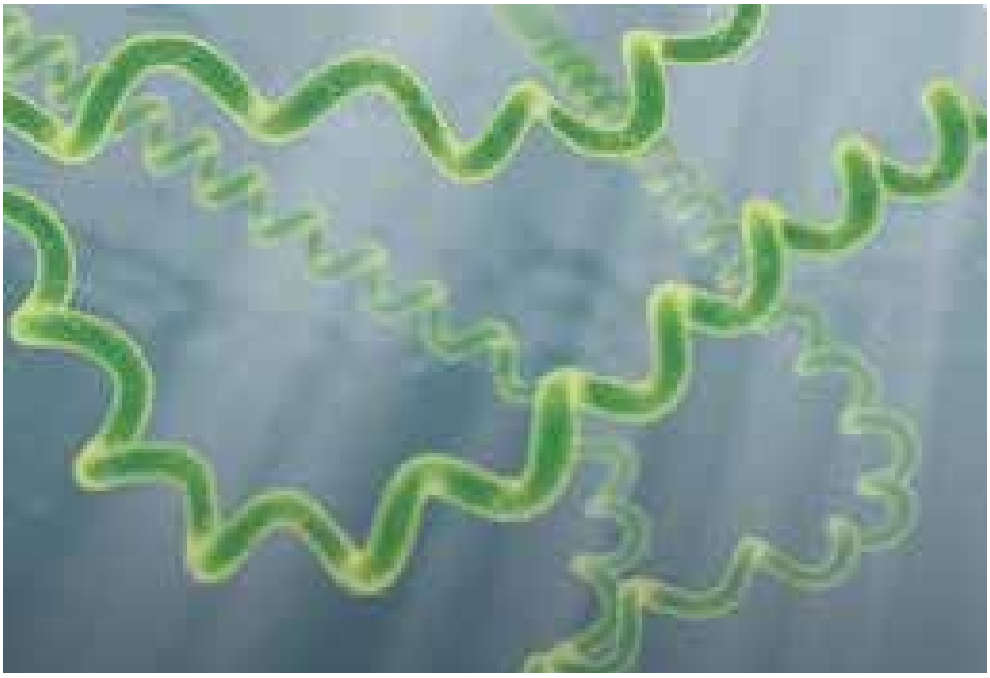
Alghe giallo-brune (*Chrysophyta*): popolano in grande numero le acque marine e interne, ma anche i terreni e gli ambienti umidi. Hanno cromatofori giallo-verdastri e giallo-oro per la presenza di beta-carotene e di varie xantofille, che mascherano il verde della clorofilla. Alcune specie mancano di cromatofori e sono eterotrofe (per lo più saprofite). Altre hanno possibilità di movimenti ameboidi e capacità di inglobare particelle solide per fagocitosi. I flagelli sono talora assenti e possono spostarsi con pseudopodi; in genere non possiedono pareti cellulari. La riproduzione è prevalentemente asessuata e sono quasi tutte aerobie. Alcune specie vivono in acque povere di sostanze organiche, come quelle potabili; la loro presenza conferisce a volte un sapore sgradevole alle acque di pozzi e serbatoi, pur essendo innocue all'uomo. Il genere *Isocrysis* è impiegato come alimento in *hatchery* di bivalvi. La specie *Isochrysis zhangjiangensis* è un importante candidato per la produzione di biodiesel.

Alghe dinoflagellate (*Dinophyta*): dal greco δῖνος *dînos*, "vortice", e il latino *flagellum*, "flagello", "frusta", sono un gruppo arcaico di alghe unicellulari che vivono principalmente nelle acque marine e sono dotate di strutture di locomozione dette flagelli. Contengono clorofilla a, c_2, peridinina e neoperidinina. Alcune specie sono provviste di potenti tossine, pericolose anche per gli esseri umani. Alcune specie (esempio. *Noctiluca scintillans*) emettono lampi di luce, con un meccanismo luciferina-luciferasi. Alcuni generi, come *Alexandrium*, sono in grado di produrre, se coltivati, grandi quantità di lipidi, base per la produzione di biocombustibili.

Diatomee (*Bacillariophyceae*): sono alghe unicellulari, libere o raggruppate in colonie di aspetto diverso. La parete cellulare silicizzata prende il nome di *frustolo* ed è formata da due parti, o *teche*, che si incastrano l'una sull'altra come le due parti di una scatola. Anche le Diatomee possono essere tossiche per l'uomo. Le Diatomee costituiscono, soprattutto nelle acque fredde, la componente essenziale del *fitoplancton* e, grazie alla fotosintesi, arricchiscono le acque di ossigeno, permettendo una rigogliosa vita aerobica. Il loro numero può essere così grande che, alla loro morte, i gusci silicei, sedimentando sui fondali, formano depositi molto potenti; da essi si estrae un materiale detto "farina fossile" (usato soprattutto come abrasivo).

Alghe verdi (*Chlorophyta*): ad esempio *Haematococcus, Chlorella, Dunaliella*, *Botryococcus*. Vedasi quanto detto a proposito delle alghe verdi pluricellulari. *Chlorella* è utilizzata come integratore alimentare, dalla *Dunaliella* si estrae invece β–carotene. Dall' *Haematococcus* si produce astaxantina, impiegata come colorante nella fase di finissaggio dell'allevamento di trote. *Botryococcus braunii* è un'eccellente candidato per la produzione di biocarburanti nel settore delle energie rinnovabili. In particolari condizioni di crescita, accumula alti livelli di idrocarburi a catena lunga (15-76% del peso secco), utilizzati per la produzione di oli combustibili, biodiesel e biogas.

Alghe azzurre (*Cyanophyta*): queste ultime, dette anche Cianobatteri, non appartengono al regno dei protisti, ma al regno dei *Monera*, esseri unicellulari senza nucleo, come i batteri. Sono le alghe più primitive e non contengono nucleo o cloroplasto. Le loro pareti cellulari non contengono cellulosa, non si riproducono sessualmente, semplicemente si dividono. Contengono clorofilla-a e una serie di altri pigmenti addizionali (carotenoidi, xantofille, ficocianine, ficoeritrine) legati alla membrana citoplasmatica, mancando i cloroplasti. Sono specie in grado di fissare l'azoto atmosferico (eterocisti). La *Spirulina* è la più nota, venduta in polvere o in compresse e utilizzata per dolci, frullati, salse, paté, minestre.



Spirulina come appare al microscopio ottico (www.hellenic-biospirulina.com/english/english.html).

3. SITUAZIONE IN ITALIA

Le alghe, molto usate nella cucina vegana e in quella macrobiotica, oltre ad una millenaria tradizione nella cucina orientale, vantano una lunga tradizione di consumo alimentare anche nei paesi del nord Europa e lungo le fasce costiere mediterranee.

Le più diffuse sul mercato italiano sono in gran parte importate: *Kombu*, *Wakame* e *Nori*.

Tra le alghe raccolte nei mari italiani si ricordano:

- Il genere *Gelidium*, appartenente alla famiglia delle Gelidiacee, un alga rossa presente in tutto il Mediterraneo. In fili e in barre va bene per le insalate. In polvere (agar-agar) è un addensante usato dall'industria e in pasticceria, meno pregiato rispetto alle pectine della frutta.
- La *Corallina rubens* (detta "erba corallina"): anche questa alga rossa, presente in Sicilia, viene raccolta fresca nella costa orientale e cucinata cruda nelle insalate; una volta seccata viene utilizzata per scopi medicinali.
- *Ulva lactuca* ("lattuga di mare"): alga verde. reperibile a volte anche in pescheria, caratterizzata da grandi foglie simili a quelle della lattuga terrestre, si può utilizzare cruda nelle insalate o con le ostriche. Famoso ingrediente delle cosiddette "zeppoline", una sorta di frittelline presenti nella tradizione culinaria napoletana.

Riguardo alla produzione di alghe a livello industriale, in questi ultimi anni anche in Italia sono segnalate alcune iniziative per l'allevamento dell'alga azzurra *Spirulina* (*Arthrospira platensis* o *Spirulina platensis*). Questa è fatta crescere in vasche di coltivazione, in serre. Durante l'accrescimento vengo monitorati costantemente pH, temperatura e dosaggio dei nu-

trienti. Una volta raggiunto il grado di accrescimento ottimale, l'acqua di coltura viene filtrata, ottenendo una sostanza densa dal colore verde scuro, il concentrato di *Spirulina,* che viene sottoposto ad essicazione per alcuni giorni. Si trova in commercio pura o abbinata ad altre sostanze in polvere, pezzetti, pillole, capsule e in alimenti come pasta, biscotti, barrette e bibite.

Spirulina, un prodotto commerciale (www.whydontyoutrythis.com).

4. PROBLEMATICHE SANITARIE LEGATE AL CONSUMO DI ALGHE

Anche se i benefici legati al consumo di alghe sono di gran lunga superiori ai rischi dovuti alla presenza di sostanze potenzialmente nocive per la salute, di seguito vengono riassunte le problematiche principali ad oggi note su questo ultimo aspetto.

Le alghe sono un prodotto che risente molto dell'inquinamento del mare. Così, se da un lato sono così ricche di nutrienti come calcio, magnesio e iodio, d'altro canto è dimostrata la loro capacità di accumulare metalli pesanti (come **piombo** e **cadmio)** e metalloidi come l'**arsenico**, notoriamente tossici per l'uomo. Non è un caso infatti che le alghe vengano impiegate come bio-indicatori dello stato di salute di un corpo d'acqua relativamente alla concentrazione di questi composti.

L'alga *Hijiki* (*Sargassum fusiforme*), un'alga bruna della classe delle feofite, con foglie quasi cilindriche che ricordano i rami degli alberi, è tristemente famosa per le elevate concentrazioni di arsenico inorganico (la forma tossica dell'arsenico), tanto che ne viene sconsigliato un consumo eccessivo in Giappone, dove è di uso comune. Anche la *Food Standards Agency*, ente inglese di vigilanza alimentare, raccomanda di non consumare l'alga *Hijiki*. L'attuale normativa europea non prevede limiti massimi per i contaminanti nelle alghe e per ora ci si deve rifare alla voce "ortaggi", per i quali comunque mancano alcuni parametri di riferimento, come per mercurio ed arsenico (Regolamento UE 488/2014).

È sempre meglio, quindi, cercare alghe provenienti da aree note, oppure ricorrere a prodotti biologici certificati, in quanto nei capitolati di produzione (che devono rispondere a norme ben precise) deve risultare che… (*omissis*)… *le zone di crescita siano di elevata qualità ecologica, …le alghe marine selvatiche commestibili non siano raccolte in zone che non rispondono ai criteri previsti per le zone di classe A o B* (art. 13, Regolamento CE 834/2007) (n.d.r.: classe A: *E. coli* < 230 MPN/100g; classe B: *E. coli* < 4.600 MPN/100g).

Piatto a base di alga Hijiki, il cui consumo occasionale non risulta nocivo per la salute.

BIBLIOGRAFIA ESSENZIALE

1) Chopin T e Yarish C., 1999, Nutrients or not nutrients?, World aquaculture, *29*, 31-61.
2) FAO Fisheries and Aquaculture Technical Paper, 2013, Social and economic dimensions of carrageenan seaweed farming, paper n. 580, Roma.
3) FAO, Prospects for seaweed production in developing countries, 2001, Fisheries Circular No. 968 FIIU/C968, Roma.
4) Fei X.G., 2004, Solving the coastal eutrophication problem by large scale seaweed cultivation, Hydrobiologia, 512, 145-151.
5) Feng D., Chen Z., Xue S. e Zhang W., 2011, Increased lipid production of the marine oleaginous microalgae *Isochrysis zhangjiangensis* (*Chrysophyta*) by nitrogen supplement, Bioresour. Technol. 2011 Jun;102(12):6710-6. doi: 10.1016/j.biortech.2011.04.006. Epub 2011 Apr 8.
6) Forneris G., Pascale M. e Perosino G.C., 2008, Lezioni di idrobiologia (le acque continentali), 195 – 201, Ed. CREST, Centro Ricerche in Ecologia e Scienze del Territorio.
7) Fuentes-Grünewald C., Garcés E., Alacid E., Rossi S. e Camp J., 2012, Biomass and Lipid Production of Dinoflagellates and Raphidophytes in Indoor and Outdoor Photobioreactors, Mar Biotechnol. DOI 10.1007/s10126-012-9450-7.
8) Lee R.E., 1989, Phycology, Cambridge University Press.
9) Lucas J. S. e Southgate P.C., 2012, Aquaculture, farming aquatic animals and plants, 268-293, Ed. Wiley-Blackwell.
10) Nakamura Y., Narukawa T. e Yoshinaga J., 2008, Cancer Risk to Japanese Population from the Consumption of Inorganic Arsenic in Cooked Hijiki, Agric. Food Chem., 2008, 56 (7), pp 2536–2540.
11) Regolamento (CE) n. 834/2007 del 28 giugno 2007 relativo alla produzione biologica e all'etichettatura dei prodotti biologici.
12) Regolamento (UE) n. 488/2014 del 12 maggio 2014 che modifica il regolamento (CE) n. 1881/2006 per quanto concerne i tenori massimi di cadmio nei prodotti alimentari.
13) Van Den Hoek C., Mann D.G., Jahns H.M Algae, 1988, An introduction to phycology, Cambridge University Press.
14) Yokoi K. e Konomi A., 2012, Toxicity of so-called edible hijiki seaweed (*Sargassum fusiforme*) containing inorganic arsenic, Regul. Toxicol. Pharmacol., Jul;63(2):291-7. doi: 10.1016/j.yrtph.2012.04.006. Epub 2012 Apr 27.

Capitolo 2

MICROALGHE NELLE ACQUE MARINE E DOLCI IN ITALIA

EMANUELA VIAGGIU

INTRODUZIONE

Le microalghe o alghe microscopiche crescono sia in ambienti marini che in acque dolci. Sono produttori primari negli oceani che convertono acqua e anidride carbonica in biomassa e ossigeno attraverso l'energia luminosa.

Spesso sono denominate "piante acquatiche", ma in realtà esse non hanno la stessa organizzazione delle cellule in tessuti specializzati come nelle piante vere e proprie.

Nelle microalghe sono inclusi sia organismi procariotici (come i cianobatteri, chiamati anche "alghe blu-verdi"), sia le forme cellulari di tipo eucariotico. Possono essere di diverso colore (verde, marrone, rosso) in funzione della diversa presenza di pigmenti fotosintetici.

Le microalghe crescono sfruttando il processo fotosintetico, ovvero la possibilità di convertire, attraverso l'energia luminosa, anidride carbonica e alcuni nutrienti, come azoto e fosforo, in biomassa algale. Questo tipo di crescita si chiama crescita "autotrofa". Altre alghe, invece, possono crescere anche al buio in presenza di composti organici come zucchero o amido (definita crescita "eterotrofa"), o combinare entrambe le modalità di crescita (crescita "mixotrofica").

Grazie alla loro versatilità ecofisiologica, sono in grado di adattarsi a diversi ambienti. Si sviluppano nelle acque dolci, nel mare e nelle acque di transizione (di tipo salmastro), nonché in ambienti estremi, come quelli caldi dei deserti o quelli freddi artici e antartici.

Le microalghe svolgono un ruolo importante in molti ecosistemi, rappresentando un anello fondamentale nelle diverse catene alimentari acquatiche e supportando quindi tutte le attività di pesca negli oceani e nelle acque interne.

Proprio per queste caratteristiche possono essere "coltivate", sfruttando la loro capacità di utilizzare sostanze inorganiche per convertirle in composti organici come zuccheri, lipidi e proteine.

Partendo da acque di scarico, ad esempio quelle urbane o di allevamenti di animali e di industrie, le alghe possono aiutare nel trattamento di depurazione di questi reflui, sfruttando i "nutrienti" presenti in essi.

Ci sono circa 4.000 specie conosciute di alghe microscopiche, chiamate microalghe o *fitoplancton*, nei diversi ambienti acquatici. Circa 300 di queste sono state identificate per la capacità di svilupparsi in maniera massiva, a volte con eventi periodici, della crescita. Lo sviluppo elevato della biomassa microalgale, visibile in alcuni casi anche ad occhio nudo, è definito "fioritura" (in inglese *bloom*).

La fioritura, dovuta all'elevata crescita cellulare, di una o più specie può rendere la superficie dell'acqua di colore rosso, marrone, giallo, verde o bianco. In alcuni casi le alghe hanno dato origine a delle vere e proprie "maree rosse". Alcune di queste microalghe sono in grado di rilasciare composti tossici, considerati nocivi per gli animali e per l'uomo. Quando danno origine a fioriture di questo tipo si parla di "HAB - *Harmful Algal Bloom*".

Con HAB si intende un *bloom* cha ha effetti dannosi su piante e animali, uomo compreso. Le alghe marine tossiche sono responsabili di una serie di intossicazioni associate al consumo di prodotti ittici o ad inalazione di tossine diffuse per *aerosol*. In queste situazioni si verificano intossicazioni acute, mentre poco si sa sugli effetti dell'esposizione a piccole dosi (Ferrante *et al*., 2013).

Negli ultimi anni c'è stata una crescente attenzione e una maggior preoccupazione per il fenomeno degli HABs, un problema che colpisce le risorse idriche e la qualità dell'ambiente in tutto il mondo.

In molte regioni gli HABs si verificano con episodi sempre più frequenti, sviluppandosi in modo massivo, tanto da occupare aree sempre più grandi e persistendo in acqua con tempi sempre più lunghi. Gli HABs, inoltre, vengono rilevati in zone dove prima non era nota la loro presenza o il loro sviluppo, e, in alcuni casi, fioriture considerate innocue oggi rappresentano un problema per la salute degli animali e dell'uomo.

Un certo numero di specie, in grado di rilasciare potenti tossine, possono arrivare, attraverso la catena alimentare, agli uccelli marini, mammiferi e agli esseri umani, a volte anche con esiti fatali (Fig. 1).

Alcune fioriture algali non sono di per sé dannose, ma possono causare impatti ambientali gravi. Ad esempio, l'eccessivo sviluppo della biomassa algale porta ad un consumo più elevato di ossigeno disciolto nell' acqua, riducendone la disponibilità per tutti quegli organismi aerobi che non possono farne a meno (come *zooplancton*, molluschi, crostacei e pesci). Questa deplezione in breve tempo porterà alla moria di questi organismi, venendo a creare un danno ambientale con il conseguente degrado delle acque di superficie (http://www.seaweb.org/resources/briefings/algae.php).

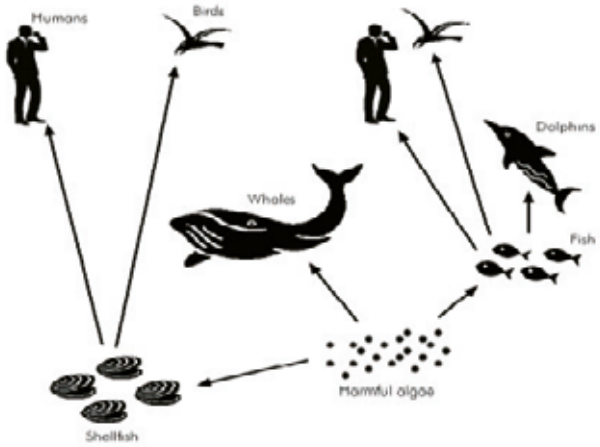


Figura 1. Schematica descrizione della catena alimentare che coinvolge l'uomo (Gerssen et al., 2010).

ALGHE TOSSICHE IN ACQUE MARINE E ACQUE DOLCI

Sono riportate in letteratura periodiche fioriture di alghe che si sviluppano in ambienti marini o in acque dolci di tutto il mondo, imputate a diatomee, dinoflagellati e cianobatteri.

Nelle acque dolci, la proliferazione di alghe maggiormente osservabile è rappresentata da cianobatteri, le cui fioriture sono chiamate semplicemente "fioriture di cianobatteri" o "fioriture di alghe tossiche" oppure "CHAB - *Cyanobacteria Harmful Algal Bloom*". Quando sono visibili ad occhio nudo, possono colorare l'acqua di verde, blu-verde e, in alcuni casi, anche di rosso, a seconda dei pigmenti presenti (clorofilla-*a*, altri pigmenti fotosintetici, come le ficobiliproteine).

Sebbene le fioriture algali siano state considerate storicamente un fenomeno naturale, la frequenza con cui si stanno manifestando negli ultimi anni sembra essere aumentata. L'incremento delle attività agricole ed il conseguente deflusso di pesticidi e diserbanti, insieme ad altri inquinanti dovuto alle varie attività di natura antropica, hanno portato ad un aumento del carico di nutrienti come fosforo e azoto, venendo così a creare condizioni favorevoli alla crescita algale (Creekmore, 1999).

DISTRIBUZIONE E FREQUENZA DI *BLOOM* IN ACQUE MARINE

Varie specie di alghe, in determinate condizioni ambientali, possono produrre tossine, accumulabili nei molluschi (come cozze, ostriche, vongole, capesante) che sono organismi filtratori, alimentati a *fitoplancton*.

Le tossine prodotte dalle alghe marine (fig. 2) vengono classificate in relazione al loro effetto sull'uomo o sugli animali in: *Amnesic Shellfish Poisoning (ASP), Paralytic Shellfish Poisoning (PSP), Diarrheic Shellfish Poisoning (DSP), Azaspiracid Shellfish Poisoning (AZP) e Neurologic Shellfish Poisoning (NSP)*, come riportato da Gressen *et al*. (2010) a cui si rimanda per una completa discussione della materia.

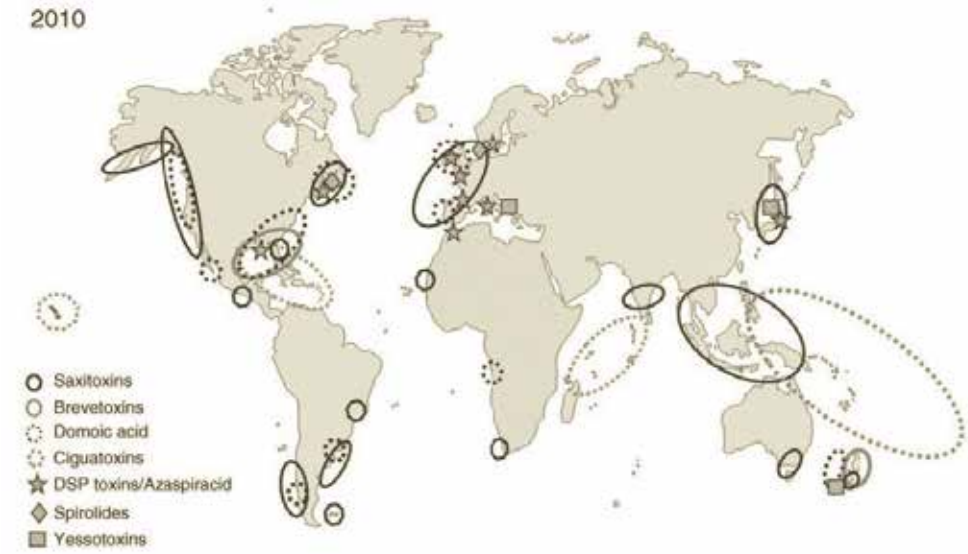


Figura 2. Distribuzione delle maggiori classi di tossine il cui effetto tossico è noto (cerchi puntinati) oppure potenzialmente tossiche (cerchi continui) sulla fauna marina (Fire & Van Dolah, 2012).

I fattori alla base dello sviluppo delle fioriture non sono ancora pienamente chiari, ma specifiche condizioni climatiche e idrografiche sembrano giocare un ruolo importante nella crescita massiva delle popolazioni algali. Le biomasse che si ottengono da queste crescite esponenziali possono essere, in alcuni casi, utilizzate in acquacoltura e in biologia marina. Delle 300 specie fitoplanctoniche note per dare origine a delle fioriture, oltre 40 sono rappresentate da specie tossiche, appartenenti alle classi dei Dinoflagellati e delle Diatomee. La concentrazione di queste specie fitoplanctoniche tossiche può variare da mille fino qualche milione di

cellule per litro. Si pensa che la produzione di tossine, da parte di questi organismi, sia un sistema di difesa nei confronti di altre alghe fitoplanctoniche competitrici e dello *zooplancton*, che attraverso un meccanismo di "*grazing"* si nutre di piccolissime cellule fitoplanctoniche.

In tutto il mondo, le tossine prodotte dalle alghe (comprese quelle prodotte dai cianobatteri) sono ritenute responsabili, sull'uomo, di circa 60.000 casi di intossicazioni ogni anno. Le tossine accumulate nei crostacei possono causare danni alla fauna selvatica e avere un impatto economico negativo sulla molluschicoltura e, di conseguenza, sul turismo.

In Europa è stata stimata una perdita annuale di circa 720 M € nelle attività ricreative e nel turismo, mentre l'industria della molluschicoltura ha avuta una perdita di circa 166 M €.

Non vi è dubbio che le fioriture si sviluppano con una frequenza sempre maggiore e in alcuni casi anche con una certa regolarità. Diversi ricercatori sostengono che questa tendenza sia dovuta all'aumento dell'eutrofizzazione, ma anche altri aspetti devono essere presi in considerazione, come la regione di sviluppo, la stagionalità e alcuni fattori specie-specifici. A differenza delle fioriture che si verificano in mari grandi (Fig. 4) e che risentono di fattori su larga scala, nel Mediterraneo le fioriture sono un fenomeno più localizzato, comunemente legato alle aree con un dinamismo più vincolato, come nelle baie, lagune, porti, spiagge ed estuari. In queste aree una maggiore crescita del *fitoplancton* non solo porta ad una colorazione dell'acqua percepibile lungo la costa, ma anche ad un deterioramento della qualità dell'acqua stessa. L'urbanizzazione intensiva, l'uso ricreativo e industriale delle coste del Mediterraneo hanno portato ad un notevole aumento dell'immissione di sostanze nutritive. Zone costiere ricche di nutrienti e, in particolare, le aree semi-chiuse, con un basso livello di turbolenza, costituiscono un ambiente nuovo e unico per il quale diverse specie di *fitoplancton* con effetti nocivi possono diventare dominanti (Ferrante *et al*., 2013).

Figura 3. Bacino di Molentargius, in territorio di Quartu Sant'Elena, presso Cagliari.

Le lagune, per esempio, sono tra gli ecosistemi più interessanti dal punto di vista biologico, in quanto assommano le caratteristiche biologiche del mare e dello stagno. La mescolanza delle acque salmastre e di quelle dolci seleziona una fauna (e una flora) unica ed estremamente interessante, anche per quanto riguarda le alghe.

Nell'immagine il bacino di Molentargius, in territorio di Quartu Sant'Elena, presso Cagliari (Fig. 3).

Figura 4. Fioritura di alghe in mare.

Di seguito si riporta sinteticamente la distribuzione di alghe tossiche marine in base alle tossine prodotte nelle acque di diverse parti del mondo, con particolare riguardo ai mari italiani (da Ade *et al*., 2003).

PSP La presenza di alghe tossiche in grado di produrre tossine di tipo PSP sono state registrate, in generale, nelle acque temperate, come, ad esempio, *Alexandrium tamarense*, *A. catenella*, *A. acatenella*, *A. fundyense* e *A. minutum*. Alcune specie di *Alexandrium* sono state rinvenute lungo alcune coste del Mediterraneo. Specie che producono PSP sono *Pyrodinium bahamense* var. *compressa*, presente nei mari tropicali e *Gymnodinium catenatum*, che ha, invece, un'ampia distribuzione geografica. Quest'ultimo, oltre ad essere stato rilevato lungo le coste atlantica e mediterranea della Spagna, è stato osservato anche sulla costa pacifica dell'America, del Giappone e dell'Australia.

In Italia, nel Golfo di Trieste, sono state identificate *A. fundyense*, *A. pseudogonyaulax*, *A. lusitanicum* e anche *A. catenella*. Nel 1993, alcuni mitili allevati lungo le coste dall'Emilia- Romagna mostrarono la presenza di goniautossine, se pur a livelli assai bassi, indicando tuttavia che erano presenti nel mar Adriatico alghe produttrici di tossine PSP, ma che non vennero identificate in quell'occasione. L'anno successivo, sempre lungo le coste emiliane, fu identificata la presenza, in campioni d'acqua, di *A. minutum* in concomitanza con la determinazione delle tossine PSP in alcuni mitili, mentre *A. tamarense* è stato osservato sia nel Tirreno settentrionale che nel mar Adriatico. *A. tamarense*, *A. minutum* e *A. balechi* sono state identificate nei golfi di Napoli e di Salerno. Segnalazioni, invece, di *Gymnodinium catenatum* sono riportate nel Tirreno, nell'Adriatico e nel mare Egeo.

DSP Specie di dinoflagellati appartenenti ai generi *Dinophysis* e *Prorocentrum* producono tossine che causano sindrome DSP. *D. fortii* è stata osservata in Giappone, mentre *P. lima* e varie altre specie di *Dinophysis* sono state associate ad intossicazioni lungo le coste atlantiche dell'Europa, in Olanda e Scandinavia. Anche nel Mediterraneo e nei mari italiani sono state osservate alcune specie di *Dinophysis* e *Prorocentrum*, causando la formazione di maree rosse. Nell'Adriatico, alla fine degli anni '90, intossicazioni da DSP vennero attribuite alla presenza di *D. fortii*, *D. tripos* e *D. caudata*. Sempre in Adriatico, sono state identificate anche *D. rotundata*, *D. acuta* e *D. diegensis*. A tutt'oggi, in Adriatico sono state identificate più di una cinquantina di specie di *Dinophysis*.

NSP *Gymnodinium breve* è responsabile della produzione di tossine che causano sindrome di tipo NSP e le fioriture di quest' alga possono causare morie di pesci ed intossicazioni per

l'uomo. Sono noti casi di intossicazione dovuti all'ingestione di molluschi e all'*areosol* che si forma in vicinanza delle rive. Le zone in cui sono state riscontrate, con maggior frequenza, presenze di quest' alga, sono rappresentate dal golfo del Messico, dalle coste della Florida e del nord Carolina. Oltre che nel Giappone, anche nel Mediterraneo sono state segnalate fioriture di *G. breve*. In Italia, lungo le coste dell'Adriatico settentrionale, in diverse occasioni, sono state osservate fioriture dovute a *Gymnodinium* sp.

ASP L'acido domoico, un aminoacido neurotossico relativamente raro, responsabile della sindrome ASP, fu identificato nella diatomea pennata *Nitzschia pungens* var. *multiseries*. Un'altra diatomea in grado di produrre acido domoico è *Pseudonitzschia australis*, individuata lungo le coste delle California.

Casi di intossicazione dovuti alla presenza di acido domoico sono riportati in Canada, in California e lungo le coste dell'Australia e della Nuova Zelanda. In Europa, benché non sia stato mai registrato alcun episodio di intossicazione, la presenza di acido domoico è stata dimostrata in mitili coltivati in Spagna e nella diatomea *P. pungens* var. *multiseries*, raccolta sulle coste olandesi. In Italia, negli anni '90, nell'alto e medio Adriatico sono comparsi aggregati mucillaginosi contenenti diatomee del genere *Nitzschia*. Anche se negli aggregati non fù rilevata la presenza di acido domoico, non si può escludere il rischio sanitario associato all'ingestione di molluschi bivalvi contaminati.

DISTRIBUZIONE E FREQUENZA DI *BLOOM* IN ACQUE DOLCI

I cianobatteri sono organismi cosmopoliti, presenti in acque dolci, marine e di tipo salmastro. Il termine "alghe blu-verdi" viene utilizzato a causa della colorazione che assumono le cellule, grazie alla presenza dei pigmenti fotosintetici e quindi le popolazioni possono variare il loro colore dal blu-verde al blu cielo, verde-erba, kaki, marrone cioccolato, fino al rosso vivo.

I cianobatteri sono batteri fotosintetici con una struttura cellulare relativamente semplice. La mancanza di un nucleo e di una compartimentazione a livello cellulare li fanno collocare tra i batteri. Da un punto di vista filogenetico, sono organismi molto antichi, i cui fossili risalgono a circa 3,5 miliardi di anni fa. Sono considerati i primi organismi ad avere liberato l'ossigeno nell'atmosfera attraverso il processo fotosintetico che, a tutt'oggi, sostiene la vita sulla Terra. I cianobatteri producono ossigeno attraverso la fotolisi delle molecole d'acqua, meccanismo che vale tuttora in alghe e piante superiori.

Oltre ad essere presenti negli ambienti acquatici, i cianobatteri si trovano sulle rocce, su terreni e in ambienti estremi (sorgenti termali, deserti e regioni polari). Possono presentarsi come organismi unicellulari o organizzati a formare filamenti o catenelle di cellule. Le singole cellule sono visibili al microscopio, ma se formano degli aggregati questi possono raggiungere le dimensioni di diversi millimetri ed essere visti anche ad occhio nudo.

Alcuni cianobatteri unicellulari, come *Microcystis*, possono presentarsi in forma di colonie di aspetto irregolare o più delineate ai bordi e le cellule sono tenute insieme da una matrice polisaccaridica.

I ciananobatteri filamentosi possono essere organizzati in singoli filamenti oppure in filamenti ramificati, ma non sono singolarmente visibili ad occhio nudo. Tuttavia, alcuni cianobatteri filamentosi, come *Aphanizomenon* e *Trichodesmium*, possono avere i filamenti raggruppati in fasci e quindi essere osservati come strutture macroscopiche simili a piccoli aghetti. I filamenti di *Gloeotrichia*, invece, crescono in maniera radiante, a sfera, e formano palline, delle dimensioni della testa di uno spillo. I filamenti di altri cianobatteri, come per esempio di *Planktothrix* e di *Phormidium*, sono costituiti da cellule apparentemente identiche,

mentre altre forme filamentose (ad esempio di *Nostoc*, *Aphanizomenon*, *Cylindrospermopsis* e *Anabaena*) possono differenziare cellule strutturalmente e fisiologicamente specializzate. Queste cellule, diversamente da quelle vegetative, che sono fotosinteticamente attive, sono definite "*eterocisti*".

Le eterocisti non possono eseguire la fotosintesi, ma sono in grado di fissare l'azoto molecolare atmosferico (N_2) e questo avviene quando in acqua l'azoto diventa un elemento limitante per la crescita. Questo nutriente, una volta entrato nella cellula,viene trasformato in ammoniaca e in composti azotati organici che possono poi essere utilizzati per sostenere la crescita dei cianobatteri. Oltre alle eterocisti, i cianobatteri filamentosi sono in grado di differenziare cellule simili a spore, dette "*acineti*", ricche di sostanze di riserva, che permettono la sopravvivenza nei periodi di *stress* ambientale o di carenza di nutrienti e possono poi germinare di nuovo, quando le condizioni ritornano favorevoli per la crescita.

I cianobatteri hanno un ruolo chiave negli ambienti acquatici, perché essendo dei produttori primari, rappresentano uno degli anelli più importanti della catena alimentare acquatica, permettendo così il riciclo della materia. Tuttavia, il vero problema con i cianobatteri, in termini di impatti negativi sulla biodiversità e sulla qualità dell'acqua, è rappresentato dal crescente aumento dello stato trofico delle acque. L'eutrofia favorisce la proliferazione delle alghe e, in particolare, dei cianobatteri.

Spesso in primavera le popolazioni di diatomee si sviluppano prima dei cianobatteri, a causa della temperatura più ridotta e per la disponibilità di silice, che rappresenta un componente fondamentale delle loro pareti cellulari dure e porose (frustoli). Tuttavia, come la silice diventa limitante, le popolazioni di diatomee diminuiscono fino alla morte, mentre cominciano a proliferare i cianobatteri. Questi, infatti, non avendo la necessità di utilizzare la silice per accrescersi e avendo la capacità di accumulare riserve energetiche nelle loro cellule, diventano competitivi rispetto alla maggior parte degli altri organismi fotosintetici, risultando dominanti rispetto alle altre popolazioni fitoplanctoniche. In tali condizioni, le popolazioni di cianobatteri possono aumentare in maniera massiccia per formare fioriture visibili anche ad occhio nudo (Fig. 5).

Figura 5. Fioritura di cianobatteri (bloom) in acque dolci.

Dei circa 150 generi noti di cianobatteri, più di 40 comprendono specie responsabili della produzione di cianotossine e proprio in base alla capacità di produrre questi composti vengono distinti in produttori e non produttori.

Le tossine più comunemente prodotte afferiscono alle classi delle epatotossine (microcistine e nodularine), neurotossine (anatossina–a, anatossina–a (S) e saxitossine), citotossine

(cilindrospermopsine) e dermatotossine (aplisiatossine e debromoaplisiatossine), come descritto da Viaggiu *et al*. (2011) a cui si romanda per una completa discussione della materia.

Negli ambienti d'acqua dolce le microcistine sono più frequentemente prodotte da specie appartenenti ai generi *Microcystis*, *Planktothrix* (*Oscillatoria*) e *Dolichospermum* (*Anabaena*) (Fig. 6; Viaggiu *et al*., 2011). È stata osservata la produzione di microcistina da parte di cianobatteri appartenenti al genere *Nostoc* (provenienti da *habitat* acquatici e subaerei e da forme sub-aereofitiche dei generi *Hapalosiphon* e *Phormidium* (Viaggiu *et al*., 2011). Negli ambienti salmastri (come il mar Baltico) o nei laghi salati ed estuari (come in Australia e Nuova Zelanda), *Nodularia spumigena* produce la tossina nodularina (Viaggiu *et al*., 2011).

Le neurotossine sono comunemente prodotte da *Dolichospermum* (*Anabaena*) e *Anabaena*, meno frequentemente da *Aphanizomenon*, *Lyngbya* e *Oscillatoria* (Viaggiu *et al*., 2011).

Cylindrospermopsis, *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Raphidiopsis* e *Umezakia* producono cilindrospermopsine, mentre alcune specie di *Lyngbya*, *Oscillatoria* e *Schizothrix* sono principalmente responsabili nella produzione di dermatotossine (Viaggiu *et al*., 2011).

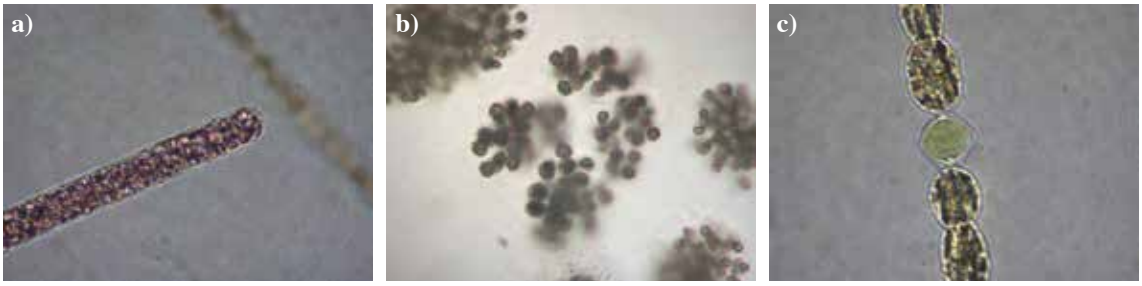


Figura 6. Esempi di cianobatteri filamentosi come Planktothrix rubescens *(a) e* Anabaena *sp. (c) e una forma coloniale come* Microcystis *sp. (b).*

I primi episodi che hanno fatto pensare ad un'azione tossica da parte di cianotossine risale al 1870, in sud Africa, in cui si osservò la morte di alcune pecore che avevano bevuto l'acqua dal lago di Alexandrina. È ormai accertato che le cianotossine rappresentano un rischio attuale per la salute animale ed umana.

Mortalità di pecore, mucche, cavalli, maiali, cani, pollame, uccelli selvatici e pesci si sono verificate a seguito dell' ingestione di fioriture di cianobatteri.

Microcistine, anatossina-a, homoanatoxin-a, saxitossine, nodularine, cilindrospermosina e anatossina-a (S) sono stati identificati come gli agenti tossici in grado di causare, da soli o in combinazione, gravi danni alla salute.

Un grave episodio di intossicazione umana attribuita a cianotossine si verificò in Caruaru (Brasile) nel 1996. L'acqua proveniente da un lago caratterizzato da fioriture di cianobatteri (*Microcystis*, *Anabaena* e *Cylindrospermopsis*) fu utilizzata in una clinica per emodialisi.

Il trattamento dell'acqua per renderla utilizzabile fù inefficace e di 126 pazienti sottoposti ad emodialisi 60 di loro morirono. L'86% dei pazienti manifestò sintomi di danno epatico. Pazienti gravemente colpiti hanno mostrato anche una serie di *deficit* neurologici. Ulteriori casi di malattia umana di pazienti in emodialisi, esposti ad acqua trattata contenente cianobatteri, si sono verificati in Brasile anche dopo il 1996. Altri episodi di avvelenamento dovuti a cianobatteri tossici si sono verificati successivamente, ma senza arrivare a causare la morte delle persone colpite. Nel Regno Unito, per esempio, alcuni soldati che si erano immersi per nuotare e praticare sport acquatici in acque contaminate da schiume di *Microcystis*, hanno

manifestato sintomi che includevano malattie gastrointestinali, grave polmonite atipica e indicazioni di danni al fegato che richiedono un ricovero in ospedale.

Episodi di avvelenamento dovuti all'ingestione di acqua con cianobatteri tossici sono riportati a Palm Island (Queensland, Australia) nel 1979. Alcuni indigeni sono stati ricoverati in ospedale dopo aver bevuto acqua contenente una fioritura di *Cylindrospermopsis raciborskii*. In un periodo di 21 giorni, 139 bambini e 10 adulti sono stati colpiti, e circa il 70% di loro hanno dovuto ricevere terapia endovenosa.

In letteratura si trovano riportati numerosi casi di intossicazioni ad animali e all'uomo dovute a tossine rilasciate da cianobatteri (Tabella 1).

Tabella 1. Distribuzione geografica della comparsa di *bloom* di cianobatteri tossici nel mondo (Metcalf & Codd, 2014)

Europa	Belgio, Repubblica Ceca, Danimarca, Estonia, Finlandia, Francia, Germania, Grecia, Ungheria, Irlanda, Italia, Olanda, Norvegia, Polonia, Portogallo, Romania, Russia, Serbia, Slovacchia, Slovenia, Spagna, Svezia, Svizzera, Ucraina, Regno Unito
America	Argentina, Bermuda, Brasile, Canada, Cile, Messico, USA (27 Stati), Venezuela
Asia	Bangladesh, India, Israele, Giappone, Giordania, Malesia, Nepal, Cina, Filippine, Qatar, Arabia Saudita, Sri Lanka, Corea del Sud, Taiwan, Tailandia, Turchia, Vietnam
Oceania	Australia (New South Wales, Queensland, Australia del Sud, Tasmania, Victoria, Western Australia), New Caledonia, Nuova Zelanda
Africa	Botswana, Egitto, Etiopia, Kenya, Marocco, Sud Africa, Zimbabwe
Mari	Mar Baltico, Mar dei Caraibi, Oceano Atlantico, Indiano e Pacifico, Antartico

Per quel che riguarda lo sviluppo di *bloom* di cianobatteri tossici in Italia, si cita di seguito quanto descritto in Viaggiu *et al*., 2011. In letteratura si riportano episodi dovuti alla presenza e allo sviluppo di fioriture di cianobatteri tossici che hanno interessato in totale 61 laghi e invasi artificiali italiani.

Nei laghi dell'Italia settentrionale è stata riscontrata la presenza di *Planktothrix rubescens* (Fig. 6). Studi approfonditi sulla comunità fitoplanctonica dei laghi profondi subalpini (Como, Garda, Iseo, Lugano e Maggiore) hanno permesso di ottenere serie molto lunghe di dati chimico-fisici e biologici, evidenziando uno stato di degrado della qualità dell'acqua dovuto ad un graduale processo di eutrofizzazione di questi ambienti. Inoltre, nella maggior parte dei laghi dell'Italia settentrionale sono state osservate, associate a *P. rubescens* (o in successione), specie appartenenti ai generi *Anabaena, Aphanizomenon e Microcystis* (Fig. 6) (Viaggiu *et al*., 2011).

Un aspetto peculiare delle fioriture cianobatteriche nei laghi profondi subalpini è dovuto al fatto che questi fenomeni si manifestano anche in ambienti con un basso livello trofico, come il Lago Maggiore e il Lago di Garda, tanto da meritarsi la definizione di "*Oligotrophic blooms*". Peraltro, non si può escludere che all'evoluzione recente del fenomeno nei grandi laghi subalpini abbiano contributo condizioni meteo-climatiche che hanno favorito un eccezionale rifornimento di nutrienti allo strato trofogenico (Viaggiu *et al*., 2011).

Per quanto riguarda i piccoli laghi dell'areale subalpino, quelli nei quali è più frequente lo sviluppo di fioriture cianobatteriche sono i più compromessi dal punto di vista dell'evoluzione trofica. Esempio emblematico sono i piccoli laghi lombardi della fascia pedemontana, come Alserio, Pusiano, Varese. In questi bacini sono frequenti le segnalazioni di fioriture di *Planktothrix rubescens* (Lago di Pusiano), *Microcystis* spp. e *Anabaena* spp. (Lago di Vare-

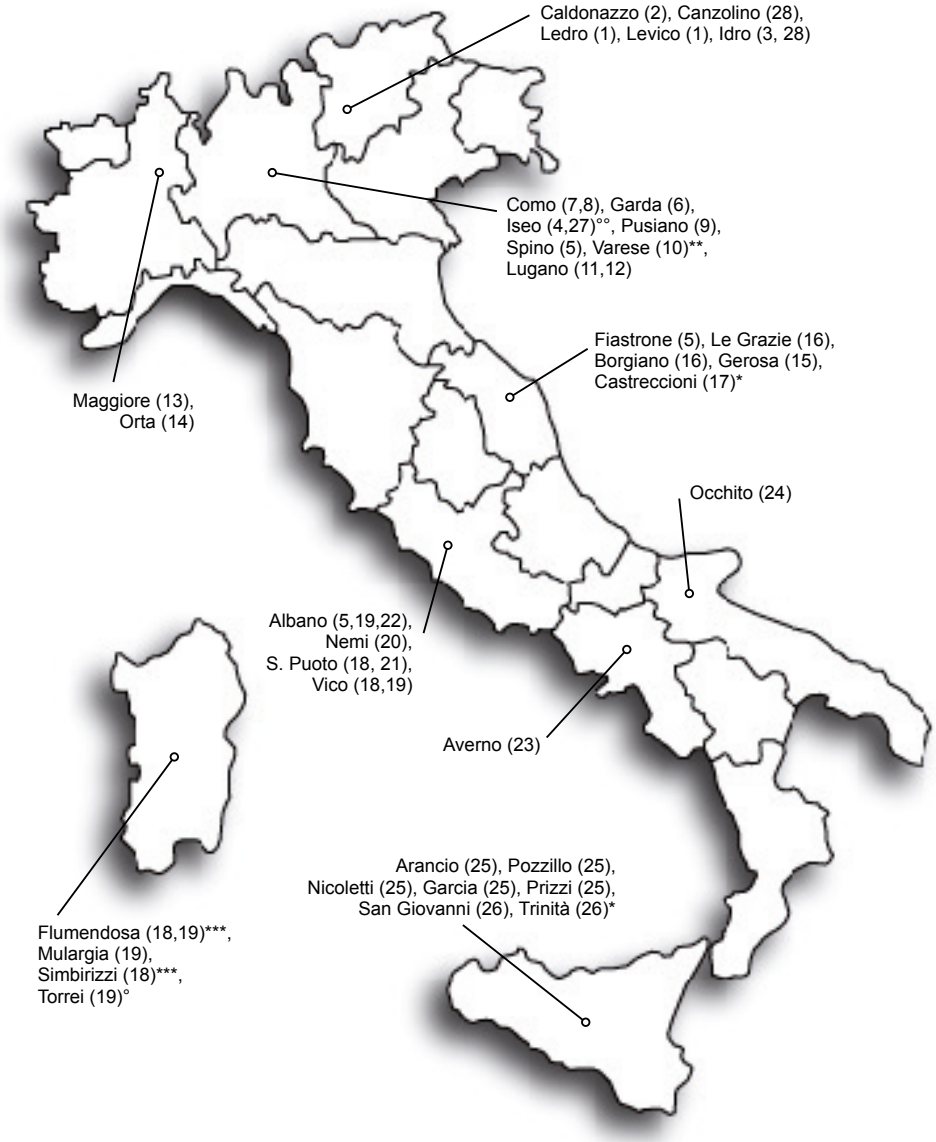


Figura 6. Distribuzione di fioriture di Planktothrix rubescens *nei laghi e invasi italiani tra il 1992 e il 2009 (Viaggiu* et al.*, 2011).*

1 Flaim & Pinamonti 2000; 2 Costaraoss *et al*. 2010; 3 D'Alelio *et al*. 2011; 4 Garibaldi *et al*. 2003; 5 Viaggiu *et al*. 2003; 6 Salmaso 2000; 7 Bettinetti *et al*. 2000; 8 Buzzi 2002; 9 Legnani *et al*. 2005; 10 Pomati *et al*. 2000; 11 Salmaso *et al*. 2003; 12 Salmaso *et al*. 2006; 13 Morabito *et al*. 2002; 14 Morabito 2001; 15 Manganelli *et al*. 2010; 16 Bruno *et al*. 2009; 17 Bartolelli *et al*. 2005; 18 Bruno *et al*. 1992; 19 Messineo *et al*. 2009; 20 Margaritora *et al*. 2005; 21 Viaggiu *et al*. 2008; 22 Messineo *et al*. 2010; 23 Ferranti *et al*. 2009; 24 Ferretti *et al*. 2010; 25 Naselli-Flores *et al*. 2007; 26 Barone & Naselli Flores 2000; 27 Garibaldi *et al*. 2000; 28 Disponibile all'indirizzo http://de.camera.it/.

* Presenza di *Planktothrix agardhii*; ** Presenza di *Planktothrix* FP1; *** Presenza di *Planktothrix rubescens* e *P. agardhii*; ° Presenza di *Planktothrix* spp., °° Presenza di *Planktothrix tenuis*.

Figura 7. Presenza o fioriture di specie di cianobatteri appartenenti ai generi Dolichospermum, Aphanizomenon, Cilindrospermopsis *e* Microcystis *nei laghi e invasi italiani (1992-2010) (Viaggiu* et al.*, 2011).*

1 Garibaldi *et al*. 1997; 2 Garibaldi *et al*. 2000; 3 Garibaldi *et al*. 2003; 4 Salmaso *et al*. 2003; 5 Manti *et al*. 2005; 6 Salmaso 2000; 7 Salmaso 2002; 8 Salmaso 2005a; 9 Messineo *et al*. 2010; 10 Salmaso 2005b; 11 Bettinetti *et al*. 2000; 12 Buzzi 2002; 13 Legnani *et al*. 2005; 14 Ravera & Scotto 1999; 15 Messineo *et al*. 2009; 16 Bartolelli *et al*. 2005; 17 Bogialli *et al*. 2006; 18 Gallo *et al*. 2009; 19 Naselli Flores & Barone 2005; 20 Barone & Naselli Flores 2000; 21 Naselli Flores *et al*. 1998; 22 Flaim & Pinamonti 2000; 23 ISS-TOV dati personali; 24 Margaritora *et al*. 2005.

Figura 8. Presenza o fioriture di specie di cianobatteri appartenenti ai generi Dolichospermum, Aphanizomenon, Cilindrospermopsis, *e* Microcystis *nei laghi e invasi della Sardegna (1992-2010) (Viaggiu* et al., *2011).*

1 Messineo *et al*. 2009; 2 Bruno *et al*. 1994; 3 Sechi 2000; 4 Manti *et al*. 2005; 5 Bruno *et al*. 1992.

se); *Aphanizomenon flos-aquae* (Ralfs ex Bornet & Flahault, 1888 (Lago Alserio). Anche per alcuni laghi del Trentino la specie più diffusa è *P. rubescens,* ma si riporta anche la presenza di *Aphanizomenon flos-aquae* e di *Microcystis aeruginosa* Kützing (Kützing, 1846) (Viaggiu *et al*., 2011).

Nell'Italia centrale e meridionale la specie *P. rubescens* si è sviluppata abbondantemente nei laghi di origine vulcanica sia laziali (Albano, Vico e Nemi), sia campani (Lago di Averno). Altri casi di fioriture sono stati riscontrati nei laghi Fiastrone, delle Grazie, Borgiano, Gerosa e nel Lago Occhito in Puglia (Viaggiu *et al.,* 2011).

Nell'Italia centrale le sole segnalazioni sulla presenza di *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska, Seenayya et Subba Raju, 1972) riguardano il Lago Trasimeno in Umbria e il Lago Albano nel Lazio. La presenza abbondante di cianobatteri nei laghi laziali è nota da tempo e già nel 1953 si riportava un episodio di fioritura eccezionale nel Lago Albano, fatto confermato negli anni '80 da studi morfometrici su popolazioni di *Aphanizomenon ovalisporum* Forti per lo stesso bacino e di *Anabaena bergii* Ostenfeld var. *minor* Kisselev per il Lago di Nemi. In anni più recenti, studi sulle condizioni trofiche e sulle comunità fitoplanctoniche del Lago Albano hanno evidenziato condizioni critiche delle acque, con una tendenza verso uno stato di meso-eutrofia e una ridotta biodiversità, accoppiata invece a uno sviluppo di diverse specie di cianobatteri, tra cui *Planktothrix* e *Anabaena* spp., che rappresentavano fino al 47-65% del *fitoplancton* totale (Viaggiu *et al*., 2011).

La presenza di specie di cianobatteri responsabili di fioriture o potenziali produttori di tossine è stata anche riportata per il Lago di Nemi e per il Lago di S. Puoto. Inoltre, la presenza di *Microcystis aeruginosa* è segnalata in altri laghi dell'Italia centrale: Massaciuccoli in Toscana, Trasimeno in Umbria, Liscione in Molise e Polverina nelle Marche, dove è stato possibile riscontrare anche la tossicità per la microcistina RR (Viaggiu *et al*., 2011).

Nonostante i laghi e gli invasi localizzati nelle parti più semiaride della penisola italiana rappresentino la più importante sorgente idrica per le varie attività umane, la presenza e le fioriture di cianobatteri tossici nelle zone meridionali sono ancora scarsamente segnalate e non sono al momento valutabili nella loro reale diffusione.

Ciò nonostante, nell'Italia insulare sono state descritte fioriture di *P. rubescens* in Sicilia nei laghi Arancio, Pozzillo, Nicoletti, Garcia, Prizzi e in Sardegna nei laghi Simbrizzi, Flumendosa, Mulargia e Torrei. Inoltre, *M. aeruginosa* e *Dolichospermun flos-aquae* (Wacklin, Hoffmann et Komárek, *2009; ex Anabaena flos-aquae,* Brébisson ex Bornet & Flauhault, 1888) sono state riportate come ricorrenti nella maggior parte dei 27 laghi e invasi siciliani, in cui la formazione di fioriture di cianobatteri dal 1979 è stata favorita da fenomeni di crescente eutrofizzazione, mentre in Sardegna i 36 bacini interessati da presenza e/o fioriture di cianobatteri sono numerosi e da tempo monitorati (Fig. 8; Viaggiu *et al*., 2011).

In sintesi, in Italia sono disponibili dati sulla presenza di specie tossiche di cianobatteri solo per 61 laghi tra i circa 500 distribuiti sul territorio (tralasciando i corpi lacustri minori) in 13 regioni su 20. Mancano completamente dati sul resto dei laghi e invasi, alcuni peraltro monitorati regolarmente dagli enti preposti, ma i cui risultati non sono facilmente accessibili e raramente organizzati in modo scientifico. Tuttavia, senza tale valutazione dei rischi, fioriture di cianobatteri possono essere etichettate tossiche, anche se nessuna valutazione del rischio è stata effettuata.

Attualmente i processi di potabilizzazione in uso sono in grado di rimuovere gran parte delle cellule algali, anche se la somma del contenuto di tossine presenti a livello intra- ed extra-cellulare è generalmente considerata nell'acqua potabile l'indice più importante nella valutazione del rischio di esposizione a tali tossine.

Per le cianotossine, la normativa italiana non prevede, a tutt'oggi, valori di riferimento. Qualora si sospetti la presenza di forme tossiche in concentrazioni tali da rappresentare un potenziale pericolo per la salute umana, l'autorità sanitaria competente deve provvedere

all'allestimento di un piano di controllo, come previsto nel DL.vo 31/2001, art. 8 e relativi allegati per la ricerca dei parametri accessori.

L'Organizzazione Mondiale della Salute (WHO), tuttavia, ha definito dei valori guida per alcune specie tossiche, già inserite da molte nazioni nei regolamenti delle proprie legislazioni.

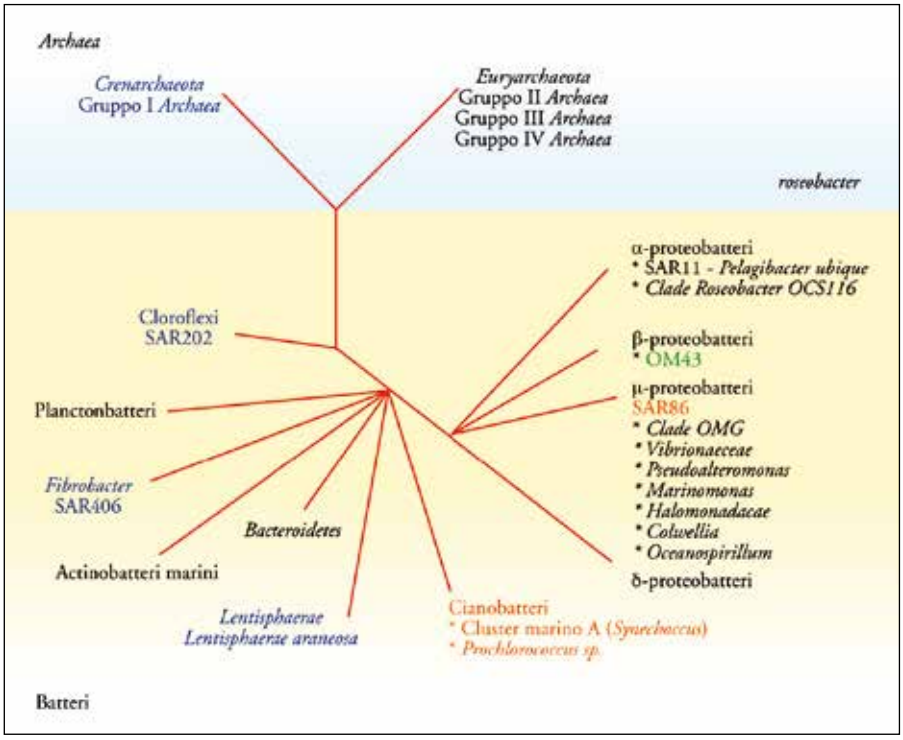
BIBLIOGRAFIA

1) Ade P., Funari E., Poleti R., 2003. Il rischio associato alle tossine di alghe marine. Ann. Ist. Super. Sanità 39: 53-68
2) Ferrante M., Sciacca S., Fallico R., Fiore M., Oliveri Conti G., Ledda C., 2013. Harmful algal blooms in the Mediterranean Sea: Effects on human health, Scientific Reports, 587
3) Fire E. & Van Dolah F. M., 2012. Marine Biotoxins. In: New Directions in Conservation Medicine: Applied Cases of Ecological Health a cura di A. Alonso Aguirre, Richard Ostfeld, Peter Daszak, Oxford University Press Inc., New York
4) Gerssen A., Pol-Hofstad I. E., Poelman M., Mulder P. P. J., van den Top H. J., de Boer J., 2010. Marine toxins: chemistry, toxicity, occurrence and detection, with special reference to the Dutch situation. Toxins 2: 878-904
5) Metcalf J. S. & Codd G. A., 2014. A Review of Current Knowledge: Cyanobacterial Toxins (Cyanotoxins) in Water, FR/R0009 Foundation for Water Research, Marlow, Buckinghamshire, 45 pp.
6) Creekmore L. H., 1999. Algal Toxins. In: Field Manual of Wildlife Diseases General Field Procedures and Diseases of Birds - Biological Resources Division Information and Technology Report 1999–001, Madison, U.S.A., pp. 263-266
7) Viaggiu E., Morabito G. & Della Libera S., 2011. Specie tossiche. In: Cianobatteri in acque destinate a consumo umano. Stato delle conoscenze per la valutazione del rischio. A cura di Luca Lucentini e Massimo Ottaviani per il "Gruppo nazionale per la gestione del rischio cianobatteri in acque destinate a consumo umano", pp. 11-25. Rapporti ISTISAN 11/35 Pt 1
8) http://allaboutalgae.com/what-are-algae/
9) http://www.seaweb.org/resources/briefings/algae.php

Capitolo 3

LE BIOTOSSINE MARINE. CARATTERISTICHE, ATTIVITA BIOLOGICA, METODI DI DETERMINAZIONE E DOSAGGIO

SONIA FLAMINIA LAVAGNOLI



INTRODUZIONE

Fioriture algali, maree rosse, "*red tide*", "*harmful algal bloom*", "*eaux rouges*", "*purga de mar*", sono solo alcune delle espressioni usate per indicare un abnorme sviluppo della componente vegetale acquatica che si verifica, in acque dolci e marine, in ogni parte del mondo (figura 1).

Note fin dall'antichità, riportate nella Bibbia come uno dei flagelli dell'Egitto ("e tutte le acque del fiume divennero di sangue. E i pesci morirono, e il fiume puzzava e gli egiziani non potevano berne l'acqua…"; Esodo 7:20-21), descritte da Omero e da Tacito, le maree rosse si evidenziano quando, a particolari condizioni climatiche e correntimetriche, si associa, attraverso le emissioni fluviali, un maggior apporto di nutrienti (sali di N e di P) provenienti dal dilavamento del terreno (eutrofizzazione naturale) o, come sempre più spesso accade, da scarichi urbani, industriali, agricoli e zootecnici (eutrofizzazione antropogenica) (Piccinetti e Bombace, 1989; Volterra e Donati, 1989; Sellner *et al*., 2003).

Figura 1: Maree rosse ed effetti sugli organismi acquatici.

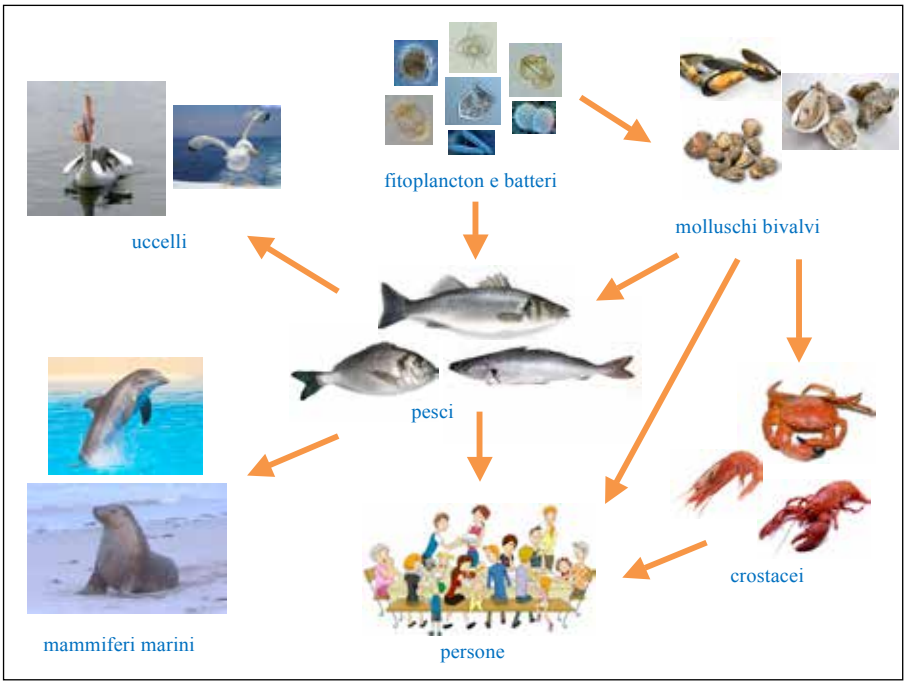


Figura 2: Catena alimentare attraverso cui si trasmettono le biotossine.

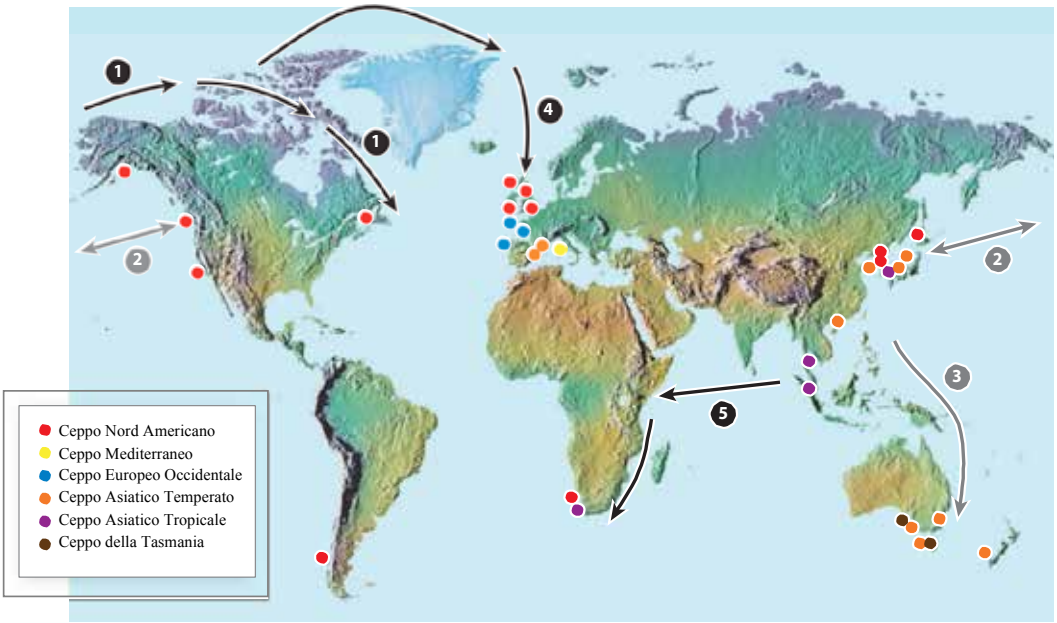


Figura 3: Ceppi di Alexandrium tamarensis. *Le frecce nere (1-4-5) indicano le migrazioni naturali, mentre le frecce grigie (2-3) indicano la dispersione di origine umana (da Anderson* et al.*, 2012).*

Durante tale fenomeno, si assiste, oltre a notevoli mortalità di pesci, uccelli e mammiferi marini, alla produzione di sostanze tossiche denominate biotossine, che, attraverso specifiche catene trofiche, possono arrivare all'uomo e determinare l'insorgenza di quadri patologici e clinici noti come biointossicazioni (figura 2) (Anderson, 2009; Fire e Van Dolah, 2012).

Se nel 2000 è stato stimato che 60.000 persone ogni anno erano vittime di intossicazioni da molluschi, con un tasso di mortalità del 1,5%, in questi ultimi anni si è registrato un ulteriore e continuo aumento di biointossicazioni umane, legate al consumo di prodotti della pesca e dell'acquacoltura, e ciò ha stimolato la ricerca degli agenti causali e dei composti tossici che ne sono alla base (Munday e Reeve, 2013).

È stato evidenziato che la maggior parte di questi organismi appartengono al *fitoplancton* (dal greco *phytòn*-pianta e *plánktos*-errante), cioè ad alghe unicellulari, isolate o riunite in piccole colonie, che vengono trasportate passivamente dalla corrente e che appartengono, essenzialmente, ai dinoflagellati (*Dinophyceae*) e alle diatomee (*Bacillariophyceae*), ma anche altre alghe, batteri marini e cianobatteri (*Cyanophyta*) risultano coinvolti.

Si conoscono oltre 4.000 specie di alghe marine, delle quali 70-80 producono tossine. Di norma la presenza delle alghe diventa visibile solo quando queste raggiungono concentrazioni elevate (circa 20.000 - 50.000 cellule algali/ml) e si verificano le cosiddette "maree rosse", essendo una parte delle alghe di colore rosso bruno, ma anche verdi, gialle o marroni. Tuttavia, anche in assenza di maree visibili, con concentrazioni nelle acque inferiori a 200 cellule/ml, si possono avere molluschi contenenti livelli di tossine tali da causare patologia nell'uomo e negli animali domestici e selvatici (Cattaneo e Bernardi, 2010).

Se è vero che negli ultimi anni sono state migliorate le conoscenze e sono stati sviluppati metodi di rilevazione efficaci per la rilevazione algale, è pur vero che specie algali tossiche

hanno progressivamente colonizzato zone marine geograficamente distanti a causa di fenomeni naturali di migrazione algale attraverso le correnti e le tempeste e anche per cambiamenti climatici globali (effetto-serra e riscaldamento degli oceani) che rendono favorevole la colonizzazione di aree indenni (figura 3 e 4).

A questi fenomeni, si aggiungono anche la dispersione attraverso il trasporto delle forme cistiche con le acque di zavorra delle navi o con il movimento di *stock* di molluschi (figura 5) (Ade *et al*., 2003; Tartaglione, 2005; Anderson *et al*., 2012).

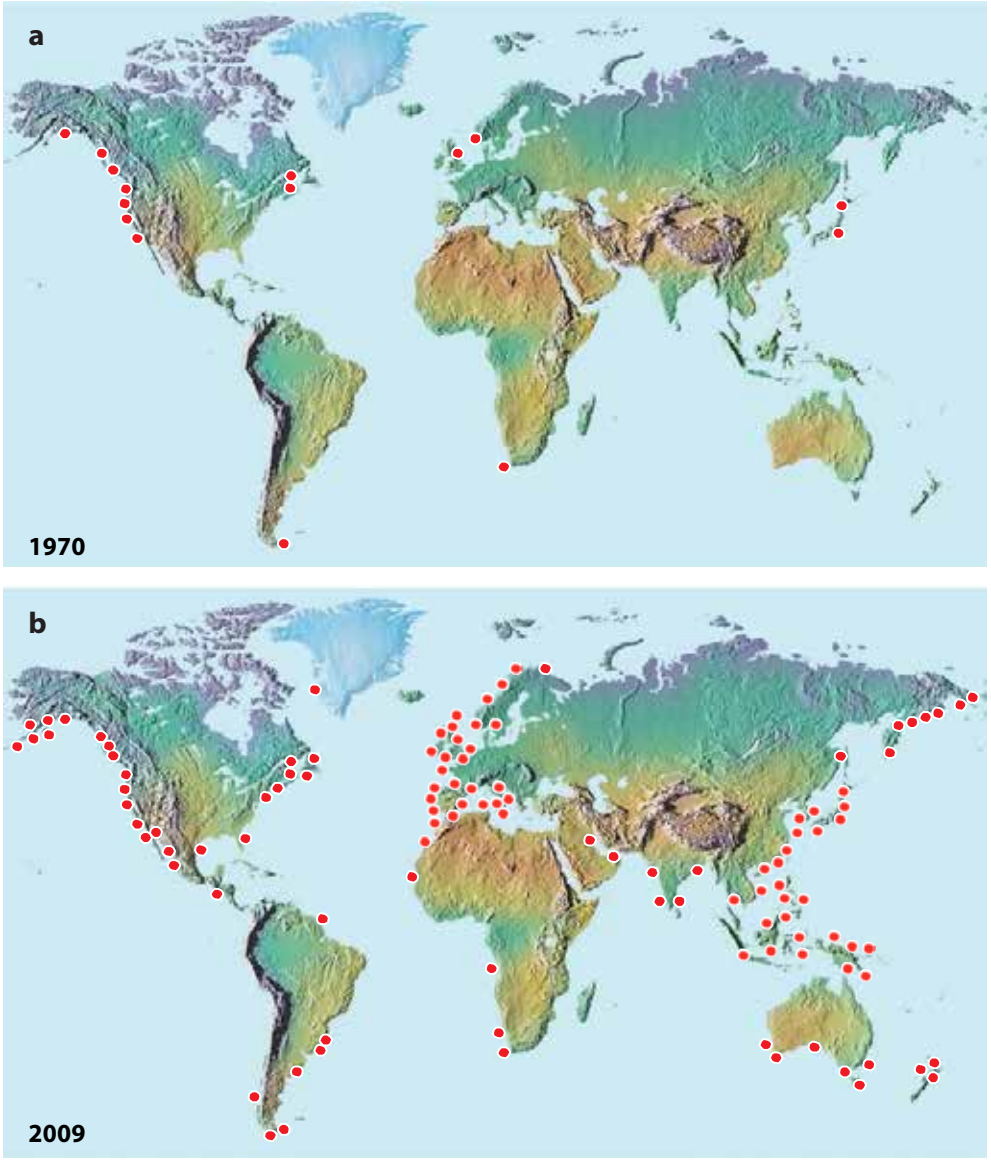


Figura 4: Rilevazione di tossine PSP negli anni 1970 (a) e 2009 (b) (da U.S. National Office for Harmful Algal Blooms*).*

Attualmente non è chiaro il motivo per cui le alghe producano tali metaboliti tossici, né se ne conoscono per tutti le vie biosintetiche. È stato ipotizzato che essi intervengano nel mantenimento dell'equilibrio fisiologico globale dell'organismo algale (sintesi di acidi nucleici o della parete cellulare), o che, secreti da un clone algale, agiscano inibendo lo sviluppo di altri organismi (allelopatia) (Zaccaroni e Scaravelli, 2008; Gerssen *et al*., 2010).

Le alghe producono una sorprendente varietà di biotossine, con caratteristiche e struttura chimica differenti (tabella 1). Molte tossine non sono ancora state esattamente identificate, a causa delle difficoltà incontrate nella coltivazione *in vitro* di talune specie algali. Ciò, almeno in parte, spiega perché, malgrado gli sforzi profusi, non siano tuttora disponibili, per tutte le tossine conosciute, metodi completamente soddisfacenti per la loro determinazione in campioni ambientali e alimentari (Hess e Nicolau, 2010).

Le biotossine, essendo prodotti naturali, vengono, al contrario di pesticidi, diossine e PCB, metabolizzati da diversi sistemi enzimatici. Questo comporta un ampliamento della gamma di sostanze bioattive che devono essere ricercate e, normalmente, una variazione della loro tossicità.

Da un punto di vista chimico-strutturale, le biotossine possono essere suddivise in diverse classi, tra cui aminoacidi (acido domoico), alcaloidi (saxitossina e tetrodotossina) e polichetidi (tutti gli altri).

Il loro peso molecolare è compreso tipicamente tra 300 e 1500 Dalton. Sono quindi piccole molecole, ma alcune tossine, come palitossine (PLTXs) e maitotossine (MTXs), sono molecole di dimensioni molto considerevoli, con un peso molecolare, rispettivamente, di 2678 e 3422 Dalton.

MTX, in particolare, è stata segnalata per essere la più grande tossina naturale di tipo non-proteico. La diversa natura chimica e la dimensione molecolare distinguono le ficotossine dal grande gruppo dei veleni di serpenti, ragni e lumache, che in genere sono miscele molto potenti di tossine proteiche (Hess, 2010).

Per quanto riguarda la sintomatologia, si possono distinguere, in base ai sintomi prevalenti, cinque categorie: paralitici (PSP, TFP), neurotossici (NSP), gastroenterici (DSP, AZP), amnesici (ASP), respiratori (BTX, PLTX) (tabella 2).

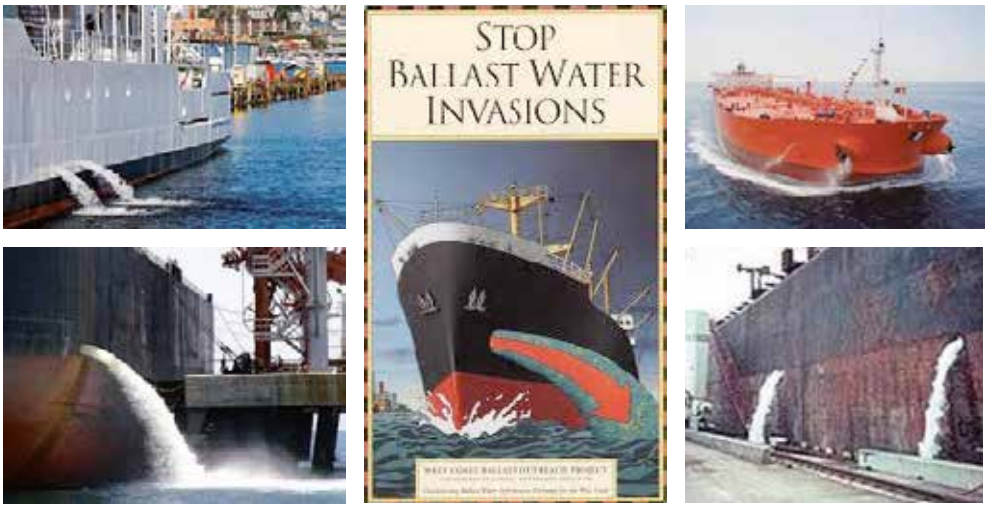


Figura 5: Trasporto di forme cistiche algali attraverso l'acqua di zavorra delle navi.

La sintomatologia clinica può essere non specifica e, soprattutto per le forme che danno gastroenteriti, è necessaria la diagnosi differenziale con infezioni batteriche (*Salmonella*, *Shigella*, *E. coli*, *Campylobacter*, *Vibrio cholerae*, *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus* e *Plesiomonas shigelloides*), virali, particolarmente norovirus (virus *Norwalk*, virus *Norwalk-like*) e virus dell'epatite A, o forme allergiche (Cattaneo e Bernardi, 2010; Hinder *et al*., 2011).

Il lavoro che segue prende in esame le principali biointossicazioni alimentari umane legate al consumo di prodotti marini (pesci, molluschi, crostacei) contenenti biotossine di origine algale e/o batterica e le più conosciute intossicazioni da cianobatteri, gruppo di batteri fotosintetici in grado di indurre effetti tossici attraverso il consumo di acqua contaminata o attraverso le attività di balneazione. Tuttavia l'argomento è ampio e in continua evoluzione e costantemente vengono segnalate alghe tossiche e categorie di biotossine come causa di avvelenamenti nell'uomo e negli animali terrestri e marini, domestici e selvatici.

Tabella 1: Caratteristiche chimiche delle principali biotossine algali (modificata da Hess, 2010).

Tossina	Struttura chimica	Formula	P.M.	UV	PKA	Solubilità
Saxitossina	Alcaloidi tetraidropurine	$C_{10}H_{17}N_7O_4$	299	NA	8.1-11.5	Idrofilica
Brevetossina-B	Polieteri ciclici (10/11 anelli) a forma di scala	$C_{50}H_{70}O_{14}$	894	208	NA	Lipofilica
Acido Ocadaico	Polieteri macrociclici acidi lineari	$C_{44}H_{68}O_{13}$	804	NA	4.9	Lipofilico
Pectenotossina-2	Lattoni polieteri neutri	$C_{47}H_{70}O_{14}$	858	235	NA	Lipofilica
Yessotossina	Polieteri solfati a forma di scala	$C_{55}H_{82}O_{21}S_2$	1140	230	6.9	Anfifilica
Azaspiracide	Polieteri contenenti N	$C_{47}H_{71}NO_{12}$	841	NA	5.8	Lipofilico
13-desmetil-Spirolide C	Composti macrociclici contenenti imine	$C_{41}H_{61}NO_7$	691	NA	NR	Lipofilico
Gymnodimine	Composti macrociclici contenenti imine	$C_{32}H_{45}NO_4$	507	NA	NR	Lipofilica
Palitossina	Composti polidrossilati con coda acrilamidica	$C_{129}H_{223}N_3O_{54}$	2678	263 233	NR	Anfifilica
Acido Domoico	Amminoacido ciclico, 3 gruppi carbossilici	$C_{15}H_{21}NO_6$	311	242	2.1-3.7 5.0-9.8	Idrofilico
P-Ciguatossina-4B	Polieteri a forma di scala	$C_{60}H_{85}O_{16}$	1061	223	NA	Lipofilica
Maitotossina	Polieteri, 4 strutture ad anello fuse	$C_{164}H_{256}O_{68}S_2NA_2$	3422	230	NR	Anfifilica

NA: non applicabile; NR: non riportato

Tabella 2: Principali biointossicazioni alimentari nell'uomo.

Sindrome tossica	Tossine	Dl_{50} ARfD	Meccanismo d'azione	Effetti nell'uomo	Origine	Vettori	Distribuzione
Paralytic Shellfish Poisoning (PSP)	Saxitossina (STX) Gonyautossine (GTX)	10 μg/kg 0,5 μg STX eq./kg.	Blocco canali del Na^+ voltaggio-dipendenti (sito 1 subunità α). SNC, periferico e neuromuscolare	Nausea, parestesie paralisi muscolare, tachicardia, difficoltà respiratorie, morte	*Alexandrium* spp. *Pyrodinium* spp. *Gymnodinium* spp.	Molluschi bivalvi	Nord America, Nord Europa, Giappone
Neurotoxic Shellfish Poisoning (NSP)	Brevetossine (PbTx)	170 μg PbTx-3/kg ND	Apertura canali del Na^+ voltaggio-dipendenti (sito 5 subunità α). SNC, periferico e neuromuscolare	Parestesie, spasmi, fascicolazioni, paralisi spastica. Sintomi respiratori. No decessi	*Karenia brevis*	Molluschi bivalvi	Florida, Golfo del Messico Stati Uniti, Nuova Zelanda
Diarrhetic Shellfish Poisoning (DSP)	Acido ocadaico (OA) Dinofisitossine (DTX)	200 μg OA/kg 0,3 μg OA eq./kg	Blocco PP1 e PP2A Alterazione E-caderina. > α-TNF, stress osssidativo. Promotori tumorali, Apoptosi; Genotossici	Nausea, vomito, diarrea, dolori addominali. No decessi	*Dinophysis* spp. *Prorocentrum* spp.	Molluschi bivalvi	Cosmopolita
	Pectenotossine (PTX)	250 μg PTX-2/kg 0,8 μg PTX-2 eq./kg	Inibizione polimerizzazione F-actina. Citotossicità e apoptosi	Nessun sintomo. Lesioni epatiche	*Dinophysis* spp.	Molluschi bivalvi	Giappone, Australia, Nuova Zelanda, Europa
	Yessotossine (YTX)	80-750 μg YTXs/kg 25 μg YTX eq./kg	> $[Ca^{2+}]_i$ < AMPc/GMPc; > attività PDA e caspasi; Alterazione E-caderina. Citotossicità e apoptosi Alterazioni immunitarie	Nessun sintomo. Lesioni cardiache	*Protoceratium reticulatum* *Lingulodinium polyedrum* *Gonyaulax spinifera*	Molluschi bivalvi	Giappone, Europa, Australia, Canada, Nuova Zelanda, Cile
Venerupin Shellfih Poisonig (VSP)	Venerupina			Gastroenterici acuti	*Exuviaella marialebouriae*	Molluschi bivalvi	Giappone, Mediterraneo, Mar Baltico
Azaspiracid Shellfih Poisoning (AZP)	Azaspiracidi (AZA)	200 μg AZA-1/kg 0,2 μg AZA-1/kg	> $[Ca^{2+}]_i$ e AMPc; Blocco canali K+. Alterazione E-caderina e < F actina. Attivazione caspasi. Necrosi e apoptosi. Promotori tumorali, cancerogeni (?), teratogeni	Nausea, vomito, diarrea, dolori addominali.	*Azadinium spinosum*	Molluschi bivalvi	Irlanda, Sud America, coste atlantiche Europa, USA, Mar Mediterraneo

Sindrome tossica	Tossine	Dl_{50} ARfD	Meccanismo d'azione	Effetti nell'uomo	Origine	Vettori	Distribuzione
Intossicazioni da Immine Cicliche (PCI)	Spirolidi (SPX)	6,9 µg desMeSPX-C/kg 1,67 µg/kg	Blocco irreversibile recettori nicotinici e muscarinici acetilcolina Canali Ca^{2+} voltaggio-dipendenti	ND	*Alexandrium ostenfeldii* *A. peruvianum*	Molluschi bivalvi	Europa, Canada, Stati Uniti, Tunisia
	Gymnodimine (GYM)	96 µg GYM-A/kg 75 µg/kg	Blocco reversibile recettori nicotinici e muscarinici dell'acetilcolina. Canali Ca^{2+} voltaggio-dipendenti		*Karenia selliformis* *Gymnodinium mikimotoi* (?)		Nuova Zelanda. Europa, Tunisia, Nord America
	Pinnatossine (PnTx)	135 µg/kg (a) ND	Blocco irreversibile recettori nicotinici e acetilcolina.		*Vulcanodinium rugosum*		Giappone, Cina, Europa, Australia, Nuova Zelanda
	Pteriatossine (PtTx)	100 µg/kg (a) ND	ND		Derivati PnTx		Giappone e Cina
Intossicazione da Palitossina (PP)	Palitossina (PLTX) Ostreocina D (Ost-D)	0,45 µg/kg p.v. 0,2 µg/kg p.v. PLTX+OstD	Alterazione pompa Na^+/K^+ ATPasi. Depolarizzazione actina. Attivazione PLA2. Promotore tumorale	Dolori e lesioni muscoli scheletrici e cardiaco. Sintomi respiratori e gastroenterici	*Palyota* spp. *Ostreopsis* spp.	Molluschi bivalvi	Cosmopolita
Amnesic Shellfish Poisoning (ASP)	Acido domoico (DA)	3,6 mg/kg 30 µg/kg	Agonista neuronale glutammato (recettori AMPA e KA)	Neurologici (perdita memoria), gastrointestinali, cardiovascolari	*Chondria armata* *Pseudo-nitzschia* spp.	Molluschi bivalvi	Giappone, Stati Uniti, Australia, Nord Europa, Nuova Zelanda
Ciguatera Fish Poisoning (CFP)	Ciguatossine (CTX) Gambiertossine (GTX)	0,45 µg /kg ND	Apertura canali del Na^+ (sito 5 subunità α). Blocco canali K^+. > ossido nitrico	Sintomi nervosi, gastroenterici, cardiovascolari	*Gambierdiscus toxicus* *Gambierdiscus* spp.	Pesci (400 specie)	Oceano Pacifico, Caraibi, Oceano Indiano
	Maitotossina (MTX)	0,15 µg/kg ND	> $[Ca^{2+}]_i$				
Tetrodotoxin Fish Poisoning (TFP)	Tetrodotossine (TTX)	8 µg/kg ND	Blocco canali del Na^+ voltaggio-dipendenti (sito 1 subunità α).	Paresi, paralisi muscolare, difficoltà respiratorie, gastroenterici, cardiovascolari	*Pseudoalteromonas* spp., *Vibrio* spp., *Bacillus* spp., *Pseudomonas* spp., *Staphylococcus* spp.	Pesci Tetrodontidi Diodontidi Molidi	Giappone, sud-est asiatico, Oceano Pacifico e Mar Mediterraneo

DL_{50} (dose letale 50%): Concentrazione di tossina che provoca la morte del 50% dei topi dopo iniezione per via i.p.;
ARfD (dose acuta di riferimento): la dose che può essere ingerita, in un periodo di 24 h o meno, senza che essa abbia un apprezzabile rischio per la salute umana.
ND (non determinata); (a): DL_{99}

2. PARALYTIC SHELLFISH POISONING (PSP)

Paralytic Shellfish Poisoning (PSP), o intossicazione paralitica da molluschi, è nota da lungo tempo. La prima segnalazione risale al 1793, riportata dal giornale di bordo del Capitano George Vancouver che, approdato nella Columbia Britannica (Canada), riportò la morte per paralisi e soffocamento di molti uomini dell'equipaggio dopo l'ingestione di frutti di mare raccolti nella zona di "*Poison Cove*". Il Capitano osservò, in seguito, che le popolazioni locali considerassero pericoloso consumare molluschi quando l'acqua del mare appariva "colorata".

Successivamente Salkowski nel 1885 descrisse i primi casi europei, ma solo nel 1937 Sommer e Meyer ne dimostrarono sperimentalmente l'origine algale (Schantz, 1974).

Le alghe responsabili di PSP sono, in prevalenza, dinoflagellate e appartengono ai generi *Alexandrium* (*A. tamarensis, A. catenella, A. acatenella, A. polyedra, A. monilata, A. minutum, A. cohorticola* e *A. fundyense)*, *Gymnodinium* (*G. catenatum*) *e Pyrodinium* (*P. phoeneus, P. bahamense* var. *bahamense*) (Figura 6).

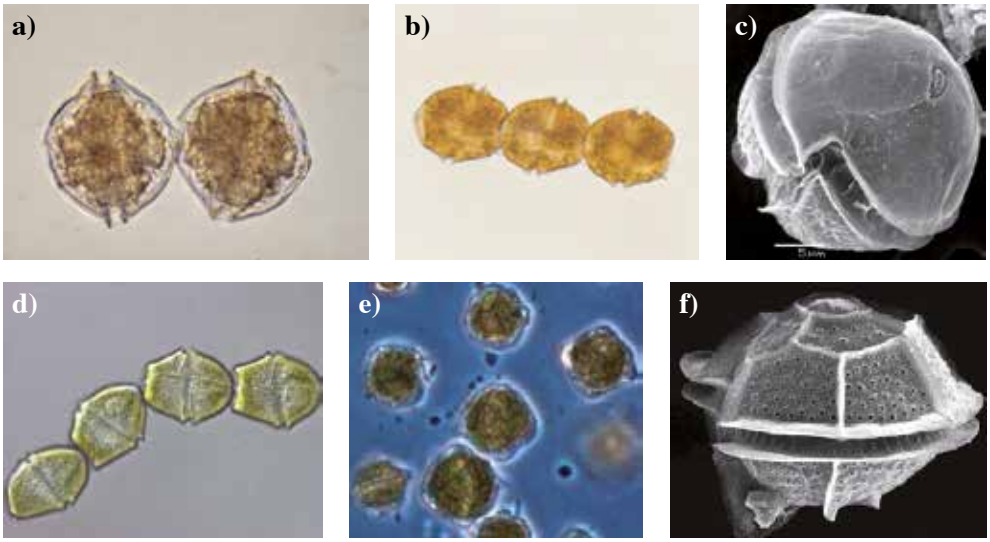


Figura 6: Alghe responsabili di PSP. Alexandrium tamarensis *(a),* Alexandrium catenella *(b),* Alexandrium *spp. (c)* Gymnodinium catenatum *(d),* Pyrodinium bahamense *(e) e (f).*

Più raramente, sono state segnalate come causa di PSP i dinoflagellati *Coolia monotis, Cocholodinium* spp. e *Amphidinium* spp. e un'alga rossa delle barriere coralline tropicali appartenente al genere *Jania* (OMS,1986; Sierra *et al*. 1998; Lefebvre *et al*., 2008; EFSA, 2009a), nonché molti cianobatteri inclusi nei generi *Anabaena*, *Cylindrospermopsis*, *Aphanizomenon*, *Planktothrix* e *Lyngbya* (Weise *et al*., 2010).

All'interno del genere *Alexandrium*, i membri *A. catenella/tamarense/fundyense* (noto come il complesso tamarensis), sono tra le specie più tossiche (Uribe e Espejo, 2003).

Batteri marini inseriti nei generi *Moraxella* e *Pseudomonas* risultano in grado di produrre diversi tipi di tossine PSP e si ipotizza pertanto che tali tossine possano essere prodotte da batteri e da microrganismi non dinoflagellati (Ogata *et al.,* 1989; Tosteson *et al.,* 1989; Kodama *et al.,* 1990, Smith *et al*., 2001).

Diversi Autori suggeriscono che i batteri associati alle alghe dinoflagellate, sia nell'ambiente naturale che in colture di laboratorio, possano influenzare direttamente la produzione di tossine (sia in termini di quantità che di varietà) o, indirettamente, influenzando il tasso di crescita delle alghe (Uribe e Espejo, 2003). Sebbene i meccanismi rimangano sconosciuti, si ipotizza che i batteri producano co-fattori, molecole di segnalazione, rendano disponibili dei nutrienti o che agiscano sul metabolismo delle tossine, inibendo o stimolando nei dinoflagellati la sintesi delle tossine (Hold *et al*., 2001).

D'altra parte anche le condizioni ambientali risultano indispensabili per la germinazione delle cisti immobili e quiescenti di dinoflagellate e l'inizio delle "fioriture". Il clima, la temperatura dei mari (superiore a 5-8 °C), la salinità, la disponibilità di nutrienti, giocano un ruolo fondamentale nello sviluppo della fase vegetativa e nella produzione di tossine. Il rapporto fra N e P presente risulta di particolare importanza: una riduzione della quantità di N determina una ridotta crescita della popolazione algale, mentre una ridotta disponibilità di P, se da un lato limita lo sviluppo della popolazione algale, dall'altro provoca un incremento delle tossine prodotte (Sarti, 2000; Bruno, 2000: Bruno e Melchiorre, 2000; FAO, 2004).

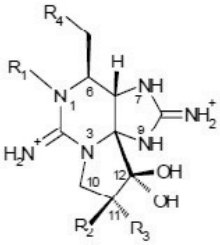
L'uomo assume le tossine PSP attraverso la catena alimentare. Gli alimenti responsabili sono rappresentati soprattutto da molluschi bivalvi filtratori di plancton, come mitili *(Mytilus edulis, M. californianus),* vongole *(Saxidomus giganteus, S. nuttalli),* pettini *(Mya arenaria),* ostriche *(Crassostrea* spp.) e cappesante (*Pecten jacobaeus*) (Onoue *et al*., 1983), i quali accumulano tossine algali prevalentemente nella ghiandola digestiva (epatopancreas) senza causare patologia nel mollusco, che all'esame ispettivo non è distinguibile da quelli non tossici (Whitefleet-Smith *et al*., 1985). Gasteropodi predatori *(Buccinum undulatum, Turbo marmorata, T. argyrostoma)* e crostacei *(Homarus americanus, Zosimus aeneus, Lophozozymus pictor),* che si alimentino di alghe e di molluschi contaminati, possono fungere da vettori secondari di intossicazione (OMS, 1986; Llewellyn e Endean, 1989; Deeds *et al*., 2008a).

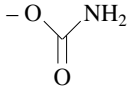
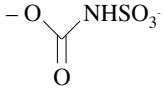
Tossine PSP possono altresì ritrovarsi in pesci (aringhe, acciughe, tonni, salmoni, merluzzi, passere, pescecani) che si nutrano di *plancton* o molluschi (Nakamura *et al*., 1984). A differenza dei molluschi e crostacei che, pur accumulando queste tossine, sono resistenti ai loro effetti nocivi, nei pesci le tossine PSP causano estese mortalità. I pesci, inoltre, non rappresentano una fonte di intossicazione, in quanto incapaci di accumulare tossine a livello muscolare (White, 1984; Deeds *et al*., 2008a).

Le tossine responsabili di PSP (figura 7 e 8) sono denominate saxitossine (STX) e gonyautossine (GTX) (White *et al*., 1986). Esse sono chimicamente definite come tetraidropurine con due gruppi guanidinici e sono tutte idrosolubili, resistenti al calore, stabili in ambiente acido, ma non in quello alcalino (Schantz, 1984; Gill *et al*., 1985).

La prima tossina ad essere identificata è stata la saxitossina, isolata in Alaska da vongole (*Saxidomus giganteus*), da cui ha preso banalmente il nome. Al momento, sono stati identificati 57 analoghi, a diversa tossicità, suddivisi in cinque gruppi: carbammati, N-solfocarbammilici, decarbammilici, deossidecarbammilici e saxitossine idrossilate (Viviani, 1991; FAO, 2004; Dell'Aversano *et al*., 2008; Weise *et al*., 2010; Holmes *et al*., 2014).

Le tossine del tipo carbammato sono le più potenti e, come tali, si ritrovano prevalentemente nei molluschi bivalvi. I derivati decarbammilici sono leggermente meno tossici, mentre i composti N-solfocarbamilici sono molto meno tossici e rappresentano il gruppo dominante nelle cellule dei dinoflagellati (Hall e Reichardt, 1984; Aune, 2014). É probabile, perciò che nel mollusco si verifichino dei processi di natura chimica o enzimatica in grado di aumentare la tossicità propria dei composti originariamente presenti nelle alghe produttrici (Shimizu e Yoshioka, 1981; Harada *et al*., 1984). Analogo processo si rileva anche dopo ingestione di molluschi nell'uomo, con conseguente sviluppo di intossicazioni sproporzionalmente gravi causate da molluschi con bassa tossicità.



Gruppo	Tossina	R1	R2	R3	R4	TEF[1]
Carbammati	**STX**	H	H	H		1
	Neo-STX	OH	H	H		1
	GTX-1	OH	H	OSO_3^-		1
	GTX-2	H	H	OSO_3^-		0,4
	GTX-3	H	OSO_3^-	H		0,6
	GTX-4	OH	OSO_3^-	H		0,7
Solfocarbammilici	**GTX-5 (B1)**	H	H	H		0,1
	GTX-6 (B2)	OH	H	H		0,1
	C3	OH	H	OSO_3^-		0,01
	C1	H	H	OSO_3^-		0,01
	C2	H	OSO_3^-	H		0,1
	C4	OH	OSO_3^-	H		0,1
Decarbammilici	**dc-STX**	H	H	H	OH	1
	dc-Neo-STX	OH	H	H		0,4
	dc-GTX-1	OH	H	OSO_3^-		NI[2]
	dc-GTX-2	H	H	OSO_3^-		0,2
	dc-GTX-3	H	OSO_3^-	H		0,4
	dc-GTX-4	OH	OSO_3^-	H		NI[2]
DODC[3]	**do-STX**	H	H	H	H	NI[2]
	do-Neo-STX	OH	H	H		NI[2]
	do-GTX-1	OH	H	OSO_3^-		NI[2]

(1) Fattore Tossicità Equivalente (2) Nessuna Informazione (3) Deossidecarbammilici

Figura 7: Struttura dei sottogruppi I-IV saxitossina(STX) analoghi (modif. da Wang, 2008)

	R_1	R_2	Idrossilati
	OSO_3^-	H	**M1ß**: 11-idrossi-N21-sulfocarbammil-STX
	H	H	**M2ß**: 11-idrossi-STX *
	OSO_3^-	OH	**M3**: 11,11-diidrossi-N21-sulfocarbammil-STX
	H	OH	**M4**: 11,11-diidrossi-STX

* Fattore Tossicità Equivalente = 0,3

Figura 8: Struttura degli analoghi idrossilati STX (sottogruppo V) (modif. da EFSA, 2009a)

Le tossine PSP agiscono a livello delle membrane eccitabili dei nervi periferici e dei muscoli scheletrici e cardiaco, bloccando selettivamente i canali del sodio voltaggio-dipendenti e ostacolandone, in questo modo, l'ingresso nella cellula (figura 9). La perdita della conduttanza degli ioni sodio determina mancata depolarizzazione delle membrane eccitabili e della trasmissione del potenziale d'azione. Vengono perciò impediti la generazione e la conduzione dell'impulso nervoso, con conseguente processo paralitico di diversa gravità a seconda della tossina e della dose ingerita. (Franz e LeClaire, 1989; FAO, 2004; Lewellyn, 2009; Stevens *et al.*, 2011).

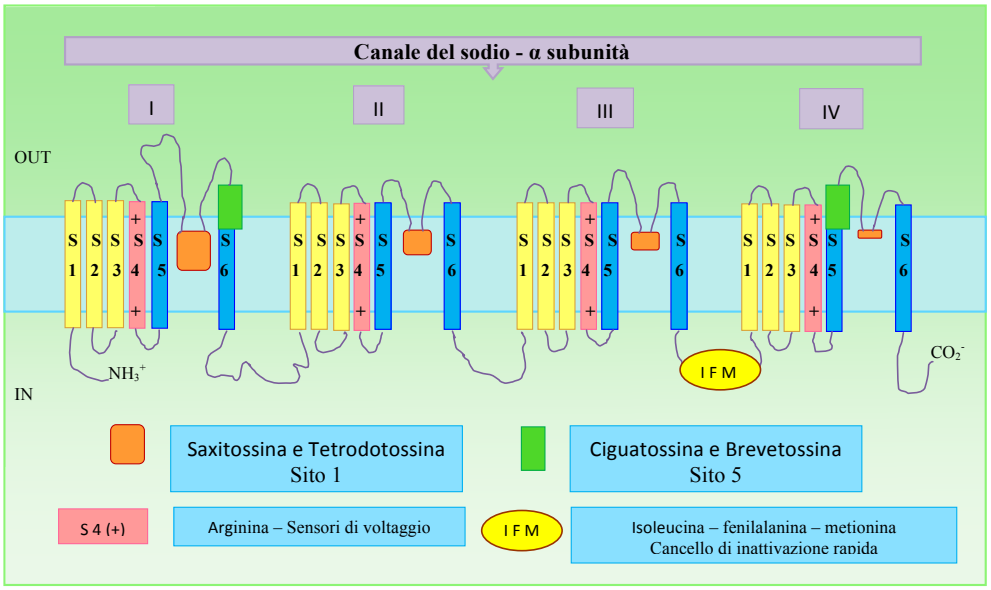


Figura 9: Struttura della α-subunità del canale del Na^+ e siti di attacco delle diverse tossine (modificata da Lee e Ruben, 2008).

Il sito di legame è all'esterno della cellula ed è stato identificato come sito 1 della α-subunità dei canali del sodio (Cestele e Catterall, 2000). Dagli studi struttura-attività di STX e dei suoi analoghi, il gruppo 7,8,9-guanidina e il diolo presente sul C_{12} risultano i fattori determinanti nel legame delle tossine al recettore. La catena laterale carbammilica contribuisce al legame in una certa misura, anche se non fondamentale, mentre l'introduzione del gruppo N-solfonato provoca bassa affinità per il recettore, probabilmente a causa della interazione ionica con la proteina canale. Frazioni N1-idrossi e 11-idrossisolfate mostrano invece scarso effetto sull'affinità per il sito recettoriale (Llewellyn, 2006; Catterall *et al*., 2007; Oshima *et al*., 2011).

Recenti studi evidenziano che STX lega anche il canale del potassio, ma piuttosto che agire attraverso un blocco, essa modifica il canale di voltaggio (*gating* canale – sensore del voltaggio - S4(+)), con apertura dello stesso, a cui consegue forte depolarizzazione transmembrana e riduzione della conduttanza del potassio in generale. Inoltre, diversamente dalla sua interazione con il canale del sodio, dove una singola molecola è coinvolta nel legame, quattro o più molecole sono in grado di interagire con i siti extracellulari (Cusick e Sayler, 2013).

Poiché i canali del sodio voltaggio-dipendenti si sono evoluti dai canali del calcio, si è rilevato che STX agisce anche sui canali del calcio voltaggio-dipendenti con una interazione simile a quella con il canale del sodio (filtro di selettività), anche se il blocco non è completo (Cusick e Sayler, 2013).

I sintomi insorgono, solitamente, nei 30 minuti successivi all'ingestione dei molluschi tossici, ma, a volte, il periodo di incubazione può prolungarsi fino a 10 ore. Si notano nausea, parestesie che interessano dapprima labbra, bocca e lingua, per poi diffondersi a tutto il capo e all'estremità degli arti, tachicardia. Seguono profonda astenia muscolare, paralisi flaccida, vertigini, perdita dell'equilibrio, atassia, dismetria, senso di soffocamento, afasia, disfonia. Mancano l'ipotensione, l'ipotermia e i sintomi gastroenterici, che sono tipici, invece, dell'avvelenamento da tetrodotossina (Bryan, 1985; Sobel e Painter, 2005). Nei casi fatali, la morte si verifica entro 2-12 h dall'ingestione dei molluschi tossici ed è determinata da paralisi respiratoria. I pazienti che superano le prime 12 h, di solito, recuperano rapidamente, senza presentare effetti secondari (Cavassi, 1991).

La DL_{50} nel topo per via i.p. è dell'ordine di 10 μg/kg p.v., che in un topo di 20 g corrispondono a 0,2 μg STX (per la precisione 0,18 μg) che viene definita unità topo (MU), mentre per via orale sono necessari 263 μg/kg p.v. per ottenere lo stesso effetto (EFSA, 2009a; Oshima *et al*., 2011). Nell'uomo invece la dose letale varia tra 0,5-4 mg per *os* (corrispondente a 2.500-20.000 MU) (Ade *et al*., 2003; Wang, 2008).

Mediamente nel mondo vengono stimati circa 1600 casi per anno di cui 300 fatali, ma in alcuni episodi la mortalità raggiunge livelli del 40%. La sensibilità a PSP dipende dall'individuo: dai dati disponibili in letteratura nei casi di intossicazione le quantità assunte variavano tra 144 μg e 1660 μg per persona, mentre nei casi letali le quantità erano tra 300 μg e 12.400 μg PSP. (Cattano e Bernardi, 2010).

La tossicità delle diverse specie di dinoflagellate dipende dalle diverse tossine STX analoghe prodotte e/o dalle regioni marine in cui albergano. Il profilo tossicologico di *A. minutum* in Nuova Zelanda dipende dalle diverse proporzioni di STX, neoSTX e gonyautossine, ma è differente da quello prodotto dalla medesima specie in altri mari (MacKenzie and Berkett, 1997).

In considerazione della mancanza di dati disponibili sulla tossicità cronica delle tossine STX gruppo, non è stata stabilita una dose giornaliera tollerabile (TDI), mentre la valutazione della tossicità acuta ha permesso di indicare una dose acuta di riferimento (ARfD). Il livello più basso a cui si osservano effetti avversi (LOAEL) è stato fissato in 1,5 μg STX equivalenti, che rappresenta la soglia in cui si manifesta sintomatologia nei soggetti sensibili. Applicando un fattore di rischio 3, è stata calcolata in 0,5 μg di STX equivalenti/kg di peso corporeo la dose a cui non si osservano effetti avversi (NOAEL), che corrisponde all'ARfD (EFSA, 2009a) (tabella 3).

Valutando che un consumatore di molluschi assume più facilmente una porzione singola di grandi dimensioni piuttosto che una media per un lungo periodo e valutando in 400 g di carne di mollusco la porzione di grandi dimensioni che viene consumata normalmente, è stato possibile effettuare una valutazione del rischio acuto nel consumatore (EFSA, 2010d). Poiché il limite previsto dalla CE nel Reg. 853/2004 è di 800 μg equivalenti STX/kg carne di mollusco, ciò comporterebbe l'assunzione di 320 μg di tossina (equivalente a 5,3 μg/ kg di peso corporeo in un adulto di 60 kg), dose notevolmente superiore alla dose acuta di riferimento di 0,5 μg equivalenti STX/kg di peso corporeo (corrispondente a 30 μg STX equivalenti per porzione per un adulto di 60 kg) (EFSA, 2009d).

Affinché un adulto di 60 kg non superi la dose acuta di riferimento di 0,5 μg di STX equivalenti/kg di peso corporeo, una porzione di 400 g di molluschi non dovrebbe contenere più di 30 μg di STX equivalenti (corrispondenti a 75 μg di STX equivalenti/ kg di frutti di mare) (tabella 3).

Le alghe responsabili della produzione di STX-tossine sono diffuse in tutto il mondo, sia nelle zone tropicali che nei mari temperati: sono interessati la costa nord-est del Canada e degli USA, il Golfo del Messico, le coste pacifiche dell'America Centrale, l'Asia, l'Australia e la Nuova Zelanda. Per quanto riguarda l'Europa, si ritrovano sulle coste atlantiche di Norvegia e Portogallo, ma anche nel Mediterraneo.

Pur essendo l'area mediterranea interessata da molti anni da fenomeni di fioriture algali, fino al 1987 non sono state segnalate alghe produttrici di tossine PSP (Fortuna *et al.,* 1985; Aulicino *et al.,* 1987; Gucci *et al.,* 1988). Nell'ottobre del 1988, tuttavia, Bruno *et al.* (1990) hanno segnalato l'isolamento nell'Adriatico di ceppi tossigeni di *A. polyedra*. Da allora si sono avute ulteriori segnalazioni di ceppi tossigeni che non sono mai stati associati ad episodi di intossicazione (Milandri *et al.*, 2008; Pistocchi *et al.*, 2012).

Malgrado ciò il monitoraggio di STX e dei suoi analoghi è costantemente necessario, considerando che si tratta di composti molto pericolosi, con eventuale potenziale militare, tanto che l'*Organisation for the Prohibition of Chemical Weapons* (OPAC) li ha classificati come intossicante chimico la cui fabbricazione, uso, trasferimento e riutilizzo sono strettamente regolati dall'OPCW (Convenzione sulle armi chimiche, 1998).

Negli ultimi anni infine si è assistito ad un rinnovato interesse negli alcaloidi marini e nei loro analoghi, comprese le tossine PSP, per quanto riguarda il loro uso come agenti terapeutici o come antidolorifici. Studi di bioattività e struttura molecolare potrebbero portare alla progettazione di analoghi innaturali con migliorate caratteristiche farmacologiche (Weise *et al.*, 2010).

STX, ad esempio, possiede anche un enorme potenziale farmaceutico per la sua capacità di indurre l'anestesia attraverso l'interazione con il sito 1 del canale del Na^+, prolungando la durata dell'anestesia se utilizzato in combinazione con altri anestetici locali. Formulazioni liposomiali di STX per il rilascio lento, inoculati a livello locale, sono stati postulati nel trattamento del dolore localizzato e nel forte dolore articolare (Barnet *et al.*, 2004; Epstein-Barash *et al.*, 2009; Chorny e Levy, 2009).

Altre tossine PSP, come GTX-2 in associazione con GTX-3 hanno anche potenziale clinico e sono state utilizzate per il trattamento non chirurgico delle ragadi anali (percentuale di successo del 98%) (Garrido *et al.*, 2007) e nel trattamento del mal di testa cronico di tipo tensivo (70% dei pazienti rispondono al trattamento) (Lattes *et al.*, 2009).

Tabella 3: LOAEL, NOAEL, limiti EU, ARfDs e concentrazioni corrispondenti nei molluschi

Tossina	LOAEL	NOAEL	Limiti CE (d)	Esposizione per consumo 400g SM secondo limiti CE	ARfD	Concentrazione max in 400g SM secondo limiti ARfD (c)	Ratio B/A (b)
STX	1,5 µg STX eq.	0,5 µg STX eq.	800 µg PSP/ kg SM	320 µg STX eq./persona (5,3 µg STX eq./kg b.w.)	0,5 µg STX eq./kg b.w (30 µg STX eq./persona)	75 µg STX eq./kg SM	0,09
OA	0,8 µg OA eq	0,3 µg OA eq	160 µg OA eq /kg SM	64 µg OA eq./persona (1 µg OA eq./kg b.w.)	0,3 µg OA eq./kg b.w. (18 µg OA eq./persona)	45 µg OA eq./kg SM	0,28
PTX	250 µg PTX2 eq	80 µg PTX2 eq	160 µg OA eq /kg SM [(a)]	64 µg PTX2 eq./persona (1 µg PTX2 eq./kg b.w.)	0,8 µg PTX2 eq./kg b.w (48µg PTX2 eq./persona)	120 µg PTX2 eq /kg SM	0.75
YTX	7,5 mg YTX eq.	5 mg YTX eq	3,75 mg YTX eq /kg SM	1,5 mg YTX eq./persona (25 µg YTX eq./kg b.w.)	25 µg YTX eq./kg b.w. (1,5 mg YTX eq./persona)	3,75 mg YTX eq /kg SM	1
AZA	120 µg AZA1 eq	30 µg AZA1 eq	160 µg AZA eq /kg SM	64 µg AZA1 eq./persona (1 µg AZA1 eq./kg b.w.)	0,2 µg AZA1 eq./kg b.w. (12 µg AZA1 eq./persona)	30 µg AZA1 eq /kg SM	0,19
DA	0,9 mg DA eq	0,3 mg DA eq	20 mg DA/ kg SM	8 mg DA/persona (130 µg DA./kg b.w.)	30 µg DA./kg b.w (1,8 mg DA/persona)	4,5 mg DA/kg SM	0,23

STX: saxitossina (PSP); **OA**: acido ocadaico (DSP); **PTX**: pectenotossine (DSP); **YTX**: yessotossine; **AZA**: aza-spiracidi; **DA**: acido domoico.
LOAEL: lowest observed adverse effect levels; **NOAEL**: no observed adverse effect levels; **ARfD**: Dose Acuta di Riferimento.
SM: shellfish meat; **eq**.: equivalenti; **b.w**.: peso corporeo; **persona**: adulto del peso di 60 kg.
(a) Il Reg. CE inserisce le pectenotossine tra le tossissine DSP, attualmente si preferisce tenerle separate.
(b) Livello di protezione espresso in B/A dove B corrisponde a (c) e A corrisponde a (d). B/A < 1 corrente limite protegge meno del 95% popolazione; B/A > 1 corrente limite protegge più del 95% della popolazione.

3. NEUROTOXIC SHELLFISH POISONING (NSP)

La *Neurotoxic Shellfish Poisoning* (NSP), o intossicazione neurotossica da molluschi, è una sindrome paralitica meno grave rispetto alla PSP, segnalata per la prima volta da Walker nel 1884 e attualmente presente prevalentemente in Florida e nel Golfo del Messico, dove risulta endemica, ripresentandosi ogni anno soprattutto nella stagione autunnale (Ellis, 1985). Tuttavia sin dal 1990 casi di NSP sono stati segnalati anche nella costa orientale degli U.S.A., in Nuova Zelanda, Asia, Sud Africa, Nord America ed Europa (Furey *et al*., 2007; Watkins, 2008).

L'agente responsabile è rappresentato da una dinoflagellata nuda, del diametro di 20-40 µm, denominata *Karenia brevis (Ptychodiscus brevis, Gymnodinium breve)* (figura 10). Essa può determinare, nell'uomo, anche una lieve forma respiratoria, caratterizzata da congiuntivite, starnuti e tosse, per inalazione di aerosol marini contenenti frammenti cellulari algali, ed estese morie nei pesci, negli uccelli acquatici e nei mammiferi marini (Pierce, 1986).

Figura 10: Karenia brevis.

Oltre *K. brevis* anche *Karenia mikimotoi* e altre specie algali, appartenenti alla classe *Raphidophyceae*, quali *Chattonella antiqua*, *Chattonella marina*, *Fibrocapsa japonica* e *Heterosigma akashiwo*, sono in grado di produrre tossine simili alle brevetossine. Queste alghe sono state rilevate anche nelle acque costiere degli Oceani Pacifico e Atlantico, nel Giappone e nelle coste olandesi (FAO, 2004).

Infine alcuni batteri, come *Rhodobacterales* (*Alphaproteobacteria*), *Cytophagales*/ *Sphingobacteriales* (*Bacteroidetes*), *Flavobacteriaceae* e cianobatteri, promuovono (soprattutto attraverso il loro ruolo nel ciclo dei nutrienti e la produzione di vitamine) o interferiscono con le fioriture algali di *K. brevis* (Doucette *et al*., 1999; Mayali e Doucette, 2002; Roth *et al*., 2008; Jones *et al*., 2010).

Karenia brevis produce tossine ad attività neurotossica che, accumulandosi nei molluschi filtratori di *plancton (Crassostrea virginica, Donax variabilis, Mercenaria* spp.), nei crostacei e nei pesci possono, per loro tramite, essere ingerite dall'uomo. I molluschi non sembrano presentare effetti dall'accumulo di brevetossine e il loro tempo di depurazione varia fra le 2-8 settimane (Ragelis, 1986; Watkins, 2008).

Le tossine neurotossiche, denominate brevetossine (PbTx o BTX), sono insapori e inodori, liposolubili, acido-stabili ed estremamente resistenti al calore (non si denaturano neppure a 300 °C) (Poli, 1988).

Esse sono propriamente dei polichetidi, metaboliti secondari molto stabili, capaci di resistere all'attacco di enzimi e di molti agenti chimici, sintetizzati attraverso la condensazione decarbossilativa a partire da acetil-CoA e che presentano funzioni ossigenate alternate ad altre prive di ossigeno, attraverso cui sono in grado di interagire efficacemente con recettori specifici (Collins, 1978; Van Dolah *et al*., 2009).

Chimicamente, vengono definite come composti polieterici ciclici metilati a 10-11 anelli fusi insieme, con una struttura a scala, e dotati, ad un'estremità (anello A), di un lattone insaturo, essenziale per la loro attività (figura 11) (Baden, 1989). Una zona formata da sei anelli (BG), chiamata "distanziatore", è leggermente flessibile, mentre gli anelli terminali (HK), legati alla catena laterale variabile, sono una struttura molto rigida e, al pari del gruppo lattone, alterazioni che riducano la rigidità di questa regione diminuiscono notevolmente la tossicità della molecola (Furey *et al*., 2007).

È questo il caso del brevenal, tossina a cui mancano gli anelli terminali e il lattone insaturo: essa mantiene la capacità di legarsi ai canali del sodio, agendo da antagonista con le altre brevetossine, ma non è più tossica, tanto da potersi impiegare nel trattamento dell'avvelenamento neurotossico da molluschi e da ciguatera (Mattei *et al*., 2008; Llewellyn, 2011).

Le brevetossine vengono suddivise, in base alla diversa struttura chimica in due gruppi: gruppo A (tipo 1: PbTx-1,7,10), costituiti da una struttura flessibile a 10 anelli polieterici fusi insieme, e gruppo B (tipo 2: PbTx-2,3,5,6,8,9), che presentano uno scheletro rigido formato da 11 anelli polieterici (Plakas *et al*., 2002, 2004, 2008; Wang *et al*., 2004; Abraham *et al*.; 2006 e 2008; Fire *et al*., 2008; Plakas e Dickey, 2010).

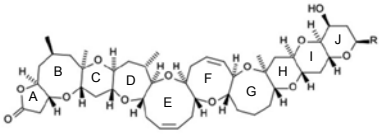
La composizione dei diversi tipi di PbTx varia a seconda della curva di crescita. PbTx-2 è dominante durante la fase logaritmica, mentre PbTx-3 e PbTx-1 sono presenti maggiormente durante la fase stazionaria. Inoltre, durante la fase logaritmica le tossine si trovano prevalentemente in posizione intracellulare, mentre nella fase stazionaria la concentrazione totale di tossine aumenta nel mezzo culturale (Van Dolah *et al*., 2009).

La diversa composizione di tossine dipende anche dal clone algale e dalla variabilità genetica, ma anche dalle condizioni ambientali, con un aumento di tossine in situazioni di limitazione di N o P, come pure la luce e la salinità sono coinvolte nella alterazione delle tossine cellulari (Van Dolah *et al*., 2009)

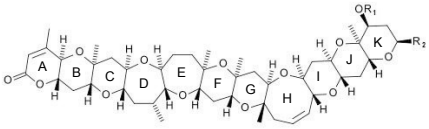
Le tossine del gruppo B sono generalmente più rappresentate in natura. Tra queste tossine

la PbTx-2 è la tossina principalmente prodotta da *K. brevis*, mentre PbTx-1 è la più potente. Entrambe sono ritenute le progenitrici di tutte le altre tossine del gruppo-PbTx (Baden *et al.*, 2005; Wang, 2008).

Nei molluschi e nei pesci contaminati le brevetossine vengono trasformate in numerosi metaboliti, con attività tossica analoga (PbTx-gruppo) e sono questi composti la causa dell'intossicazione nell'uomo (Plakas *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2004; Abraham *et al.*; 2006).



STRUTTURA TIPO A (1)	
PbTx-1	R = $CH_2C(=CH_2)CHO$
PbTx-7	R = $CH_2C(=CH_2)CH_2OH$
PbTx-10	R = $CH_2CH(-CH_3)CH_2OH$



STRUTTURA TIPO B (2)		
PbTx-2	R_1 = H	R_2 = $CH_2C(=CH_2)CHO$
PbTx-3	R_1 = H	R_2 = $CH_2C(=CH_2)CH_2OH$
PbTx-5	R_1 = CH_2COCH_3	R_2 = $CH_2C(=CH_2)CHO$
PbTx-6	R_1 = H	R_2 = $CH_2C(=CH_2)CHO$ 27, 28 eposside
PbTx-8	R_1 = H	R_2 = CH_2COCH_2Cl
PbTx-9	R_1 = H	R_2 = $CH_2CH(-CH_3)CH_2OH$

Figura 11: Struttura chimica delle brevetossine (modificata da Dickey et al.*, 2011)*

Il loro sito d'azione è localizzato a livello delle membrane eccitabili, dove interagiscono con uno specifico recettore (sito 5 della α-subunità) proprio dei canali del sodio voltaggio-dipendenti (figura 9) (Catterall e Gainer, 1985; Stevens *et al.*, 2011). In seguito a ciò quest'ultimi vengono aperti, con conseguente intensificazione del flusso di ioni sodio verso l'interno della cellula (Wu *et al.,* 1985, Furey *et al.*, 2007; Llewellyn, 2009).

Questo comporta, a livello dei muscoli scheletrici, il manifestarsi inizialmente di fasciculazioni, spasmi, contrazioni e, successivamente, di paralisi spastica, per annullamento dei potenziali di membrana e blocco neuromuscolare (Baden *et al.,* 1984b; Gallaoher e Shinnick-Gallaoher, 1985).

A livello neuronale, d'altra parte, l'apertura dei canali del sodio determina il rilascio di neurotrasmettitori, sia nel SNC (γ-aminobutirrato, aspartato, glutammato), sia in quello periferico (acetilcolina, adrenalina, noradrenalina), con evidenti effetti sugli apparati cardiovascolare e respiratorio, nonché massiccia degranulazione dei mastociti (Baden, 1989; Richards *et al.,* 1990; Hildebrand *et al.,* 2011).

L'azione tossica delle PbTx si completa attraverso il rallentamento del normale processo di inattivazione dei canali del sodio, con conseguente avvio persistente dei potenziali d'azione, liberazione continua di neurotrasmettitori e scariche elettriche ripetute (Chateau-Degat, 2003; Meunier *et al.*; 2009).

Sembra infine che le PbTx si leghino anche alla pompa Ca^{2+}-Na^{+}, con aumento dell'afflusso di calcio nel citosol cellulare (Wang, 2008; Meunier *et al.*, 2009).

Rotture del DNA e aberrazioni cromosomiche sono state rilevate in cellule incubate *in vitro* con PbTx-2 (Munday e Reeve, 2013).

Le PbTx, dopo il consumo di molluschi tossici, sono rapidamente assorbite con distribuzione in tutto il corpo (compreso il SNC), metabolizzate nel fegato ed escrete sia nelle urine

che nella bile (Guo *et al*., 2010). Nel siero hanno un'emivita brevissima (inferiore a un minuto), ma la *clearance* corporea totale sembra essere molto più prolungata (fino a 6 giorni) (Dickey *et al*., 2011).

I sintomi compaiono da 30 minuti a 3 ore dall'ingestione dei molluschi tossici e sono essenzialmente neurotossici: parestesie delle labbra, del viso e delle estremità, inversione della sensibilità termo-dolorifica (termodisestesia), perdita dell'equilibrio, crampi, convulsioni, atassia, paralisi spastica, convulsioni e coma. Sono presenti anche disturbi gastroenterici (nausea, vomito, diarrea) e cardiocircolatori (tachicardia e ipotensione) (Johnson *et al.,* 1985; Bryan, 1985). Nonostante ciò non è mai stato denunciato alcun esito fatale e il recupero avviene in 2-3 giorni (Borison *et al.,* 1985).

Durante le fioriture di *K. brevis* si possono verificare anche dermatiti per contatto diretto ed effetti di tipo respiratorio, dovuti all'inalazione di *aerosol* di acqua marina contenente cellule e loro frammenti di PbTx disciolte. Si possono determinare forti irritazioni della congiuntiva e delle mucose nasali, essudati catarrali abbondanti, tosse secca, rinorrea, broncocostrizione (Pierce e Henry, 2008). Alla base della sintomatologia respiratoria vi è la liberazione neuronale di acetilcolina e la conseguente contrazione della muscolatura liscia delle vie aeree superiori. I sintomi sono comunque solo temporanei, anche se i soggetti asmatici sembrano particolarmente sensibili (Fleming, 2007).

In aggiunta agli effetti sull'uomo, le maree rosse da *K. brevis* provocano estese mortalità in pesci, uccelli e animali marini. I pesci, oltre che per azione diretta delle alghe sulle branchie e per deplezione dell'ossigeno dell'acqua, accumulano tossine anche attraverso l'alimentazione e l'assorbimento branchiale, mentre gli animali marini risultano esposti soprattutto attraverso il cibo e per inalazione di *aerosol* contaminati (Tester *et al*., 2000; Flewelling *et al*., 2005; Pierce e Henry, 2008; Watkins *et al*., 2008; Gannon *et al*., 2009).

In Europa non sono stati riportati casi di intossicazione per consumo di molluschi o pesci contenenti brevetossine e non sono stati fissati nei prodotti della pesca limiti di legge. Negli U.S.A. il limite è fissato a 20 unità topo/100g (4 μg PbTx-2 equivalenti) (FDA U.S.A.).

Nel topo la DL_{50} per via i.p. è di 100, 200 e 170 μg/kg p.v. per PbTx-1, PbTx-2 e PbTx-3 rispettivamente, mentre la LD_{50} per via orale è nell'ordine dei 520 μg/kg per PbTx-3 e 6600 μg/kg per PbTx-2 (FAO/IOC/OMS, 2004). La dose pericolosa per l'uomo si ritiene variabile fra 42-72 unità topo corrispondente a 168-288 μg PbTx-2 ovvero a 2,8-4,8 μg/kg p.v. per una persona di 60 kg (Watkins *et al*., 2008; EFSA, 2010c; Dickey *et al.;* 2011), mentre per PbTx-3 è stimata in 2-3 μg/kg p.v. (FAO/IOC/OMS, 2004).

Poiché i dati tossicologici disponibili riguardano solamente la tossicità acuta e anche quelli sono limitati, mentre non esistono parametri per valutare la tossicità cronica, gli esperti EFSA, pur auspicandola, non hanno fissato una dose acuta di riferimento (ARfD).

Studi sull'esposizione a lungo termine di brevetossine per ingestione o per aerosolizzazione hanno evidenziato lo sviluppo di una grave rinite catarrale, edema ed emorragie polmonari, anemia emolitica cronica, neurotossicità soprattutto cerebellare e soppressione immunitaria (Walsh *et al*., 2008; Dickey *et al*., 2011).

Preoccupante risulta soprattutto la formazione da parte di PbTx-2 di addotti con il DNA e la rilevazione di attività clastogenica (aberrazioni cromosomiche e mutazioni del DNA) e ciò solleva preoccupazione circa la sua potenziale cancerogenicità e sui danni genetici conseguenti all'esposizione a lungo termine a tossine del gruppo PbTx (Fleming *et al*., 2005; Sayer *et al*., 2006; Pierce e Henry, 2008; Radwan e Ramsdell, 2008; Murrell e Gibson, 2009; Leighfield *et al*., 2009; EFSA, 2010c; Dickey *et al*., 2011).

4. DIARRHETIC SHELLFISH POISONING (DSP)

La *Diarrhetic Shellfish Poisoning* (DSP), o intossicazione diarroica da molluschi, è una sindrome non mortale, caratterizzata da disturbi gastroenterici (nausea, vomito, diarrea e dolori addominali) (figura 12), la cui natura tossico-algale è stata identificata alla fine degli anni '70 in Giappone, da Yasumoto *e Coll*. (Yasumoto *et. al*., 1984). É considerata l'intossicazione algale più diffusa nel mondo e, a partire dal 1989, la presenza delle alghe responsabili è stata ripetutamente segnalata in Italia, lungo le coste del Mar Adriatico (Viviani *et. al.,* 1991; Ammazzalorso *et. al.,* 1991; Pistocchi *et al*., 2012; Holmes *et al*., 2014).

Figura 12: Sintomi di intossicazione diarroica da molluschi.

Sono in causa dinoflagellati appartenenti ai generi *Dinophysis* (*D. fortii, D. acuminata, D. acuta, D. sacculus, D. norvegica, D. tripos*), *Phalacroma* (*P. mitra, P. rotundatum*) e *Prorocentrum* (*P. lima, P. minimum, P. micans, P. concavum, P. redfieldi, P. arenarium, P. belizeanum*), i quali si sviluppano maggiormente nel periodo estivo, sintetizzando le tossine durante le ore di luce e prevalentemente nelle fasi S e G2 del ciclo cellulare (figura 13) (Dickey *et al*., 1990; Volterra *et al.,* 1990; FAO, 2004; Gerssen *et al*., 2010; van Egmond, 2011).

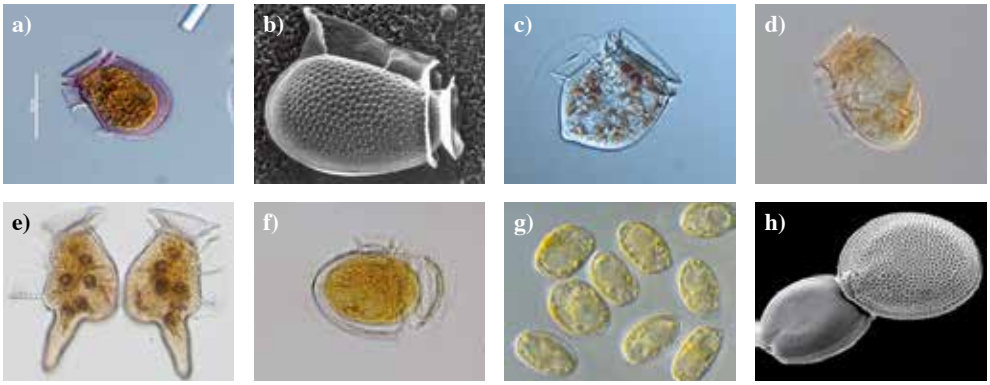


Figura 13: Alghe produttrici acido ocadaico e dinofisitossine: (a) (b) Dinophysis fortii*; (c)* D. acuta*; (d)* D. acuminata*; (e)* D. caudata*; (f)* D. rotundata*; (g) (h)* Prorocentrum lima. *Dimensioni alghe: larghezza 30-60 µm; lunghezza 22-105 µm.*

L'intossicazione umana avviene attraverso il consumo di molluschi bivalvi accumulatori di tossine e non è associata ad episodi di mortalità di pesci o di mammiferi marini. Inoltre, poiché appaiono necessarie solo poche centinaia di cellule algali per litro d'acqua per rendere tossici i molluschi, la contaminazione di questi ultimi risulta non necessariamente correlata a fenomeni macroscopici di fioritura delle alghe tossiche (maree colorate) (Mengarelli *et al.,* 1991).

In aggiunta a ciò, è bene ricordare che non tutte le specie di bivalvi viventi nel medesimo *habitat* manifestano un'uguale attitudine funzionale all'assorbimento e alla concentrazione di tossine DSP nei propri tessuti. In particolare, i molluschi che rappresentano i maggiori accumulatori di tossine sono i mitili (*Mytilus galloprovincialis*), le cappesante (*Pecten jacobeus*) e le vongole veraci, mentre si riscontra una costante negatività alle prove biotossicologiche nelle vongole (*Venus gallina*) (figura 14) (Cavessi, 1991).

La depurazione dei molluschi contaminati richiede da 1 settimana a 6 mesi (FAO, 2004).

Dinophysis spp. e *Prorocentrum* spp. producono almeno 10 tipi di tossine liposolubili e termostabili (McCarron *et al*., 2007), distinte, in base alle caratteristiche chimiche, ai meccanismi d'azione ed agli effetti tossicologici, in tre gruppi:

- acido ocadaico (OA) e dinofisitossine (DTXs) (figura 15): composti polieteri acidi che agiscono a livello della muscolatura liscia dell'apparato gastroenterico (Terao *et al.,* 1986).
- pectenotossine (PTXs) (figura 17): lattoni polieteri neutri che determinano lesioni epatiche (Terao *et al.,* 1986; Ragelis, 1988).
- yessotossine (YTXs) (figura 19 e 20): polieteri solfati ad 11 anelli con una catena laterale insatura e due esteri solfato. Isolate per la prima volta nel 1987 a partire da *Patinopecten yessoensis,* con struttura assai simile alle brevetossine e alla ciguatossina, che agiscono a livello del muscolo cardiaco, provocando disturbi cardiovascolari (Terao *et al.,* 1990; Viviani, 1991).

*Figura 14: Molluschi che rappresentano i maggiori accumulatori di tossine: mitili (*Mytilus galloprovincialis*), cappesante (*Pecten jacobeus*) e vongole (*Tapes philippinarum*).*

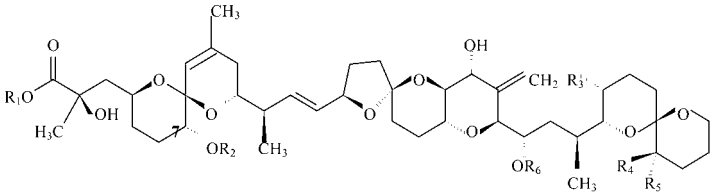
La sintomatologia gastroenterica da OA e DTXs compare tra 30 minuti ad alcune ore dal consumo dei molluschi e consiste in nausea, diarrea, vomito e dolori addominali e perdura al massimo quattro giorni. Non necessita di trattamento e non è mai mortale (Cattaneo, 2010).

OA, DTX-1 e DTX-2 rappresentano i progenitori di tutte le altre dinofisitossine e sono prodotte dai dinoflagellati. Ciascuno di essi può essere esterificato nella posizione 7-idrossi

fornendo una vasta gamma di derivati "acilati", conosciuti collettivamente come DTX-3, derivati metabolici che si ritrovano a livello della ghiandola digestiva del mollusco. I derivati acilati mostrano un aumento della liposolubilità rispetto alle tossine madri e possiedono attività tossica in seguito all'idrolisi operata nel tratto gastrointestinale (Tubaro *et al*., 2008a; Vale, 2007; EFSA, 2008a).

OA è altamente tossico per i topi dopo somministrazione per via i.p. con valori di DL_{50} variabili tra 192 e 225 μg/kg. DTX-1 è leggermente più potente di OA (160 μg/kg), DTX-2 presenta circa il 50% di attività rispetto a OA, mentre tutti gli altri derivati DTXs risultano meno tossici con valori di DL_{50} compresi tra 352 e 600 μg/kg (Munday, 2013).

OA è significativamente meno tossico se somministrato per via orale e la DL_{50} varia fra 400 e 880 μg/kg (Munday, 2013), anche se Tubaro *et al*. (2008b) non hanno osservato alcun decesso anche a dosaggi di 1000 μg/kg.



	R_1	R_2	R_3	R_4	R_5	R_6
OA	H	H	CH_3	H	H	H
DTX-1	H	H	CH_3	CH_3	H	H
DTX-2	H	H	H	H	CH_3	H
DTX-3	H	acile	H/ CH_3	H/ CH_3	H/ CH_3	H
Diol-estere	diolo	H/acile	H/ CH_3	H/ CH_3	H/ CH_3	H
DTX-4	Diol-estere	H	H/ CH_3	H/ CH_3	H/ CH_3	H
DTX-5	Diol-estere	H	H/ CH_3	H/ CH_3	H/ CH_3	H
27-O-acile	H	H	CH_3	H	H	Acile

Figura 15: Struttura chimica di acido ocadaico e dinofisitossine (Larsen et al.*, 2007; van Egmond, 2011).*

A seguito di iniezione intraperitoneale di OA e DTX-1 nei topi sono state osservate alterazioni a livello soprattutto dell'intestino tenue: erosione e degenerazione dell'epitelio dei villi del duodeno e del tratto prossimale del digiuno, desquamazione epiteliale, pronunciato edema della lamina propria e accumulo di fluido nel lume intestinale. L'effetto distruttivo sull'epitelio intestinale si realizza anche con la somministrazione delle altre tossine acide (OA e DTX-3) (van Egmond, 2011).

OA e DTXs essendo liposolubili attraversano la membrana cellulare e agiscono mediante un blocco enzimatico operato nei riguardi della fosfoproteine serina/treonina fosfatasi PP1 e PP2A, particolarmente PP2A, ma anche altri tipi di proteine fosfatasi, incluse PP4, PP5 e PP2B, risultano coinvolte, con conseguente inibizione della loro attività e incremento di proteine fosforilate ad opera della chinasi di tipo C (figura 16) (Haystead *et al*., 1989; Wekell, 1990; Louzao *et al*., 2005).

La fosforilazione e defosforilazione di proteine rappresenta uno dei principali processi regolatori nelle cellule eucariote ed è implicato nell'attività metabolica, nel trasporto di membrana, nella secrezione, nella contrattilità e nella divisione cellulare. Si riteneva pertanto che la diarrea nell'uomo fosse causata da un'iperfosforilazione delle proteine che controllano la secrezione del sodio dalle cellule intestinali, con conseguente alterazione di svariati processi metabolici, regolatori dell'omeostasi cellulare, quali aumento della perdita di sodio dalle cellule della mucosa intestinale, influsso di ioni calcio e sintesi di PGE2, a cui consegue la perdita passiva di fluidi cellulari (Weinstein, 1983; Volterra *et al.,* 1990; Valdiglesias *et al.*, 2011c; Cruz *et al.*, 2013).

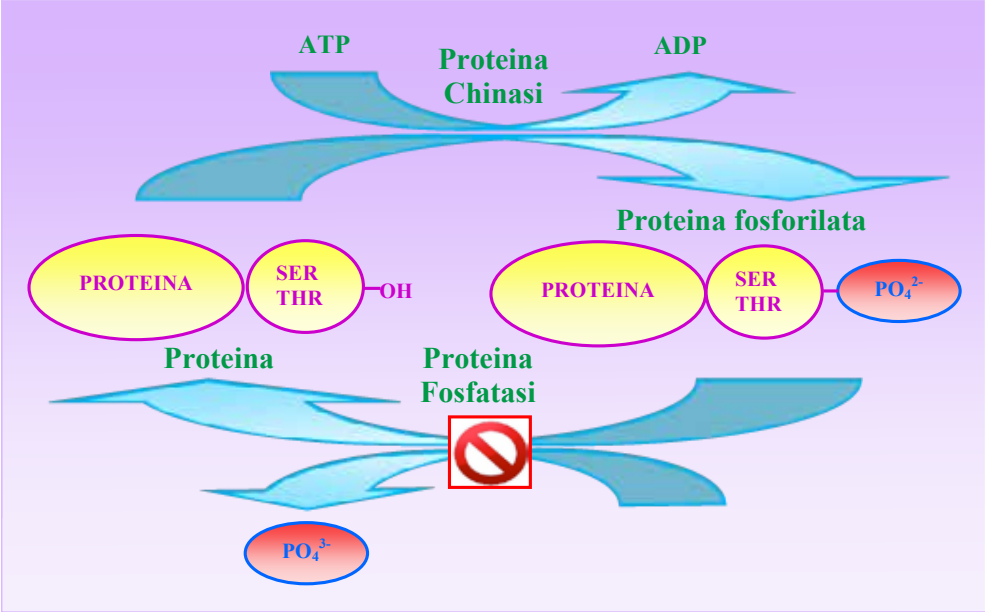


Figura 16: Meccanismo di proteina chinasi e proteine fosfatasi (ATP: adenosina trifosfato; ADP: adenina trifosfato; PO_4^{2-}: fosfato; PO_4^{3-}: fosfato inorganico).

Studi successivi hanno mostrato che OA non stimola direttamente la secrezione intestinale, ma provoca un aumento della fosforilazione delle proteine giunzionali o del citoscheletro. In tal modo distrugge la barriera cellulare intestinale e aumenta la permeabilità paracellulare delle cellule epiteliali intestinali e questa alterazione viene indicata come la causa più probabile di diarrea negli animali e nell'uomo che hanno ingerito la tossina (Tripuraneni *et al.*, 1997).

Poiché E-caderina è la proteina responsabile dell'adesione tra cellule epiteliali, la distruzione del *pool* di cellule di E-caderina indotta da OA sulle cellule epiteliali intestinali è probabilmente associato con l'aumento paracellulare della permeabilità dell'epitelio intestinale (Ronzitti *et al.*, 2007; Vale e Botana, 2008; van Egmond, 2011).

Attualmente, si ritiene pertanto che il meccanismo con cui OA e DTXs inducono diarrea sia dovuto ad accumulo di fluido nella sottomucosa della parete cellulare, che poi attraversa la barriera epiteliale intestinale seguendo il percorso paracellulare (EFSA, 2008a).

Sono stati proposti anche percorsi alternativi per spiegare l'aumento della permeabilità cellulare. Wang *et al.* (2012) hanno evidenziato che diverse proteine (coinvolte nel metabolismo macromolecolare, nella riorganizzazione del citoscheletro, nella trasduzione di segnali, nel

trasporto molecolare e nello *stress* ossidativo), oltre alle proteine fosfatasi, vengono modificate dopo somministrazione di OA.

OA induce anche il rilascio di TNF-α (Fattore di Necrosi Tumorale), una citochina coinvolta nell'infiammazione che aumenta la permeabilità paracellulare, genera inoltre ossigeno attivo e composti altamente ossidanti che causano di *stress* ossidativo, a sua volta implicato nell'aumento della permeabilità paracellulare, e determina la formazione di microtrombi nelle venule della sottomucosa seguiti da edemi della sottomucosa (Munday, 2013).

Poiché erosione ed ulcerazioni interessano l'epitelio dei villi intestinali, mentre le cripte risultano risparmiate, e poiché la secrezione di fluido si verifica nelle cripte mentre l'assorbimento avviene sulle punte dei villi, è stato ipotizzato che la diarrea potrebbe semplicemente derivare dal danno ultrastrutturale indotto da OA sull'intestino, come si verifica nel caso di somministrazione di olio di ricino e fenolftaleina, purganti irritanti impiegati in medicina umana che non sono noti per inibire le proteine fosfatasi (Terao *et al*., 1986; Turner, 2006)

Comunque, l'eccesso di proteine fosforilate provocherebbe un'alterazione dell'accrescimento a della differenziazione cellulare e, per questo motivo, l'acido ocadaico e le dinofisitossine vengono considerati dei promotori tumorali (*tumor promoter*) della pelle e dell'apparato digerente (stomaco) (Sakai *et al*., 1989; Bruno *et al*., 1991a; Rossini, 2000; Fujiki e Saganuma.; 2009).

Nella promozione tumorale risulta di fondamentale importanza anche la capacità di OA di produrre irritazione e infiammazione attraverso l'aumentata espressione del gene TNF-α, con rilascio indotto della citochina TNF-α. Secondo alcuni Autori questo sarebbe il meccanismo fondamentale dell'azione di OA come promotore tumorale piuttosto che la sua capacità di inibire le proteine fosfatasi (Kuraishy *et al*., 2011).

OA è anche in grado di indurre apoptosi (Souid-Mensi *et al*., 2008; Valdiglesias *et al*., 2011b). I meccanismi coinvolti in questo processo comprendono alterazioni nell'espressione di geni specifici, diminuzione del potenziale di membrana mitocondriale, attivazione di più isoforme caspasi, rilascio del citocromo C dallo spazio intermembrana mitocondriale al citosol, inibizione della sintesi proteica e distruzione del citoscheletro (Leira *et al*., 2001; Rossini *et al*., 2001; Cabado *et al*., 2004; Lago *et al*., 2005; Ao *et al*., 2008). Anche in questo caso, non tutti questi meccanismi molecolari sono legati all'inibizione delle fosfatasi (Munday, 2013).

Inoltre, alcuni studi hanno evidenziato anche un'attività genotossica (aneugenica e clastogenica) dell'OA, con danni al materiale genetico della cellula, inclusi formazione di micronuclei, danno ossidativo al DNA, scambi tra cromatidi fratelli, formazione di addotti, mutazioni e rotture del DNA (Ade, 2003; Carvalho *et al*., 2006; Le Heragat *et al*., 2006; Valdiglesias *et al*., 2011a, 2011d e 2013; Gonzales-Romero *et al*., 2012a e 2012b; Prego-Faraldo *et al*., 2013).

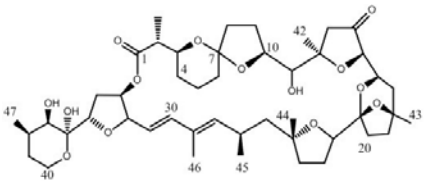
Il potenziale genotossico OA non è limitato alla sola induzione diretta di danni al materiale genetico, ma sembra dipendere anche dalla alterazione dei processi di riparazione cellulare causati da altri composti genotossici (Valdiglesias *et al*., 2010).

Da ultimo si segnala che l'iniezione intracerebrale in ratti di OA ha evidenziato perdita della memoria e degenerazione neuronale, nonché iperfosforilazione della proteina tau, formazione di agglomerati neurofibrillari all'interno dei neuroni e deposito di sostanza ß-amiloide, danni che si rinvengono anche nella malattia di Alzheimer (Blennow *et al*., 2006). L'iperfosforilazione della proteina tau all'interno dei neuroni durante lo sviluppo della malattia di Alzheimer sembra causato dall'aumento dell'attività di chinasi e/o dall'inibizione delle fosfatasi, particolarmente PP2A (Liu *et al*., 2005¸Gong *et al*., 2006; Martin *et al*., 2013; Medina *et al*. 2013; Kamat *et al*., 2013), anche se altri Autori non hanno evidenziato questo effetto e ritengono che i cambiamenti osservati possano riflettere semplicemente una risposta cellulare ad un danno (*stress* ossidativo e rilascio di TNF-α) neuronale (Zhang e Simpkins, 2010; Kamat *et al*., 2013).

Le pectenotossine (PTXs) (figura 17) sono delle tossine marine la cui origine è attribuita a *Dinophysis* spp. e nelle quali la PTX-2, la più tossica, è ritenuta il precursore delle altre che da lei derivano attraverso processi di biotrasformazione ad opera dei bivalvi.

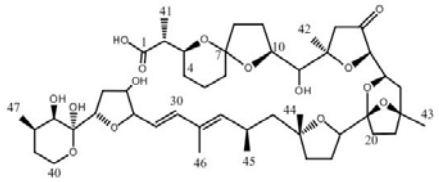
Isolate per la prima volta da *Patinopecten yessoensis* in Giappone, sono state identificate anche in alghe e molluschi bivalvi di Australia, Mar Mediterraneo, Norvegia e Nuova Zelanda (Yashumoto *et al*.; 2011).

Analoghi	Sostituenti	C_7	Alghe	SF
PTX-1	$C_{43} = CH_2OH$	R	-	+
PTX-2	$C_{43} = CH_3$; C_{32}-C_{34} = H	R	+	+
PTX-3	$C_{43} = CHO$	R	-	+
PTX-4	$C_{43} = CH_2OH$	S	-	+
PTX-6	$C_{43} = COOH$	R	-	+
PTX-7	$C_{43} = COOH$	S	-	+
PTX-11	$C_{43}= CH_3$; C_{32}= H; C_{34}= OH	R	+	+
PTX-13	$C_{43}= CH_3$; C_{32}= OH; C_{34}= H	R	+	+



Tossine PTX macrolide

Analoghi	Sostituenti	C_7	Alghe	SF
PTX-2 SA	$C_{43} = CH_3$	R	+	+
7epi-PTX-2 SA	$C_{43} = COOH$	S	+	+



Tossine PTX seco acid

Figura 17. Struttura chimica di pectenotossine (Miles, 2007).

La tossicità acuta nel topo dopo somministrazione per via i.p. è variabile tra 219-411 μg/kg per PTX-1, 2, 3, 11 e 500-770 μg/kg per PTX-4, 6, mentre nel caso di PTX-7 e seco acidi il dosaggio è > a 5000 μg/kg. Inoltre se somministrate per via orale sono notevolmente meno tossiche e il dosaggio nel topo per PTX-2 è > a 5000 μg/kg (FAO/IOC/OMS, 2004).

In generale, gli epimeri C7-S (PTX-4 e PTX-7) sono significativamente meno tossici dei corrispondenti C7-R (PTX-1 e PTX-6), come pure scarsamente tossici risultano i composti seco acidi, suggerendo che l'anello lattone intatto è essenziale per la bioattività delle tossine (Miles, 2007; Butler *et al*., 2012).

Le PTXs non producono diarrea e la sintomatologia gastroenterica che viene evidenziata è probabilmente dovuta alle tossine appartenenti al gruppo dell'acido ocadaico che sempre le accompagnano (EFSA, 2009b).

Poiché le tossine PTX presentano struttura chimica e proprietà tossicologiche diverse da OA e DTX, una loro riclassificazione è stata suggerita da FAO/IOC/OMS. Pertanto le tossine PTX vengono attualmente inserite in un gruppo distinto, separato dalle tossine DSP (FAO/IOC/OMS, 2004).

L'organo bersaglio sembra essere il fegato e infatti la somministrazione per via intraperitoneale nei topi ha evidenziato un danno degli epatociti localizzati a livello periportale che presentano necrosi e vacuoli multipli non contenenti lipidi. In cellule epatiche *in vitro*, la PTX-1 induce una diminuzione del numero e una perdita dell'arrangiamento radiale dei microtubuli, mentre quelli rimanenti assumono un aspetto contorto. Il danno epatico è comunque reversibile (Yasumoto *et al*., 2011).

Le alterazioni morfologiche presenti in alcuni organi di topi (Terao *et al*., 1986) e in epatociti isolati (Ares *et al*, 2005 e 2007; Espina *et al*., 2008) dopo esposizione a PTX-1 indicano

che le tossine PTX potrebbero influenzare il citoscheletro cellulare e particolarmente l'F-actina, principale componente proteico del citoscheletro, interferendo con la sua polimerizzazione (Alligham *et al*., 2007; Butler *et al*., 2012).

Le tossine del gruppo PTX causano anche l'arresto del ciclo cellulare, morte cellulare e apoptosi (Cañete e Diogene, 2008).

PTX-2 induce apoptosi in diverse linee cellulari mediante meccanismi multipli, che coinvolgono la perturbazione del ciclo cellulare, il sistema NF-kB, le isoforme JNK e ERK della proteina chinasi e le proteine della famiglia Bcl-2, così come le proteasi caspasi (Chae *et al*., 2005 e 2008; Kim *et al*., 2008a, b; Moon *et al*., 2008; Shin *et al*., 2008). Anche se più eventi molecolari vengono attivati nelle cellule esposte a PTX-2, dati sperimentali confermano che sono a valle delle alterazioni indotte sul citoscheletro cellulare e che l'apoptosi è quindi successiva al danno derivante dalla depolarizzazione della F-actina (Chae *et al*., 2005 e 2008).

La capacità delle PTX di inibire la polimerizzazione dell'actina e di produrre perturbazione del ciclo cellulare viene attualmente valutata per la sua applicazione alla terapia anticancro, come possibile inibizione del processo di crescita incontrollata, disseminazione e metastasi dei tumori maligni (Kim *et al*., 2011).

Infine, due dinoflagellate, *Protoceratium reticulatum* (*Gonyaulax grindleyi*) e *Lingulodinium polyedrum* sono implicate nella produzione di yessotossine (YTXs). *P. reticulatum* produce prevalentemente YTX (in alcuni casi, particolarmente nel Mar Adriatico, predomina la-homoYTX), al contrario nelle fioriture di *L. polyedrum* si rileva soprattutto 1a-homoYTX (Speijers *et al*., 2011). Inoltre *L. polyedrum* produce una bassissima quantità di tossine rispetto a *P. reticulatum* (Hess e Aasen, 2007; Paz *et al*., 2008) (figura 18).

Alle due specie algali è stata recentemente aggiunta anche un'altra dinoflagellata, *Gonyaulax spinifera* (Rhodes *et al*., 2006) (figura 18).

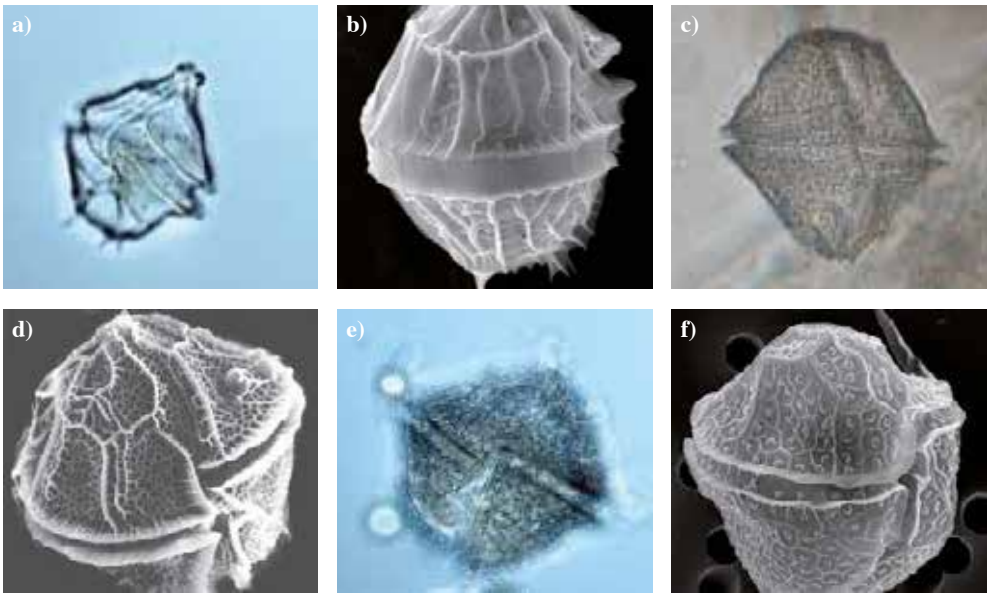


Figura 18: Alghe implicate nella produzione di yessotossine. (a) (b) Protoceratium reticulatum *(35x30 µm), (c) (d)* Lingulodinium polyedrum *(45x40 µm), (e) (f)* Gonyaulax spinifera *(35x35 µm).*

YTX è un polietere disolfato, con una caratteristica forma a scala, formato da 11 anelli adiacenti di diverse dimensioni e una catena insatura aciclico terminale laterale costituita da 9 atomi di carbonio e 2 eteri solfati. Essendo la struttura di base lipofila, ma i gruppi solfato e il gruppo solfo-etere polari, la molecola è anfifilica e amfoterica (Paz *et al*., 2008; Dell'Ovo, 2009).

Sono noti più di 100 derivati YTXs (figure 18 e 19) con peso molecolare compreso fra 955 e 1551 amu, ma solo poche decine sono stati completamente identificati e, fra questi, i più importanti sono, 1a-homoYTX, 45-idrossiYTX, e 45-idrossi-1a-homoYTX (Miles *et al*., 2005a).

I principali vettori sono cappesante e cozze che accumulano le tossine prevalentemente nell'epatopancreas. Anche basse concentrazioni algali (10^3 cells/L) sono sufficienti a produrre accumulo di importanti quantità di tossine (Paz *et al*., 2008).

Analogamente ad altre tossine marine, alcune YTXs (YTX, 1a-homoYTX e piccole quantità di 45-OH-YTX, 45-OH-homoYTX, carbossi-YTX e carbossi-homoYTX) sono direttamente prodotte dai dinoflagellati, soprattutto *P. reticulatum*, mentre un gran numero di tossine derivano da processi metabolici operati dai molluschi, come idrossilazione, carbossilazione, desulfatazione, metilazione, ossidazione, amidazione, variazioni di lunghezza della catena laterale o assenza dell'anello A (figura 19). Recentemente è stata descritta una nuova classe di derivati che presentano 1, 2, 3 arabinofuranosio unito al C32 (figura 20) (Paz *et al*., 2008).

Tutte le YTXs sembrano essere stabili al calore nei molluschi a temperature rilevanti di cottura (Alfonso *et al*., 2007). Isolate in Australia, Canada, Europa (Norvegia, Italia, Spagna e Scozia), Giappone, Nuova Zelanda e Cile, vengono molto spesso rilevate anche dai mitili dell'Adriatico, anche se non si conoscono casi di intossicazione umana attribuita a queste tossine (Howard *et al*., 2009). Ciò nonostante rappresentano un potenziale problema in quanto un gran numero di analoghi si ritrovano nelle alghe e nei molluschi contaminati, dove persistono per almeno 2 mesi (Speijers *et al*., 2011).

Dalla somministrazione ad animali di laboratorio è risultato che le YTXs hanno come organo bersaglio il miocardio. In effetti esse non provocano diarrea e sono estremamente tossiche se somministrate per via intraperitoneale, molto meno per via orale (Tubaro *et al*., 2003).

Per questi motivi le YTXs vengono attualmente considerate separatamente da acido ocadaico e dalle altre tossine DSP responsabili di sindromi diarroiche, anche se spesso si ritrovano simultaneamente presenti, senza che sia stato comunque rilevato effetto additivo o sinergico (FAO/IOC/OMS, 2004; Aasen *et al*., 2011; Sosa *et al*., 2013).

YTX desulfatata rappresenta un'eccezione in quanto non dà lesioni cardiache, ma colpisce fegato e pancreas determinando steatosi epatica con accumulo nel fegato di alte concentrazioni di trigliceridi.

Per le altre YTX comunque, sia che vengano somministrate per via i.p. che per *os*, si evidenziano cambiamenti ultrastrutturali nel cuore rappresentati da arrotondamento e gonfiore dei miocardiociti adiacenti ai capillari e sporgenze nel lume capillare, alterazioni mitocondriali e miofibrillari. Le modificazioni cardiache sono dose-dipendenti e si rilevano a seguito di somministrazione acuta (1-10 mg YTX/kg) o per somministrazione prolungata (1-2 mg/kg/die per 7 giorni), mentre alterazioni non si rilevano a dosaggi più bassi (0,5 mg/kg). Necrosi dei cardiomiociti viene riscontrata dopo la somministrazione prolungata di YTX. Inoltre tali modifiche potrebbero avvenire anche dopo cessazione del trattamento, in quanto il tessuto cardiaco non si rigenera facilmente. Comunque, il danno al tessuto cardiaco sembra essere solo temporaneo in quanto dopo 90 giorni dal trattamento (1 mg/kg/die per 7 giorni) il recupero risulta completo e non si evidenziano lesioni negli animali trattati (Tubaro *et al*., 2008a; Dell'Ovo, 2008; Dell'Ovo *et al*.; 2010).

Sono stati segnalati anche lesioni nell'intestino (duodeno), nel timo e in alcune zone della corteccia cerebrale (cellule di Purkinje del cervelletto), legate alle alterazioni del citoscheletro cellulare (Franchini *et al*., 2010; Condiner, 2012).

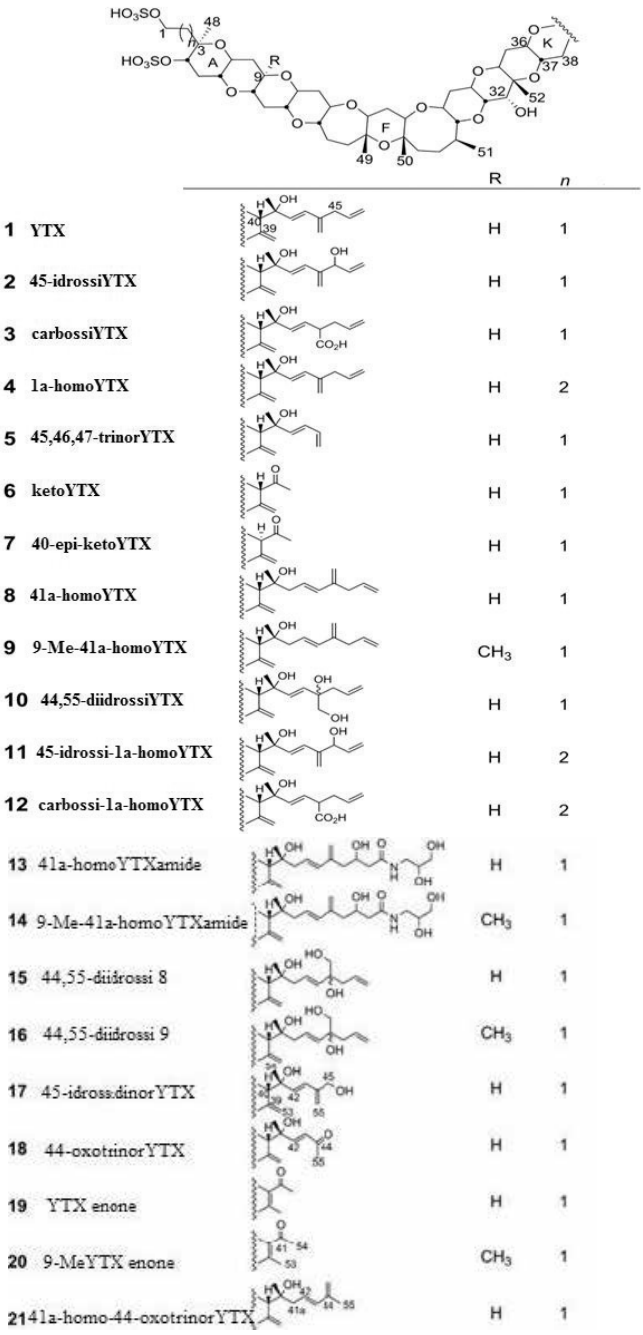


Figura 19: Struttura chimica di alcune YTXs con gli anelli A K intatti (da Hess e Aasen, 2007; Speijers et al.*, 2011).*

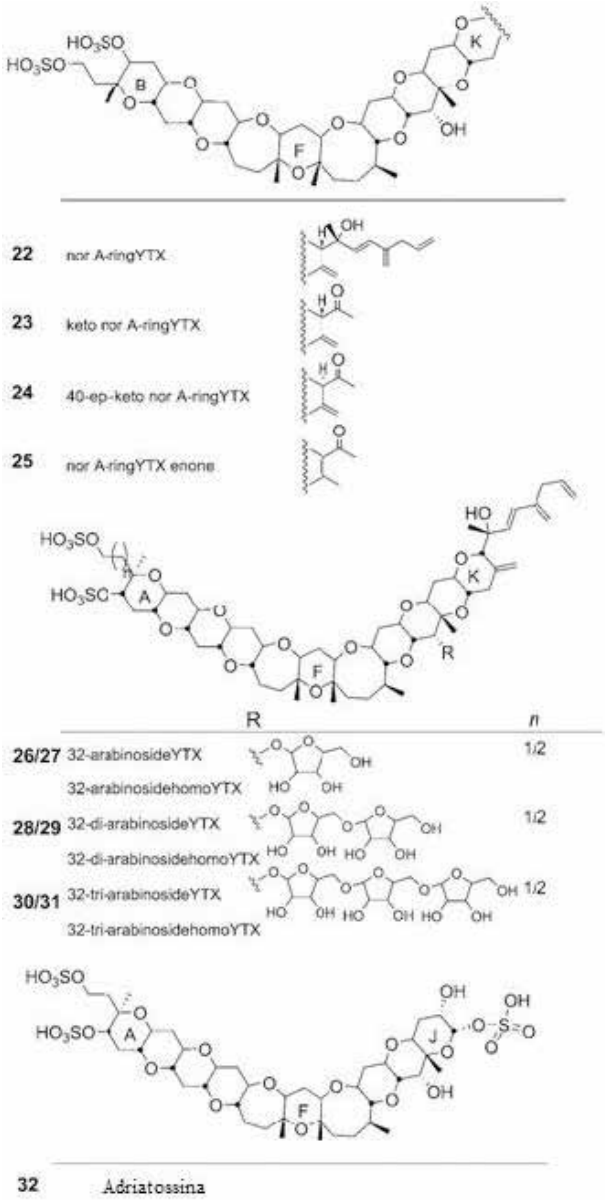


Figura 20: Struttura analoghi e metaboliti YTX senza anello A e K e derivati arabinosidi (da Hess e Aasen, 2007).

La DL_{50} nei topi per via i.p. è compresa fra 100 e 750 μg/kg p.v., dove YTX e 1a-homoYTX hanno approssimativamente la stessa tossicità, mentre tutti gli altri analoghi, che si rinvengono nell'epatopancreas dei molluschi, hanno una tossicità minore. In particolare i composti derivati idrossilati, carbossilati e desulfati, che sono più idrosolubili, sono anche a ridotta tossicità, mentre i derivati ammidici, i composti triidrossilati, i chetoni e gli enoni non hanno mostrato alcuna tossicità anche se iniettati a dosi superiori a 5 mg/kg p.v. (Hess e Aasen, 2007).

La tossicità risulta ancora più bassa se le tossine vengono somministrate per via orale e in alcuni casi non sono stati rilevati effetti letali nei topi nemmeno dopo somministrazione di una dose di 10-50 mg/kg (FAO/IOC/OMS, 2004; Hess e Aasen, 2007).

Anche per le YTXs, il meccanismo d'azione non è chiaro (figura 21).

La YTX, non agisce come inibitore delle proteine fostatasi. La somiglianza con brevetossine e ciguatossine ha consentito di ipotizzare che potessero intervenire a livello dei canali del sodio aumentandone il flusso verso l'interno della cellula, ma prove sperimentali hanno escluso anche questa eventualità (EFSA, 2008c).

In colture cellulari di linfociti umani si è dimostrato che YTX aumenta l'afflusso di Ca^{2+} verso l'interno della cellula con incremento del Ca^{2+} citosolico, attivando sia i canali del calcio voltaggio-dipendenti che quelli deplezione-dipendenti (Inoue *et al.*, 2003; Malagoli e Ottaviani, 2004; Malagoli *et al.* 2006a).

L'aumentata concentrazione di calcio intracellulare provoca l'attivazione di fosfodiesterasi (PDA), un decremento di AMPc e GMPc e un incremento di interleukina 2, con alterazione della funzionalità dei linfociti (Alfonso *et al.*, 2003; Alfonso e Alfonso, 2007).

Studi *in vitro* rivelano la capacità di YTX di provocare, anche a basse concentrazioni, citotossicità e apoptosi, attraverso un aumento dell'attività di diverse isoforme di caspasi (particolarmente caspasi-3) (Leira *et al.*, 2002; Suarez Korsnes *et al.*, 2006a, b).

Apoptosi potrebbe anche derivare da un'azione diretta di YTX sui mitocondri. Sembra infatti che YTX sia grado di attraversare la membrana plasmatica e agire direttamente sui mitocondri, con apertura dei pori di permeabilità e depolarizzazione di membrana (Dell'Ovo *et al.*, 2008).

Diversamente da OA che provoca apoptosi e agisce come promotore tumorale attivando la caspasi, YTX, pur essendo più potente nell'induzione della caspasi (anche se richiede più tempo per l'attivazione), non sembra agire come promotore tumorale, al contrario un'importante inibizione della crescita cellulare (80%) è stata osservata per diversi tumori in presenza di YTX.

L'ipotesi è che YTX agisca come citotossico attivando il percorso capsasi e attivando le fosfodiesterasi, ma che, a loro volta, alcune fosfodiesterasi (esonucleasi) sarebbero coinvolte nel processo di riparazione del DNA e manifesterebbero attività antitumorale (Alfonso e Alfonso, 2007).

Sembra inoltre che YTX sia in grado di indurre morte programmata non solo attivando le caspasi e provocando apoptosi, ma anche attraverso un meccanismo non-apoptotica, indipendente da caspasi, chiamato morte cellulare paraptosi-simile. YTX è quindi di interesse nella ricerca di cellule tumorali resistenti ad induttori di apoptosi (Korsnes, 2012; Pang *et al.*, 2014).

YTX provoca apoptosi anche alterando il sistema E-caderina-catenina (famiglia di proteine responsabili dell'adesione, in presenza di Ca^{2+}, fra cellula e cellula), con conseguente perturbazione del sistema di adesione cellulare e inibizione della proliferazione cellulare (Ronzitti *et al.*, 2004; Ronzitti e Rossini, 2008; Franchini *et al.*, 2010).

YTX inizialmente induce solo l'accumulo di un frammento di 100 kDa e solo dopo 2-5 giorni si rileva un crollo del sistema E-caderina. YTX non incrementa il degrado di E-caderina, ma interferisce con il normale smaltimento, impedendo l'endocitosi e la completa degradazione del frammento di proteina prodotto dagli attacchi proteolitici iniziali. Indispensabile per l'effetto tossico di YTX sembra essere la catena terminale sul C9: la sua rimozione o l'aumento delle sue dimensioni o della polarità determina una perdita dell'attività della tossina (Hess e Aasen, 2007; EFSA, 2008c).

L'attività tossica di YTX sembra comprendere quindi diversi meccanismi (figura 21). Gli effetti rapidi, che si manifestano nei primi 10 minuti, si rilevano ad alte concentrazioni (10^{-10}-10^{-5} M), mentre a basse concentrazioni sono necessarie almeno 12 ore di incubazione. Per evidenziare tutti gli effetti della tossina è necessario quindi attendere almeno 12-48 h. La differenza temporale potrebbe indicare l'attivazione di un percorso o di un recettore diverso. Si presume pertanto che per primi vengano attivati Ca^{2+} e PDE, mentre più tardi si verifichino citotossicità, apoptosi e alterazione della E-caderina (Alfonso e Alfonso, 2007).

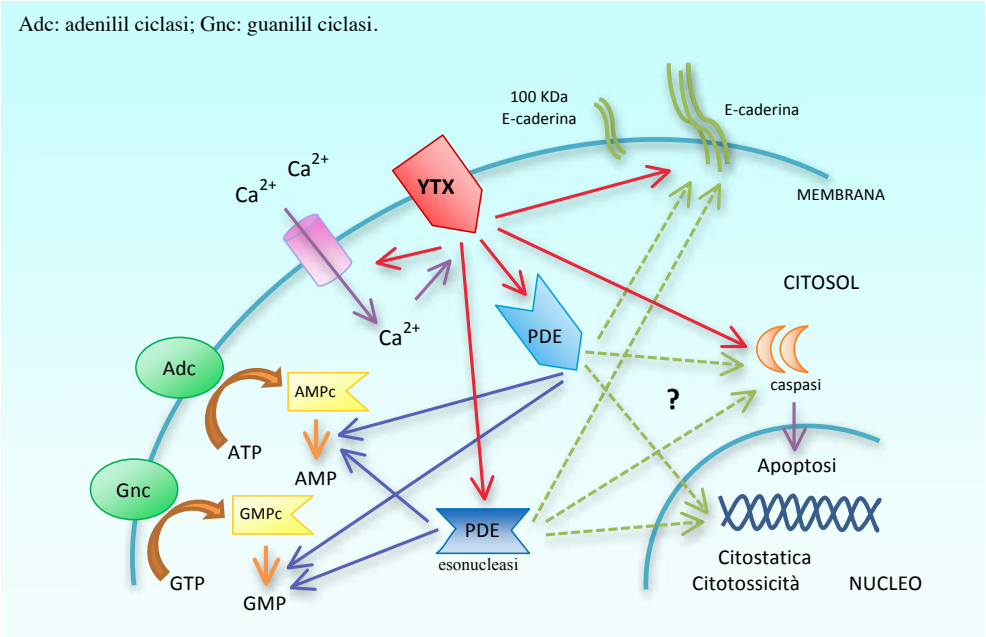


Figura 21: Sintesi degli effetti di YTX. Le frecce tratteggiate indicano possibili effetti di YTX.

YTX agisce anche alterando la risposta immunitaria cellulo-mediata. A tal proposito sono segnalati effetti delle YTXs sulla attività di fagocitosi dei macrofagi e sulla maturazione dei fagosomi che risultano ridotte o inibite. Tali alterazioni sono probabilmente dovute ad disorganizzazioni citoscheletriche, conseguenti ad una diminuzione e riarrangiamento dell'organizzazione di F-actina. Nei macrofagi aumenta anche la produzione di citochine (TNF-α, MIP-1α, MIP-2). Poiché è noto che TNF-α stimola, oltre che proliferazione cellulare e apoptosi, anche una risposta immunitaria cellulare, alti livelli di TNF-α denotano una risposta adattativa dei macrofagi agli effetti inibitori di YTX (Franchini *et al*., 2010; Orsi *et al*., 2010).

Recentemente Dell'Ovo *et al*. (2008) in colture di cardiomiociti di ratto trattate con YTX hanno evidenziato alterazioni strutturali e fisiologiche che coinvolgono i mitocondri nella determinazione degli effetti tossici, non associate a variazione di Ca^{2+} e AMPc.

In aggiunta, Alonso *et al*. (2013) hanno rilevato nei neuroni corticali trattati con concentrazioni nanomolari di YTX una diminuzione di isoforme di proteina tau iperfosforilata e di accumulo di sostanza intracellulare ß-amiloide, lesioni tipiche del morbo di Alzheimer. Ciò sarebbe dovuto all'attivazione della proteina chinasi C (PKC) (traslocazione dal citosol alla membrana) e all'aumento della isoforma inattiva di glicogeno sintasi chinasi (GSK). Tuttavia i meccanismi con cui YTX attiva PKC, le specifiche isoforme coinvolte e i rapporti con

PDE non sono ancora conosciuti. Malgrado ciò si ipotizza l'impiego di YTX nella cura del morbo di Alzheimer.

Da ultimo si ricorda, come possibile uso terapeutico, che YTX e ancor più i desulfati derivati sono capaci di inibire funghi e lieviti, ma non i batteri, a dosi di 10-50 μg/dischetto (Condiner, 2012).

La CE nel Reg. 853/2004 (Cap. V, Sez. VII, Allegato III), modificato per quanto riguarda il gruppo delle yessotossine dal Reg. 786/2013, ha fissato in 160 μg OA equivalenti/kg carne di mollusco e in 3,75 mg YTX eq./kg mollusco i limiti per OA/DTXs/PTXs e YTXs rispettivamente che devono essere presenti nei molluschi.

I fattori di equivalenza tossica (TEF) sono rappresentati da OA=1, DTX1=1, DTX2=0.6, mentre per DTX3 il fattore considerato è uguale alla tossina corrispondente non esterificata (EFSA, 2008a).

Per le tossine PTX un valore di TEF uguale a 1 é assegnato a PTX1, PTX2, PTX3, PTX4, PTX6, PTX11, mentre PTX7, PTX8, PTX9, PTX SA e 7-epi-PTX2 SA sono ritenute molto meno tossiche e perciò non è stato loro assegnato TEF (EFSA, 2009b).

Infine, per le tossine del gruppo YTX, un TEF uguale a 1 è assegnato a YTX, 1a-homo-YTX e a 45-OH-YTX, mentre a 45-OH-1a-homoYTX è stato assegnato un valore di TEF uguale a 0.5 (EFSA, 2008c).

Per OA il gruppo di esperti EFSA ha indicato in 50 μg eq./persona il valore di LOAEL (*lowest-observed-adverse-effect-level*) che corrisponde a circa 0.8 μg/kg p.v.. Applicando un fattore di incertezza pari a 3, è stato stabilito un NOAEL (*no-observed-adverse-effect-level*) di 0.3 μg eq./kg p.v. che corrisponde alla dose acuta di riferimento (ARfD), cioè la dose che può essere ingerita in un periodo di 24 ore senza che si manifestino rischi apprezzabili per la salute del consumatore (tabella 3) (EFSA, 2008a).

Per PTX-2 il valore di LOAEL è di 250 μg/kg p.v.. Poiché gli effetti sono lievi e reversibili, il NOAEL si ottiene applicando un fattore di sicurezza uguale a 3, mentre il valore di ARfD viene valutato in 0,8 μg PTX-2 eq./kg p.v., applicando un fattore di incertezza di 300 (EFSA, 2009b).

Nel caso delle YTX, infine, la tossicità a livello cardiaco, rilevabile al microscopio, si rileva con somministrazione per via orale di una singola dose di YTX compresa fra 7,5 e 5 mg/kg p.v.. Ciò corrisponde a un NOAEL di 5 mg/kg p.v. e, applicando un fattore di incertezza pari a 200, un ARfD di 25 μg YTX eq./kg p.v. (EFSA, 2008c).

Pertanto ARfD corrispondono a 0,3 μg OA eq./kg peso corporeo (18 μg OA eq./persona di 60 kg p.v.), 0,8 μg PTX-2 eq./kg peso corporeo (48 μg PTX-2 eq./persona) e 25 μg YTX eq./kg peso corporeo (1,5 mg PTX2 eq./persona). Considerando che un consumatore medio assume in un solo pasto 400 g di molluschi, in relazione alla ARfD, la massima concentrazione di tossine che si dovrebbe rilevare nei molluschi corrisponde a 45 μg OA eq./kg molluschi, 120 μg PTX-2 eq./kg molluschi e 3,75 mg YTX eq./kg molluschi (tabella 3).

A ciò consegue che i limiti fissati dalla CE sono circa tre volte più alti, nel caso della tossina OA, di quelli previsti in relazione alla ARfD, per le tossine PTX i limiti fissati dalla CE sono leggermente al di sotto di quelli indicati con la valutazione della ARfD, mentre per le YTX tossine i limiti coincidono. Questo comporta un rischio per il consumatore che si alimenti di mitili contenenti OA nei limiti di legge (EFSA, 2009d).

5. VENERUPIN SHELLFISH POISONING (VSP)

Venerupin Shellfish Poisoning (VSP), o intossicazione da molluschi veneridi, è una grave sindrome morbosa dell'uomo, caratterizzata da una lunga incubazione (24-48 h) a cui fanno seguito disturbi gastroenterici (nausea, vomito e diarrea), cefalea e agitazione. Nei casi più gravi possono manifestarsi lesioni epatiche e anomalie della coagulazione del sangue, delirio

e coma epatico, con indice di mortalità superiore al 30% (Schantz, 1973).

Segnalata per la prima volta in Giappone nel 1968, essa insorge in seguito al consumo di molluschi veneridi *(Tapes* spp.) o di ostriche *(Crassostrea gigas),* nei quali si sia accumulata la venerupina, una tossina ad elevata termoresistenza elaborata dalla dinoflagellata *Exuviaella mariae-lebouriae (Prorocentrum minimum* var. *mariae-lebouriae e* var. *triangulatum)* (Schantz, 1974). L'alga produttrice è stata isolata anche nel Mar Mediterraneo e nel Mar Baltico e alcuni AA., in virtù dell'identità delle alghe produttrici, sono propensi a ricollegarla a fenomeni di DSP (Volterra *et al.,* 1990).

6. AZASPIRACID SHELLFISH POISONING (AZP)

Azaspiracid Shellfish Poisoning (AZP) è un'intossicazione con sintomi enterici causata da un gruppo di tossine denominate azaspiracidi (AZAs) che prendono il nome dalla struttura chimica del composto.

Inizialmente, la fonte delle tossine è stata ritenuta *Protoperidinium crassipens* (figura 22), una dinoflagellata che è parte della catena trofica di molte specie di molluschi (Vilariño, 2007). Successivamente si è dimostrato che l'alga produttrice è una piccola (12-16 μm) dinoflagellata, *Azadinium spinosum* (figura 22). *P. crassipens* non sintetizza la tossina stessa, ma la acquisisce, in virtù delle sue abitudini predatorie, da *A. spinosum* (Krock *et al*., 2009; Salas *et al*., 2011; Jauffrais *et al*., 2012a, 2013).

Anche *Azadinium poporum*, *Azadinium dexteroporum* sp. nov. e *Amphidoma languida*, appartenenti alla famiglia delle *Amphidomataceae*, sono ritenute in grado di produrre tossine AZA (Gu *et al*., 2013; Percopo *et al*., 2013).

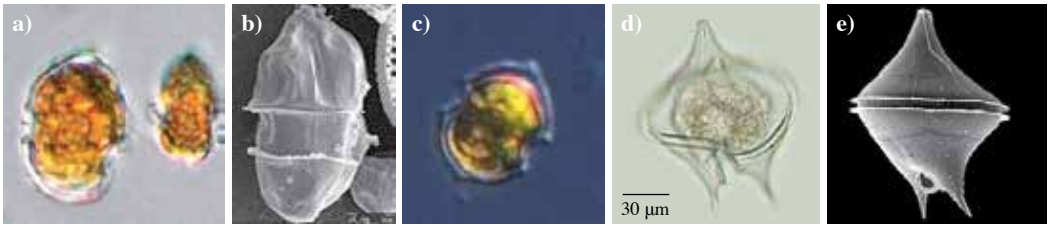


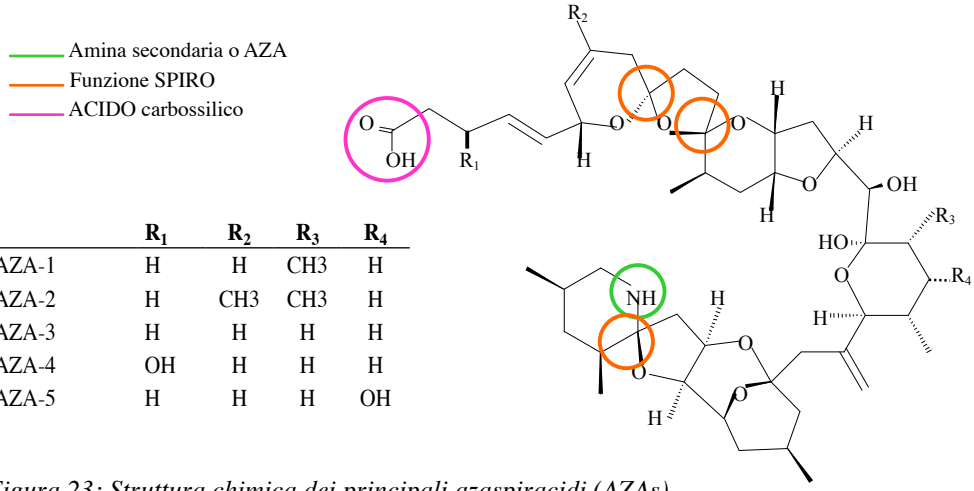
Figura 22: (a) (b) (c) Azadinium spinosum *e (d) (e)* Protoperidinium crassipens.

Il primo caso di intossicazione AZP è stato segnalato nel 1995 in Olanda ed era dovuto al consumo di cozze (*Mytilus edulis*) importate dall'Irlanda (baia di Killary). Da allora numerosi focolai di AZP sono stati segnalati in Irlanda e le AZAs tossine sono state isolate anche in U.K., Norvegia, Francia, Spagna Mar Mediterrano, Sud America e U.S.A. (Amzil *et al*., 2008; Alvarez *et al*., 2010; Gerssen *et al*., 2010; López-Rivera *et al*., 2010; Hinder *et al*., 2011). Nel 1998 è stata segnalata anche in Italia (FAO, 2004).

Anche se tutti gli episodi tossici riportati negli esseri umani sono stati collegati al consumo di cozze (*Mytilus edulis*), AZA tossine sono state rilevate, sebbene a dosaggi inferiori, anche in ostriche (*Cassostrea gigas*), vongole (*Tapes phillipinarium*, *Cardium edule*), cappesante (*Pecten maximum, Argopecten purpuratus*), altri mitili (*Mytilus galloprovincialis, M. chilensis*) e crostacei *(Cancer pagurus*), dove si accumulano particolarmente in inverno quando i molluschi sono esenti da contaminazione di tossine DSP (Vilariño, 2007).

I molluschi contaminati permangono tossici per un lungo periodo (anche sei mesi) e le normali temperature di cottura non inattivano le AZAs tossine (Jauffrais *et al*., 2013).

Le AZAs, chimicamente definite polieteri contenenti azoto, sono costituite da una ammina ciclica (piperidina o gruppo aza), un unico insieme anulare a spirale (spiro) e un acido carbossilico (da cui il nome AZA-SPIR-ACIDO) (figura 23). Fino ad ora sono stati identificati circa 30 diversi analoghi, tra cui azaspiracide-1 (AZA-1), azaspiracide-2 (AZA-2) e azaspiracide-3 (AZA-3), si rilevano nelle dinoflagellate e risultano i più importanti in termini di tossicità e presenza. Come per le altre tossine marine lipofile (PTX, OA, DTXs, BTXs, YTXs) molti derivati idrossi-, diidrossi- e carbossi- analoghi AZA sono stati ottenuti dai tessuti dei molluschi (Frederick *et a*l., 2007; Twiner *et al*., 2008; Jauffrais *et al*., 2012b).



	R_1	R_2	R_3	R_4
AZA-1	H	H	CH3	H
AZA-2	H	CH3	CH3	H
AZA-3	H	H	H	H
AZA-4	OH	H	H	H
AZA-5	H	H	H	OH

Figura 23: Struttura chimica dei principali azaspiracidi (AZAs) (modificata da Twiner et al., 2008).

A causa delle somiglianze nei sintomi gastrointestinali che AZA hanno in comune con OA e DTXs, le AZAs erano originariamente classificate insieme alle tossine DSP, a cui spesso si accompagnano. Tuttavia, nei campioni di acqua prelevati nel caso di intossicazioni AZP non furono rilevate le alghe produttrici di tossine DSP specifiche e il *test* sul topo diede una diversa risposta (paralisi più lenta) (Ryan *et al*., 2011).

La sintomatologia compare dopo 3-18 ore dal consumo dei frutti di mare contaminati ed è caratterizzata da disordini gastrointestinali, nausea, diarrea grave, vomito e crampi addominali, mal di testa, con marcata variabilità in funzione dell'età. La malattia persiste per 2-3 giorni e non vi sono effetti a lungo termine, né casi letali. AZP rimane inoltre una malattia rara, in quanto solo 5 eventi di intossicazione sono stati riportati fino ad oggi. Tuttavia, poiché la sintomatologia scompare rapidamente, è probabile che vi sia una percentuale elevata di sotto-segnalazione (Ryan *et al*., 2011).

La somministrazione i.p. o per *os* nei topi di estratti di molluschi mostra che l'apparato gastroenterico rappresenta il principale bersaglio delle AZA tossine, secondariamente il fegato e gli organi linfatici. Si evidenzia accumulo di liquido e gas nell'ileo, degenerazione vacuolare, erosioni e necrosi delle cellule epiteliali dei microvilli (decapitazione villi), edema della sottomucosa, atrofia della lamina propria, atrofia e aree necrotiche negli organi linfoidi (timo, milza e placche di Peyer), polmonite interstiziale, steatosi e necrosi singola o focale del fegato che risulta aumentato di circa il 40% (Ito *et al*., 2000; Twiner *et al*., 2008, Ryan *et al*., 2011).

Dosaggi corrispondenti a 250-450 di AZA-1 μg/kg p.v., somministrati 1 o 2 volte con sonda gastrica nei topi, hanno causato la morte di alcuni, gravi effetti gastrointestinali in altri con lesioni al fegato e al polmone che persistevano per lungo tempo nei sopravvissuti. Somministrazioni ripetute per sonda gastrica, una o due volte alla settimana per 10-20 settimane, di una dose pari a 5-20 μg/kg p.v. ha causato, in topi appartenenti a un ceppo ad alta incidenza tumorale, la morte in alcuni soggetti e in altri un aumento significativo dei tumori polmonari ad un anno dalla sopravvivenza. Ciò sarebbe indice che AZAs possano fungere da cancerogeni o da promotori tumorali (FAO/IOC/OMS, 2004).

Al contrario di altre tossine marine, la dose letale per i topi somministrata per via i.p. si avvicina alla dose orale e corrisponde a 200 μg/kg per AZA-1, 110 μg/kg per AZA-2 e 140 μg/kg per AZA-3, mentre gli altri derivati sono molto meno tossici (Vilariño, 2007; Twiner *et al*., 2012c; Munday, 2014).

Per la somiglianza sintomatologica con l'intossicazione indotta da OA, è stato suggerito inizialmente che il più probabile meccanismo d'azione fosse l'inibizione delle proteine fosfatasi (PP serina/treonina). In realtà le prove sperimentali non hanno dimostrato l'attività delle tossine AZA come inibitori delle PP1 e PP2A. Ciò nonostante, non si può escludere la possibilità che AZAs possano inibire uno dei molti altri tipi di serina/treonina PP (PP2B, PP2C, PP4, PP5) o un altro sottotipo PP (fosfatasi specifica-tirosina, lipidi fosfatasi) (Twiner *et al*., 2008).

Gli esperimenti *in vitro* su cellule di mammifero mostrano un incremento di calcio citosolico (sia per rilascio dal reticolo endoplasmatico interno che per aumento dell'afflusso extracellulare) e dei livelli AMPc, alterazioni della struttura del citoscheletro cellulare (decremento concentrazione F-actina polimerizzata), un effetto sul sistema E-caderina (accumulo di frammenti di E-caderina) e inibizione dell'endocitosi proteica di membrana (Román *et al*., 2002; Vilariño *et al*., 2006; Ronzitti *et al*., 2007; Vale *et al*., 2007b). Tutto questo si traduce in alterazione della barriera paracellulare intestinale, aumento della secrezione nel lume intestinale (diarrea) e necrosi dei villi intestinali (Ryan *et al*., 2011).

Gli stessi meccanismi determinano citotossicità, apoptosi e necrosi per un'ampia varietà di cellule provenienti da varie fonti di mammifero e potenziale carcinogenicità e attività di promotore tumorale (Twiner *et al*., 2005 e 2012a; Vale *et al*., 2007a).

Alcuni Autori suggeriscono che AZA-1 induce apoptosi stimolando l'attività di diverse caspasi (2/10 iniziatrici e 3/7 effettrici), aumentando la concentrazione cellulare di citocromo C e bloccando fisicamente i canali del K^+ presenti sulla membrana citoplasmatica esterna (Twiner *et al*., 2012a, c). In neuroni corticali di topo, linfociti T e cellule intestinali, provoca altresì inibizione del flusso neuronale di ioni e dell'attività bioelettrica, aumento dell'efflusso di lattato deidrogenasi (LDH), frammentazione e condensazione nucleare, effetti che contribuiscono ulteriormente alla sua attività apoptosica (Cao *et al*., 2010; Twiner *et al*., 2012b).

Un altro effetto segnalato recentemente è la teratogenicità negli embrioni di pesce, ritardo nello sviluppo e mortalità nelle uova. Sebbene la presenza di AZAs non sia stata rilevata nei tessuti dei pesci, ciò suggerisce che le tossine potrebbero modificare la popolazione acquatica ambientale (Vilariño, 2007).

Per quanto riguarda i dati tossicologici, fattori di equivalenza di tossicità (TEF) sono così indicati: AZA-1 = 1, AZA-2 = 1,8 e AZA-3 =1,4. Il LOAEL viene indicato in 113 μg AZA-1 equivalenti per persona (1,9 μg/kg p.v.), mentre il NOAEL viene calcolato applicando un fattore di incertezza uguale a 3.

La dose di riferimento per la tossicità acuta (ARfD) è di 0,2 μg/kg peso corporeo (12 μg AZA-1 equivalenti/persona) e ciò corrisponde ad un valore massimo tollerabile in un solo pasto (400g di molluschi) di 30 μg AZA-1 eq./kg carne di mollusco, valore che è 5 volte più piccolo del limite fissato dal Reg. CE 853/2004 di 160 μg/kg di frutti di mare. Non si può quindi escludere che la presenza di equivalenti AZA-1 in quantità ammessa possa causare effetti tossici in consumatori suscettibili (tabella 3) (EFSA, 2008b; EFSA, 2009d).

Inoltre le tossine non si concentrano solo a livello dell'epatopancreas, ma si distribuiscono, anche se in piccola quantità, nei diversi tessuti del mollusco (soprattutto progredendo la fase dell'intossicazione algale), quindi la reale tossicità delle cozze potrebbe essere sottostimata utilizzando il protocollo del *test* sul topo applicato alle tossine DSP che prevede l'impiego delle sole ghiandole digestive. (FAO, 2004; EFSA, 2009d).

Spesso associate ad altre tossine DSP, possono anche aumentarne gli effetti in modo additivo, se non sinergico. Nel caso della co-occorrenza con YTXs si può ipotizzare che le tossine AZAs possano influenzare la permeabilità della barriera intestinale attraverso un danno epiteliale e ciò faciliterebbe l'assorbimento delle YTXs e i conseguenti danni cardiaci (Ryan *et al*., 2011).

Figura 24: Allevamento di mitili dell'Adriatico.

7. INTOSSICAZIONE DA IMMINE CICLICHE

Il gruppo delle immine cicliche (CIs) comprende diverse tossine: spirolidi (SPXs), gymnodimine (GYMs), pinnatossine (PnTXs), pteriatossine (PtTXs), prorocentrolide e spiro-prorocentrimina.

SPXs sono prodotte dalle dinoflagellate *Alexandrium ostenfeldii* e *A. peruvianum*, mentre GYMs sono state rilevate in *Karenia selliformis*. Non è stato identificato l'agente responsabile della produzione della PnTXs, ma sembra si tratti di una dinoflagellata peridinoide (recentemente identificata con *Vulcanodinium rugosum*), mentre si ritiene che le PtTXs derivino da biotrasformazione di PnTXs nei molluschi (figura 25) (Gerssner *et al*., 2010; Pulido *et al*., 2011; Rhode *et al*., 2011; Geiger *et al*., 2013).

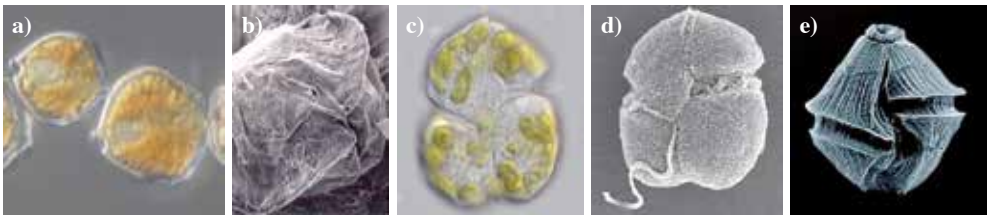


Figura 25: Alexandrium ostenfeldii *(a, b),* Karenia selliformis *(c, d) e* Vulcanodinium rugosum *(e).*

Non sono stati riportati casi di intossicazioni nell'uomo da CIs, ma tossine SPXs sono state rilevate in alghe e/o molluschi provenienti dall'Europa (Norvegia, Danimarca, Irlanda, Scozia, Spagna e Italia), Canada, Stati Uniti e Tunisia, mentre GYMs sono state identificate inizialmente solo in alghe e molluschi (ostriche) della Nuova Zelanda, anche se rapporti successivi hanno rilevato la loro presenza in vongole raccolte in Tunisia e in molluschi delle coste europee e nord americane. I molluschi contaminati da GYMs permangono tossiche per molti anni e le tossine si concentrano nei tessuti al di fuori della ghiandola digestiva (Molgó *et al*., 2007).

Le PnTXs isolate in Giappone e Cina da molluschi del genere *Pinna* (*P. pectinata, P. attenuata e P. muricata*) recentemente sono state identificate anche in Europa (Norvegia), Nuova Zelanda e Australia; PtTXs sono state a loro volta isolate nel mollusco *Pteria penguin* (Gonzales *et al*., 2006; Gerssner, 2010; Geiger *et al*., 2013; Hess *et al*., 2013). Non è stata stabilita una chiara correlazione fra sintomatologia gastroenterica negli umani e la presenza di PnTX e PtTX nei molluschi, anche se estratti dell'epatopancreas hanno dato sintomi di avvelenamento nei topi inoculati per via i.p. (Molgó *et al*., 2007).

Chimicamente SPXs, GYMs, PnTXs, PtTXs e altre CIs, come prorocentrolidi e spiro-prorocentrimine, sono composti macrociclici con un gruppo funzionale immina (doppio legame carbonio e azoto) e frazioni spiro-etere. Essi vengono raggruppati in base alla struttura chimica e alla tossicità sui topi inoculati per via i.p. (Otero *et al*, 2011a).

Il gruppo SPXs comprende 10-15 composti, fra cui il 13-desmetil SPX C è il più comune nei molluschi (figura 26). Il gruppo GYMs (figura 27) è costituito da 3 analoghi (GYM A-C), mentre 7 analoghi PnTXs (PnTX A-G) (figura 28) sono stati caratterizzati chimicamente. PtTXs (figura 28) e PnTXs sono quasi strutturalmente identici e si ipotizza che le PnTX F e G siano i progenitori delle altre tossine PnTXs e delle PtTXs (PtTX A-C) derivanti dalla trasformazione idrolitica e metabolica operata dai molluschi (Roach *et al*., 2009; EFSA, 2010b; Selwood *et al*., 2010; Ciminiello *et al*., 2010c; McCarron *et al*. 2012).

Il meccanismo d'azione di SPX e GYN non è ancora ben conosciuto, ma la somministrazione nei topi per via i.p. di estratti lipofili di molluschi contaminati da SPXs o GYMs causa ipereccitabilità seguita da paralisi, dispnea grave e morte in pochi minuti (6- 15 minuti) dell'animale trattato. A dosi subletali, gli animali si riprendono rapidamente, mentre se somministrate per via orale, il potenziale tossico delle CIs è comunque molto più basso (Munday *et al*., 2004).

Per GYM B la DL_{50} nel topo per via i.p. è di 800 μg/kg p.v., mentre per GYM A i valori della DL_{50} dopo somministrazione i.p., per sonda gastrica e alimentazione sono, rispettivamente, 96, 755 e > 7500 μg/kg p.v.. Per desmetil-SPX C questi valori corrispondono a 6,9, 157 e 500 μg/kg p.v. e a 1050 μg nel topo alimentato *ad libitum* (FAO/IOC/OMS, 2004; EFSA, 2010b).

Per SPX A, B, C e 20-metil spirolide G la DL_{50} nel topo per via i.p. è, rispettivamente, di 37, 99, 8.0 e 8.0 µg/kg p.v., mentre SPX E e F sono molto meno tossiche e non si osservano effetti fino a dosaggi di 1000 μg/kg p.v. (Munday *et al*.; 2012).

La funzione immina è comunque di fondamentale importanza per la loro tossicità. Quando il gruppo immina è ridotto, come in GYMs e diidrospirolide B, o distrutta mediante apertura dell'anello, come in spirolidi E ed F, la tossicità risulta notevolmente diminuita. La labilità dell'anello immina al pH acido dello stomaco o all'idrolisi enzimatica potrebbe perciò spiegare la scarsa tossicità degli spirolidi per l'uomo (Stewart *et al*., 1997; Hu *et al*., 1996).

PnTX A naturale presenta nel topo somministrata per via i.p. una DL_{99} di 135 μg/kg p.v. e una DL_{50} di 2,7 μg/MU, al contrario la PnTX A sintetica non presenta tossicità per il topo alla dose di 5.000 μg/kg p.v.. PtTX A mostra una tossicità quasi analoga a PnTX, con DL_{99} e $DL_{50,}$ rispettivamente, di 100 μg/kg p.v. e 0,99 μg/MU per via i.p.. Una miscela 1:1 di PnTX B e C, che sono stereoisomeri, è molto più tossica per i topi, con valori di DL_{99} di 22 μg/kg p.v.. Un aumento di tossicità si rileva anche per la miscela PtTX B e C, con valori di DL_{99} di

8 μg/kg p.v., valori paragonabili alla tetrodotossina. Infine, PnTX D presenta una più bassa tossicità (DL_{99} = 400 μg/kg p.v. e $DL_{50} \geq 10$ μg/MU), benché estremamente citotossica per diverse linee cellulari (Molgó *et al*., 2007).

Non esistono invece informazioni sull'attività tossica sub-acuta o cronica di qualsiasi CIs (FAO/IOC/OMS, 2004).

Si ritiene che le CIs, attraverso il gruppo immina ciclico, siano in grado di legare e bloccare selettivamente i recettori dell'acetilcolina sia muscarinici che nicotinici, sia a livello del sistema nervoso centrale che periferico, incluse le giunzioni neuromuscolari. GYMs mostrano un effetto reversibile, mentre il legame di SPXs sembra essere irreversibile (Kharrat *et al*., 2008; Vilariño *et al*., 2009, Fonfría *et al*., 2010; Pulido *et al*., 2011). Sono inoltre attivatori deboli dei canali del calcio di tipo L (voltaggio-dipendenti) (Hu *et al*. , 1995).

L'azione di antagonista colinergico delle GYMs è studiata attualmente nel trattamento delle malattie neurodegenerative caratterizzate dall'accumulo di placche ß-amiloidi (sclerosi laterale amiotrofica, sindrome di Down, demenza vascolare, malattia di Creutzfeld-Jacob) e dall'aumento di proteina tau iperfosforilata (demenza fronto-temporale, malattia di Picks) o con entrambi gli effetti (malattia di Alzheimer, demenza associata con la malattia di Parkinson, emorragia cerebrale ereditaria con amiloidosi-tipo Dutch, schizofrenia o demenza senile) (López Botana *et al*., 2012).

Il trattamento di neuroni corticali con 50 nM di GYM provoca infatti decremento dell'accumulo di placche ß-amiloidi intracellulari e dei livelli di alcune isoforme di proteina tau iperfosforilata, attività mediate dalla diminuzione dell'isoforma inattiva della glicogeno-sintasi-chinasi 3, dall'aumento dei livelli dell'isoforma attiva della chinasi ERK1/2 e dall'aumento della sintesi di acetilcolina. Inoltre, GYMs diminuiscono anche la neurotossicità indotta dal glutammato *in vitro* (Alonso *et al*., 2011).

Per quanto riguarda PnTXs e PtTXs, sebbene ritenute inizialmente in grado di attivare i canali del Ca^{2+}, attualmente non vi sono certezze né per quanto attiene il meccanismo d'azione né su quale sia il sito d'attacco di queste tossine (Molgó *et al*., 2007). Studi recenti suggeriscono che il meccanismo d'azione sia analogo a SPXs e GYMs, siano cioè antagonisti dei recettori nicotinici dell'acetilcolina; infatti PnTX A interagisce selettivamente con il sottotipo α7 neuronale umano dei recettori nicotinici, apparentemente in modo irreversibile (Araóz *et al*., 2011).

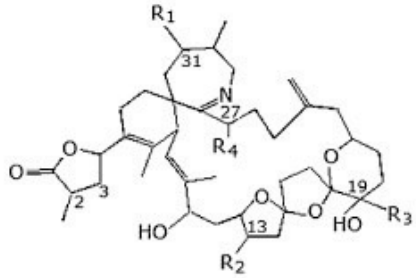
La CE non ha stabilito dei limiti di presenza di CIs nei molluschi bivalvi e i dati relativi alla tossicità sono limitati alla tossicità acuta per SPX rilevata nei topi (DL_{50}) dopo somministrazione per sonda gastrica o nel mangime (variabile fra 50 e 500 μg/kg p.v.). Considerando che il valore più alto corrisponde alla somministrazione per *os* con l'alimento, considerando che il margine di esposizione è tra i 1.000 e 10.000 e valutando infine che nei topi trattati con dosi subletali si otteneva un rapido e pieno recupero, gli esperti EFSA hanno ritenuto che l'attuale esposizione stimata a SPX non desti particolari preoccupazioni per la salute del consumatore (EFSA, 2010b).

Tuttavia il laboratorio europeo di referenza per le biotossine marine (EU-RLMB) ha proposto un livello guida per la somma di SPXs di 400 μg/kg carne di mollusco (CRLM, 2005).

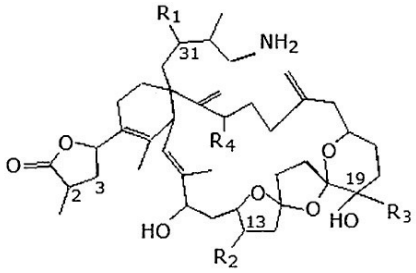
Per le altre CIs gli studi tossicologici sono limitati e non sono possibili valutazioni del rischio di intossicazione (EFSA, 2010b).

Del gruppo delle immine cicliche fanno parte altri alcaloidi marini, alcuni con importanti effetti farmacologici e clinici. Fra questi, l'acido pinnaico e l'acido tauropinnaico, isolati dai visceri del bivalve *Pinna muricata* e l'aliclorina, derivata dalla spugna *Halichondria okadai*, che sono considerati potenziali farmaci antiinfiammatori; pinnamina, purificata anch'essa dai visceri di *Pinna muricata* che contiene nella sua formula un azabiciclo, elemento farmacoforo nonano, infiammabile e nocivo; prorocentrolide e prorocentrolide B, prodotte dai dinoflagellati bentonici *Prorocentrum lima* e *P. maculosum,* implicati anche nell'intossicazione DSP,

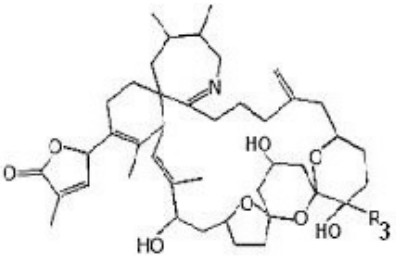
assieme a spiro-prorocentrimina, di cui non si conosce l'alga che lo sintetizza, che presentano tossicità acuta e rapida nel topo con un effetto "tutto o niente", poiché ci sono dosi al di sotto delle quali gli animali recuperano rapidamente; zooxantellatossina, zooxantellamide, symbioimina e neosymbioimina, isolate dal dinoflagellato simbiotico *Symbiodinium* spp., che inibiscono significativamente la differenziazione delle cellule monocitiche murine (linea RAW264) in osteoclasti e risultano quindi potenziali agenti anti-riassorbimento per la prevenzione e il trattamento dell'osteoporosi post-menopausa. É stato inoltre dimostrato che symbioimina è in grado di inibire l'attività di cicloossigenasi (COX-1 e COX-2) collegate a carcinogenesi e l'angiogenesi, con conseguente sviluppo di nuovi farmaci per curare malattie COX-associate, quali malattie infiammatorie e cancro (Molgó *et al*., 2007; Uemura, 2010).



Spirolide (SPX)	R_1	R_2	R_3	R_4	$\Delta^{2,3}$
SPX A (isomero S)	H	CH_3	CH_3	H	$\Delta^{2,3}$
SPX B (isomero R)	H	CH_3	CH_3	H	
SPX C (isomero S)	CH_3	CH_3	CH_3	H	$\Delta^{2,3}$
SPX D (isomero R)	CH_3	CH_3	CH_3	H	
13-desmetil SPX C	CH_3	H	CH_3	H	$\Delta^{2,3}$
13,19-didesmetil SPX C	CH_3	H	H	H	$\Delta^{2,3}$
13-desmetil SPX D	CH_3	H	CH_3	H	
27-idrossi 13,19-didesmetil SPX C	CH_3	H	H	CH_3	$\Delta^{2,3}$



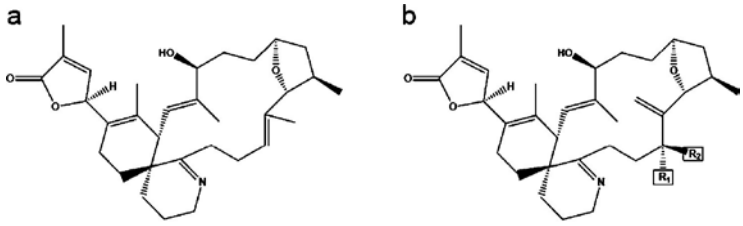
SPX E (isomero S)	H	CH_3	CH_3	H	$\Delta^{2,3}$
SPX F (isomero R)	H	CH_3	CH_3	H	



SPX G	H
20-metil SPX G	CH_3

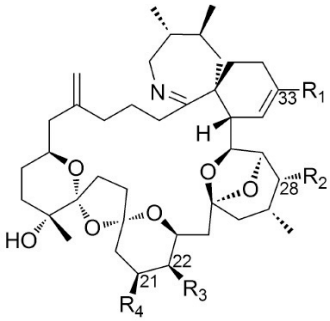
$\Delta^{2,3}$: doppio legame tra C_2-C_3

Figura 26: Struttura chimica di spirolidi (SPXs) (modificata da Otero et al.*, 2010b).*



Gymnodimina A (GYM A)	Gymnodimine B e C	R_1	R_2
	GYM B	H	OH
	GYM C	OH	H

Figura 27: Struttura chimica gymnodimine (GYMs) (modificata da Cembella e Krock, 2008).



Pinnatossine	R_1	R_2	R_3	R_4
PnTX A	$-CO_2H$	OH	H	H
PnTX B,C	CO_2H, NH_2	OH	H	H
PnTX D	CO_2H, O	H	OH	CH_3
PnTX E	CO_2H, OH	H	OH	CH_3
PnTX F	O, O	H	OH	CH_3
PnTX G		OH	H	H
PtTX A	S, NH_2, OH, CO_2H	OH	H	H
PtTX B,C	S, CO_2H, NH_2, HO	OH	H	H

Figura 28: Struttura chimica pinnatossine (PnTXs) e pteriatossine (PtTX) (mod. da Miles et al., *2010; Selwood* et al., *2010)*

Figura 29: Allevamenti di pesci dell'Adriatico.

8. INTOSSICAZIONE DA PALITOSSINA (PP)

La Palitossina (PLTX), segnalata per la prima volta da Moore e Scheuer nel 1971 nelle Hawaii seguendo la leggenda hawaiana dell'alga tossica di Hana (*limu make o Hana*), un tempo utilizzata dagli indigeni per avvelenare le loro lance, è una delle biotossine marine più tossiche finora note, seconda per tossicità intraperitoneale *in vivo* solo alla maitotossina (Vale e Ares, 2007).

Frequentemente rilevata in campioni di una microalga tropicale, *Ostreopsis ovata*, ormai diffusa in tutto il mondo, mediterraneo compreso, dove sono stati segnalati più volte problemi respiratori in concomitanza alla sua presenza, la tossina è stata evidenziata anche in molluschi ed altri prodotti ittici (crostacei, echinodermi e pesci), che possono fungere da vettori per intossicazioni alimentari umane. Poiché in paesi tropicali sono stati riportati casi di intossicazione gravi, anche letali, in seguito all'ingestione di pesci e crostacei contaminati con PLTXs, si rende necessario monitorare la presenza di questi composti nei prodotti ittici e/o nelle microalghe produttrici, anche in assenza di una legislazione in merito (Squarcione, 2007; Aligizaki *et al*., 2008; Amzil *et al*., 2012).

Le tossine del gruppo palitossina (PLTXs) sono biotossine marine principalmente rilevate in zoantidi marini (coralli molli) del genere *Palythoa* (*P. toxica, P. tuberculosa, P vestitus, P. mammilosa, P. carobaeorum*) e dinoflagellati bentonici del genere *Ostreopsis* (*O. ovata, O. siamensis*, *O. mascarenensis*) (De Bortoli, 2010). PLTX analoghi sono stati isolati anche dall'alga rossa *Chondria armata* (figura 30) (Fusetani e Kem, 2011).

La presenza di fioriture di *Ostreopsis* spp., che si evidenzia come una rete mucillaginosa rossiccia–brunastra con numerose bollicine di gas, può provocare contaminazione dei molluschi destinati al consumo umano (figura 31) (Ciminiello *et al*., 2009; Deeds e Schwartz, 2010).

L'evidenziazione di numerosi composti PLTXs analoghi in specie filogeneticamente distanti, come coralli e microalghe, e con diverse concentrazioni di tossine, portano ad ipotizzare che il reale organismo produttore della palitossina possa essere una specie batterica simbionte che viva a stretto contatto con gli organismi superiori, i quali si limiterebbero ad accumularla o eventualmente a metabolizzarla (Katikou, 2007; Seemann *et al*., 2009; Ramon e Vasconcelos, 2010).

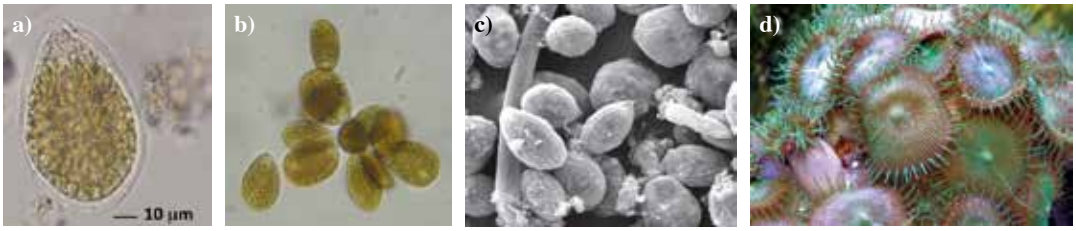


Figura 30: Ostreopsis ovata *(lungh. 47-55 µm; largh. 27–35 µm) (a) (b) (c) e* Palythoa toxica *(c).*

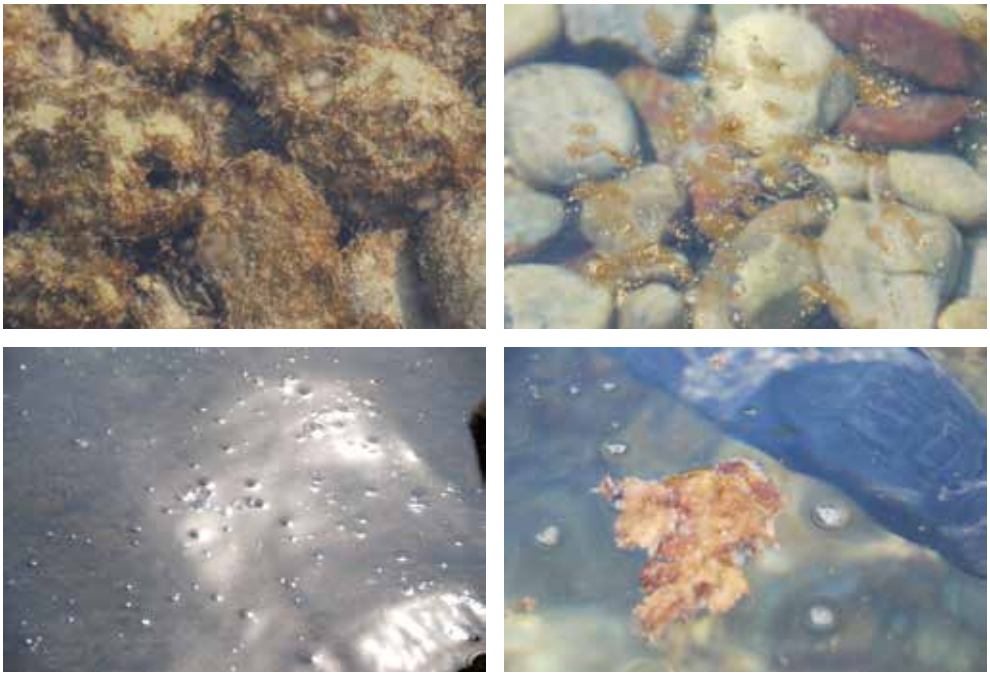
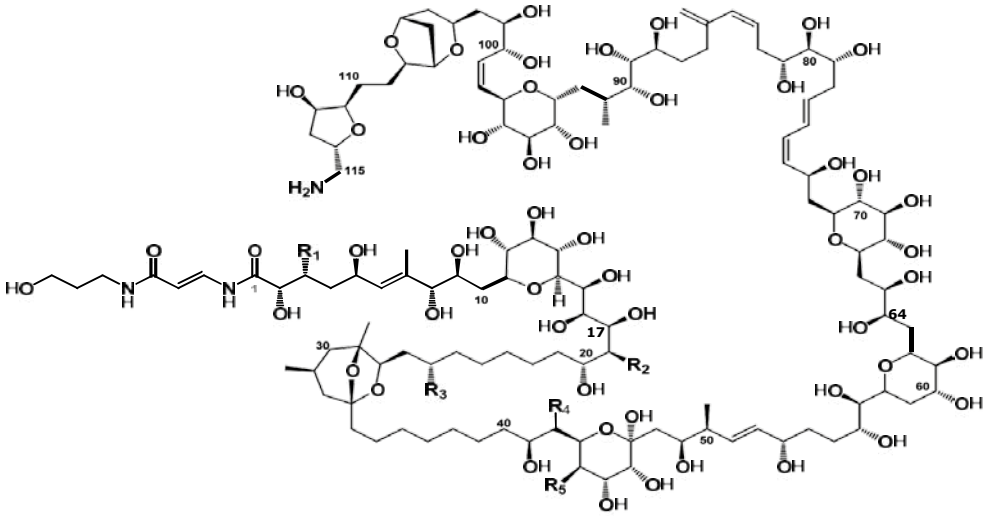


Figura 31: Fioriture di Ostreopsis ovata.

Le tossine PLTXs ($C_{129}H_{223}N_3O_{54}$; peso molecolare compreso tra 2659-2680 Da) sono composti poliidrossilati complessi dotati di aree sia lipofile che idrofile. La molecola di base è costituita da una lunga, parzialmente insatura e alifatica struttura poliidrossilata di 115 atomi di carbonio (la più lunga tra i composti naturali, detta palitossina acido carbossilico), contenente eteri ciclici, centri chirali, ossidrili e gruppi ammidici, e una coda di 3-amino-N-(3-idrossipropil)-acrilamide, unita al C_1 della catena alifatica da un legame ammidico. L'

ammino-gruppo primario all'estremità C_{115} della molecola è essenziale per la basicità delle tossine PLTX-gruppo (De Bortoli, 2010).

Sono conosciuti diversi analoghi PLTXs: palitossina (PLTX), ostreocina (Ost-B e D), mascarenotossina (a, b, c), ovatossina (a, b, c, d, e, f), homopalitossina, bishomopalitosina, neopalitossina, deossipalitossina e 42-idrossipalitossina, ma solo per PLTX, Ost-B, Ost-D, ovatossina-a e 42-idrossipalitossina la struttura chimica è stata caratterizzata (figura 32) (Lenoir *et al*., 2004; Katikou, 2007; EFSA, 2009a; Rossi *et al*., 2010; Ciminiello *et al*., 2010a; 2011, 2012a, b, c; 2013).



Tossina	R_1	R_2	R_3	R_4	R_5	C_{17}	C_{64}
Palitossina	CH_3	OH	CH_3	H	OH	OH	OH
Ostreocina-D	H	H	H	OH	H		
Ostreocina-B	H	H	H	OH	OH		
42-OH-PLTX	CH_3	OH	CH_3	OH	OH		
Ovatossina-a	CH_3	OH	CH_3	OH	H	H	H

Figura 32: Struttura chimica palitossine (PLTXs): PLTX, Ost-B e Ost-D, 42-OHpalitossina e ovatossina-a (modif. EFSA, 2009e; Ciminiello et al.*, 2011, 2012c, 2013).*

La sintomatologia determinata dalle tossine del gruppo PLTX non è ben definita, ma comprende crampi, vertigini, mialgia, debolezza generalizzata, rabdomiolisi, eventualmente accompagnati da febbre, difficoltà respiratorie, sintomi gastroenterici (nausea, vomito, diarrea e dolori addominali) e alterazioni cardiache (aritmie, bradicardia, dolori sternali). La disgregazione muscolare, nei casi gravi, è seguita da insufficienza renale e coagulazione intravascolare disseminata. I decessi sono rari, con morte dopo circa 15 ore, ma il recupero completo richiede comunque diversi mesi (Taniyama *et al*., 2002; Sud *et al*., 2013).

Oltre all'intossicazione per via orale attraverso il consumo di molluschi contaminati, sono segnalati anche casi di avvelenamento da PLTX verificatisi per contatto diretto, attraverso la pelle lesa, in persone che hanno manipolato pesci ornamentali o coralli utilizzati a scopo decorativo negli acquari domestici (Hoffmann *et al*., 2008; Deeds e Schwartz, 2010) e intossicazioni di tipo inalatorio (rinite, tosse, faringite, laringite, congiuntivite, febbre, broncoco-

strizione e dispnea) nelle regioni costiere italiane dove si sono verificate fioriture di *O. ovata* (Gallitelli *et al*., 2005; Brescianini *et al*., 2006; Ciminiello *et al*., 2006a).

Le PLTXs sono composti estremamente tossici, il cui meccanismo d'azione coinvolge principalmente la pompa Na^+/K^+-ATP dipendente. L'interazione di PLTXs con Na^+/K^+-ATPasi induce un cambiamento nella conformazione della proteina che da canale specifico viene convertito in canale cationico non specifico con conseguente afflusso di Na^+ all'interno della cellula e un efflusso extracellulare di K^+, depolarizzazione della membrana e rottura dell'omeostasi ionica nelle cellule eccitabili e non eccitabili (Habermann, 1989; Artigas e Gadsby ,2003, 2004, 2006; Reyes e Gadsby, 2006; Vale e Ares, 2007; Takeuchi *et al*., 2008; Gadsby *et al*, 2009).

Ciò alla fine innesca una serie di effetti secondari: l'accumulo intracellulare di sodio induce il trasporto di ioni calcio nelle cellule mediante scambiatori Na^+/Ca^{2+} e, analogamente, sodio intracellulare è scambiato con protoni extracellulari da scambiatori Na^+/H^+, con diminuzione pH intracellulare (Kockskämper *et al*, 2004; Vale *et al*., 2006; Vale e Ares, 2007).

Come conseguenza dell'azione molecolare di PLTX, le cellule muscolari scheletriche, cardiache e lisce, che sono gli obiettivi principali delle PLTXs tra cellule eccitabili, rispondono con la contrazione indotta sia direttamente, seguendo l'aumento di concentrazione intracellulare di Ca^{2+}, sia indirettamente, attraverso il rilascio di Ca^{2+} indotto da neurotrasmettitori (Kockskämper *et al*., 2004; Franchini *et al*., 2010).

Nelle cellule non eccitabili l'effetto preponderante sembra essere un rigonfiamento delle cellulare mediato dall'ingresso di sodio e acqua, con formazione di vacuoli nel citoplasma,

Figura 33: Cartelli di divieto.

seguiti, a lungo termine, dalla lisi cellulare. Inoltre, l'aumento di $[Ca^{2+}]_i$ sembra giocare un ruolo chiave nella depolimerizzazione dell'actina, facilitando il rigonfiamento, il distacco dal substrato e la lisi cellulare (Ares *et al*., 2005; Louzao *et al*., 2008).

Altro effetto indotto da PLTX è la stimolazione del rilascio di istamina da parte dei mastociti (Chatwal *et al*., 1982) e l'aumento della concentrazione e dell'attività di monociti e macrogi (Crinelli *et al*., 2012)

PLTX ha anche un possibile ruolo nella carcinogenesi, basata sulla constatazione che la ripetuta esposizione cutanea a PLTX ha comportato la promozione tumorale cutanea nel topo attraverso la modulazione del fattore di crescita epidermico, l'attivazione delle proteine chinasi mitogeno-attivate (MAP, ERK1/2 e 5, JNK e p38) e un'alterazione delle vie di trasduzione del segnale intracellulare (*tumor promoter* non-TPA). Al contrario dei promotori cellulari di tipo-TPA, non viene attivata la proteina chinasi di tipo C (Vale e Ares, 2007; Wattenberg, 2007 e 2011; Charlson *et al*., 2009; Fujiki e Suganuma, 2009). La PLTX provoca infine un'attivazione della fosfolipasi A2 (PLA2), un aumento del metabolismo dell'acido arachidonico e la produzione di eicosanoidi in differenti substrati cellulari. L'acido arachidonico, rilasciato dai fosfolipidi di membrana, sarebbe metabolizzato in diverse prostaglandine nell'endotelio e nelle cellule della muscolatura liscia, con conseguente rilascio di noradrenalina e grave vasocostrizione coronarica (Miura *et al*., 2006).

PLTX è una delle sostanze non proteiche più tossiche conosciute. Gli studi tossicologici sono limitati alla sola tossicità acuta di PLTX e Ost-D (che ha una tossicità equipollente a PLTX) e variano a seconda della specie animale e della via di somministrazione.

Coniglio, cane e scimmia risultano altamente sensibili, con DL_{50} rispettivamente di 0,025, 0,033 e 0,078 μg/kg p.v., mentre ratto, cavia e topo presentano una DL_{50} rispettivamente di 0,089, 0,11 e 0,45 μg/kg p.v. Cani e scimmie sembrano morire per arresto cardiaco dovuto a vasocostrizione coronarica. La via orale è meno sensibile: la DL_{50} nei topi alimentati per sonda gastrica o con l'alimentazione è di 510 μg/kg p.v. e >2000 μg/kg p.v., rispettivamente (EFSA, 2009e).

Tossicità acuta e decessi sono stati riportati in focolai umani, ma i dati quantitativi non sono attendibili. La dose acuta di riferimento (ARfD) per via orale è stimata di 0,2 μg/kg di peso corporeo per la somma di PLTX e del suo analogo ostreocina-D.

9. AMNESIC SHELLFISH POISONING (ASP)

Nel 1987, in Canada, è stata descritta per la prima volta una nuova sindrome tossica di origine alimentare, la *Amnesic Shellfish Poisoning* (ASP), o intossicazione da molluschi con perdita della memoria.

Nei pazienti esaminati si riscontrarono, oltre a vomito, diarrea e crampi addominali, sintomi tipici delle intossicazioni più comuni, anche confusione, disorientamento, perdita della memoria, atassia e coma (Wekell, 1990). Gli avvelenamenti, comparsi entro 24-48 ore, furono attribuiti al consumo di molluschi bivalvi *(Mytilus edulis, Mya arenaria)* accumulatori, nell'epatopancreas, di acido domoico (DA), una tossina prodotta dall'alga marina rossa *Chondria armata* e da diatomee appartenenti al genere *Pseudo-nitzschia* (*P. multiseries*, *P. pungens*, *P. australis*, *P. calliantha*, *P. multistriata*, *P. seriata*, *P. delicatissima*, *P. pseudodelicatissima*, *P. fraudulenta*, *Nitzschia bizertensis*) (figura 34) (Besiktepe *et al*., 2008, Gerssner *et al*., 2010; Tasker *et al*., 2011; Bouchoicha Smida *et al*., 2014).

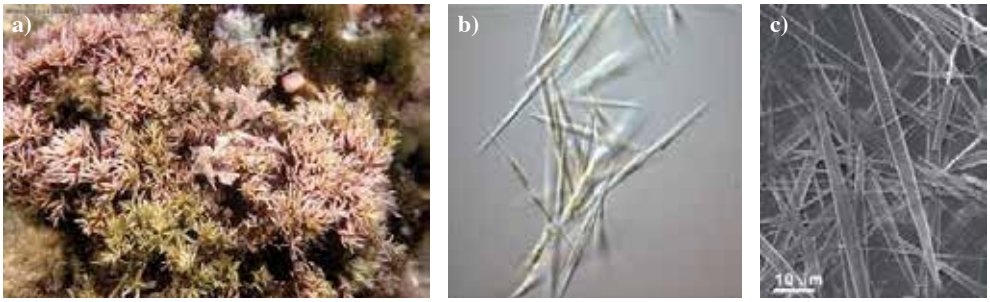


Figura 34: Chondria armata *(a) e* Pseudo-nitzschia multiseries *(b) (c)*.

DA, un tempo usato come antielmintico e insetticida in Giappone, è stato rilevato successivamente anche in alghe e molluschi bivalvi di Stati Uniti, Australia, Nuova Zelanda e in diversi Paesi Europei ed è segnalato come responsabile di mortalità in uccelli e mammiferi marini (leoni marini, foche e cetacei) (FAO, 2004; Goldstein *et al*., 2008; Fire *et al*., 2009; Lefebvre *et al*., 2010b; Ujevic *et al*., 2010).

Fin dal 1961, sono documentate le alterazioni del comportamento, quali volo errante ed aggressività verso le persone, che periodicamente colpiscono gli uccelli di Santa Cruz in California, tanto che sono state riportate nel famoso film di Alfred Hitchcock "*The Birds*" (figura 35).

*Figura 35: Immagini da "*The Birds*" di Alfred Hitchcock (1963).*

Chimicamente viene definito come un amminoacido ciclico idrosolubile, con tre gruppi acidi carbossilici, responsabili della sua solubilità in acqua e della sua relativamente elevata polarità (figura 36), con conformazione correlata all'acido cainico (prodotto dalla rodoficea *Diginea simplex)* e all'acido glutammico (Quilliam *et al*., 2001). Si conoscono diverse forme isomere di DA: acido epi-domoico (epi-DA) e acidi isodomoici A-H (iso-DA A-H) (figura

37 e 38) (EFSA, 2009c).

DA è stabile al calore, sebbene i normali procedimenti di cottura casalinga (bollitura e cottura al vapore) possano ridurne la quantità nella carne di mollusco per parziale rilascio delle tossine nei liquidi di cottura. Le cappesante rappresentano i molluschi in cui si rinvengono le più alte concentrazioni di tossina e in esse può verificarsi la ridistribuzione dell'DA dall'epatopancreas ai tessuti molli e alle gonadi (McCarron *et al*., 2007; Mafra *et al*., 2010; Picot *et al*., 2012).

Dopo somministrazione orale negli animali da laboratorio, DA mostra un assorbimento sistemico modesto (5-10%), penetra scarsamente la barriera emato-encefalica e viene rapidamente escreto, immodificato, per via renale. Di conseguenza, qualsiasi condizione che alteri l'integrità della barriera emato-encefalica o che produca un deterioramento della funzione renale, conferisce un ulteriore rischio di intossicazione (FAO/IOC/OMS, 2004).

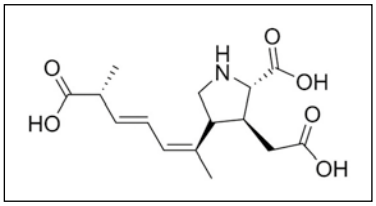


Figura 36: Struttura chimica dell'acido domoico (modificata da Gerssen et al.*, 2010).*

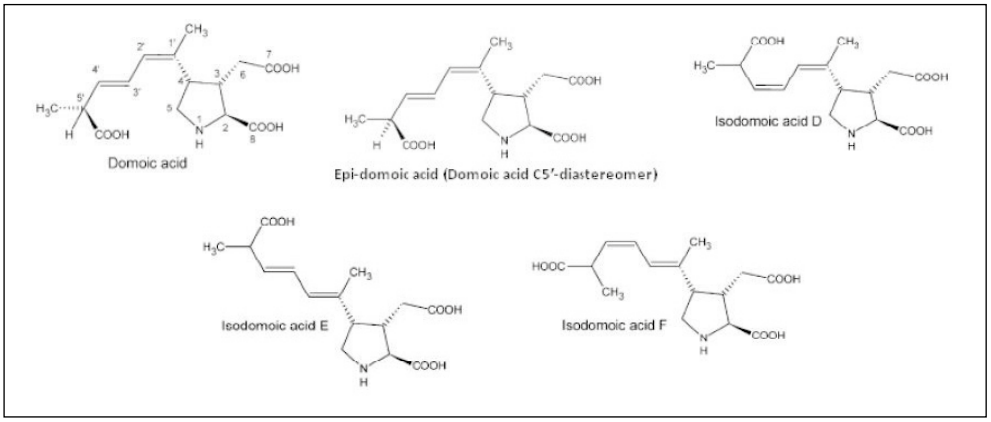


Figura 37: Isodorme DA isolate in Diatomee.

DA agisce prevalentemente a livello delle sinapsi interneuroniche corticali del SNC, soprattutto nell'ippocampo (particolarmente le regioni CA1, CA3 e giro dentato) e, legandosi ai recettori del glutammato, provoca una continua stimolazione dei neuroni, con sviluppo di una sintomatologia neurotossico-eccitativa, il cui sintomo principale è rappresentato dalla perdita permanente della memoria (Quilliam e Wright,1989; Bruno *et al.,* 1991b; Pulido, 2008).

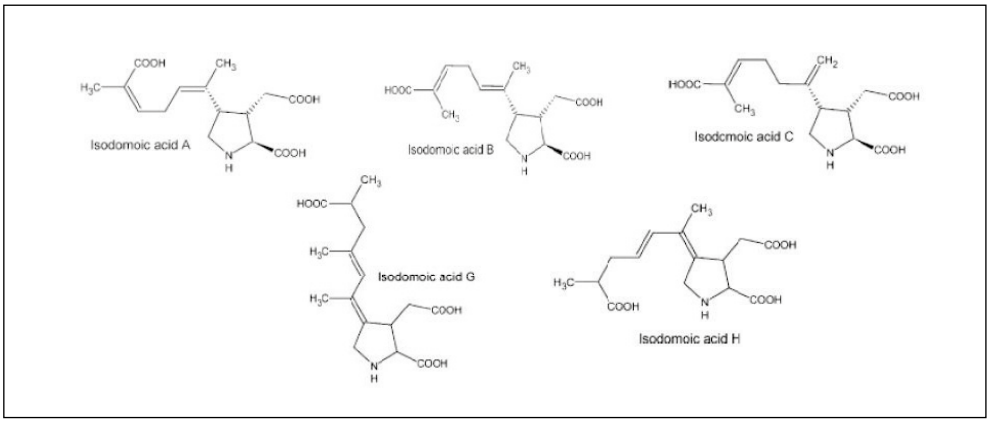


Figura 38: Isoforme di DA isolate in Chondria armata.

La gravità degli effetti è direttamente correlata sia alla quantità di tossina ingerita, sia al numero dei recettori del glutammato (che aumentano con l'età), sia alla funzionalità renale dei soggetti colpiti (alterazione della farmacocinetica della tossina). Pertanto i sintomi più gravi, vale a dire coma e morte, si riscontrano nei pazienti più anziani (Bruno *et al.,* 1991b). Vi è anche evidenza che DA attraversa la placenta e viene rilevato nel latte, aprendo la possibilità di rischio fetale e neonatale, in soggetti in cui, tra l'altro, la barriera ematoencefalica è più immatura (Pulido, 2008; Goldstein *et al*., 2009; Costa *et al*., 2010, Tasker *et al*., 2011).

DA si comporta da potente agonista neuronale del glutammato, neurotrasmettitore eccitatorio cerebrale (Biscoe *et al.,* 1975; Lerma *et al*., 2001) ed è riconosciuto come agonista dei recettori ionotropici glutammatergici (iGlu) (figura 39) e soprattutto dei recettori definiti non-N-metil-D-aspartato recettori del glutammato (non-NMDA), ossia l'acido kainico (KA), per cui manifesta alta affinità (soprattutto subtipi GluR5, GluR6 e GluR7 e KA1/KA2), ma anche per l'α-ammino-3-idrossi-5-metil-ossazol-4-propionato (AMPA) (Ramsdell, 2007; Swanson e Sakai, 2009).

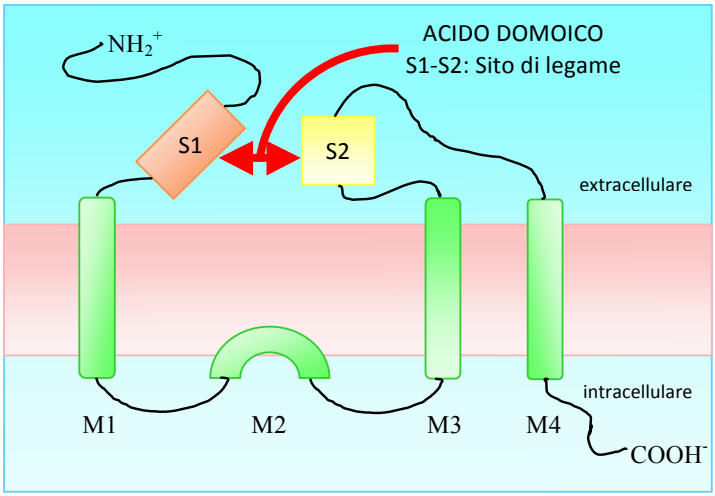


Figura 39: Schema dei recettori glutammatergici.

L'azione tossica risulta altresì incrementata tramite inibizione del canale di desensibilizzazione rapida (Ramsdell, 2007; Pulido, 2008; Doucette e Tasker, 2008).

I iGlu sono responsabili della trasmissione sinaptica eccitatoria e si trovano in diverse regioni del SNC nei terminali neuronali sia pre- che post-sinaptici. Essi rappresentano dei recettori-canali ionici transmembrana ligando-dipendenti e il legame con DA determina l'apertura del canale. In particolare, quando DA si lega ai canali AMPA , si verifica un aumento dell'afflusso di ioni Na^+ nella cellula, mentre un afflusso di ioni Na^+ e Ca^{2+} extracellulari nella cellula è indotto dal legame di DA con i recettori del kainato (figura 40) (Lerma *et al*., 2001).

Recettori del glutammato si trovano espressi anche nei tessuti periferici e il legame diretto della tossina a questi recettori potrebbe contribuire ulteriormente al determinismo di alcuni degli effetti periferici dell'DA (EFSA, 2009c).

Le alterazioni neurologiche e comportamentali, così come alcuni effetti gastrointestinali (vomito), cardiovascolari (alterazioni cardiache) e ormonali (aumento ormoni tiroidei), sono dovute quindi al danno neuronale indotto dalla tossina per eccesso prolungato di calcio derivato dall'attivazione duratura dei recettori del glutammato.

Tuttavia, altri canali ionici e recettori del glutammato sembrano partecipare agli effetti di DA nei sistemi neuronali, ma i loro contributi individuali non sono stati completamente definiti . In particolare, l'afflusso di Ca^{2+} potrebbe avvenire anche attraverso i canali del Ca^{2+} voltaggio-dipendenti, e scambiatori Na^+/Ca^{2+}. In entrambi i casi, l'effetto comporterebbe un incremento dell'afflusso di Na^+ attraverso i recettori AMPA e depolarizzazione della membrana. Inoltre l'aumento delle concentrazioni intracellulari di Ca^{2+} si verificherebbe anche per azione dei recettori NMDA, attivati dal glutammato rilasciato dalle sinapsi in conseguenza del legame presinaptico di DA ai recettori KA (figura 40) (Berman *et al*., 2002; Pulido, 2008; Lefebvre e Robertson, 2010).

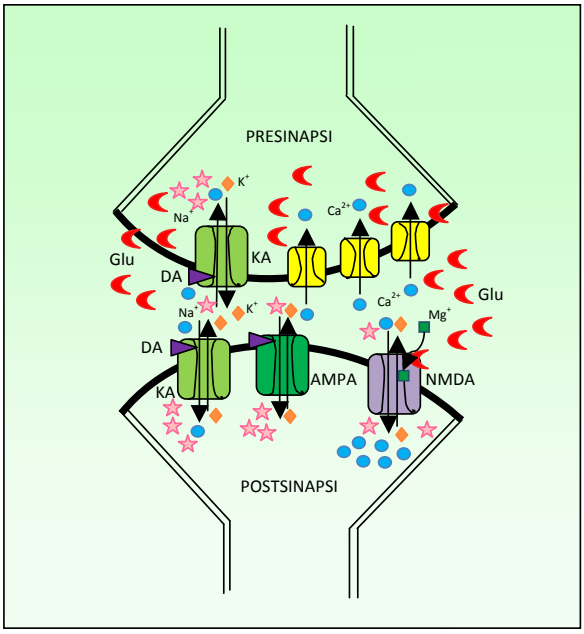


Figura 40: Schema dell'azione di DA pre- e post-sinaptica.

Prove sperimentali rilevano inoltre che la somministrazione di DA induce, attraverso l'attivazione dei recettori KA, decremento nei livelli di acido γ-amminobutirrico (GABA), principale neurotrasmettitore inibitorio cerebrale nei mammiferi, e ciò suggerisce che l'inibizione del GABA possa essere implicata nella neurotossicità indotta DA (Tasker *et al*., 2011).

La conseguenza di tutti questi effetti è un aumento complessivo e prolungato della concentrazione di Ca^{2+} intracellulare, che si traduce in un fallimento dei meccanismi cellulari di regolazione dell'omeostasi del calcio e l'attivazione di diversi percorsi enzimatici a cascata (danni alla fosforilazione ossidativa con diminuzione della funzionalità e della produzione di energia da parte dei mitocondri, attivazione di fosfolipasi, proteina chinasi C, proteasi, proteine fosfatasi, ossido-nitrico sintasi e generazione di radicali liberi) che portano a rigonfiamento cellulare prima e, successivamente, a neurotossicità palese (Ramsdell, 2007; Pulido, 2008; Doucette e Tasker, 2008; Giordano *et al*., 2008).

Il gruppo di esperti scientifici EFSA ha stabilito un LOAEL di 0,9 mg/kg p.v. e un NOAEL di 0,3 mg/kg di p.v.. Da questo valore, applicando un fattore 10 che considera la variabilità individuale, si è calcolata una dose acuta di riferimento (ARfD) pari a 30 μg di DA/kg di peso corporeo (1,8 mg di DA per un adulto del peso di 60 kg). Poiché l'DA può essere convertito in epi-AD durante la conservazione, l'ARfD si applica alla somma di DA e epi-DA (tabella 3) (EFSA, 2009; Kumar *et al*., 2009).

L'Unione Europea ha stabilito un limite di 20 mg di DA/kg di carne di mollusco (8 mg di AD in una singola porzione costituita da 400 g di carne di mollusco). Tale valore supera di circa quattro volte l'ARfD. Per non superare l'ARfD di 30 μg/kg di peso corporeo, un adulto di 60 kg non dovrebbe superare, alimentandosi con una porzione di 400 g di molluschi, gli 1,8 mg di DA, che corrispondono a 4,5 mg di DA/kg di carne di mollusco (EFSA, 2009c).

Recentemente è stato evidenziato che DA è responsabile di ricorrenti e spontanee crisi epilettiche nell'uomo e nei leoni marini, settimane o mesi dopo l'esposizione alle tossine. Pertanto lo studio di DA e dei composti agonisti dei recettori del kainato viene attualmente effettuato anche per lo sviluppo di nuovi farmaci per il trattamento delle epilessie del lobo temporale mediale umano (Swanson e Sakai, 2009; Ramsdell e Gulland, 2014).

10. CIGUATERA FISH POISONING (CFP)

Ciguatera Fish Poisoning (CFP), dal nome di un gasteropode tossico (*Livona pica*) comunemente chiamato "*cigua*" nell'area caraibica, è un'intossicazione alimentare caratterizzata da sintomatologia nervosa (intorpidimento e formicolii alle estremità e nella regione orale, pruriti generalizzati, termodisestesia, antralgia, mialgia, disfagia, atassia e paralisi, come pure fenomeni neuropsichiatrici quali ansia, depressione, allucinazioni, vertigini e occasionale perdita della memoria), disturbi gastroenterici (nausea, vomito, diarrea e dolori addominali) e cardiovascolari (bradicardia e ipotensione), provocata dal consumo di pesci che vivono in mari tropicali e subtropicali (Frenette *et al.,* 1988; Kodama e Hokama, 1989; Lehane e Lewis, 2000). L'inversione termo-dolorifera associata a temperatura elevata sono ritenuti sintomi patognomonici di CFP (Friedman *et al*., 2008).

L'intossicazione si manifesta, a seconda della gravità dei sintomi, da 30 minuti a 24-48 ore (generalmente 12-16 ore) dall'ingestione di pesci contaminati e solo occasionalmente può verificarsi la morte (0,5% dei casi) per insufficienza cardio-respiratoria. La stanchezza profonda che colpisce il 90% dei soggetti e altri sintomi quali parestesie alle estremità, prurito, mal di testa e depressione possono persistere per mesi o anni. (Friedman *et al*., 2008).

L'accumulo delle tossine nel tessuto adiposo determina inoltre una sensibilizzazione a successivi consumi di pesce, anche non contaminato, e di altri alimenti allergizzanti (arachidi, alcool e caffeina), con conseguente sviluppo di sintomatologia neurologica anche dopo

mesi dal consumo di pesci tossici (Flouw *et al*., 2001; Bienfang *et al*., 2008; EFSA, 2010a). In aggiunta, le tossine attraversano la placenta, vengono escrete nel latte e nello sperma, con successivo sviluppo di effetti tossici nei neonati e in pazienti che pur non avendo consumato pesce hanno avuto rapporti sessuali non protetti (EFSA, 2004).

Allo stato attuale, rappresenta l'intossicazione alimentare marina più comune nel mondo e un numero variabile tra 10.000-50.000 persone ogni anno sviluppano la sintomatologia (EFSA, 2010a).

CFP è associato principalmente al consumo di grandi pesci predatori che si alimentino di piccoli pesci erbivori, che a loro volta si siano contaminati con biotossine elaborate da dinoflagellate bentoniche appartenenti al genere *Gambierdiscus* spp. (*G. toxicus*, *G. pacificus*, *G australes*, *G. polynesiesis*, *G. yasumotoi*, *G. belizeanus*) (figura 41), la cui presenza è elevata e diffusa lungo le barriere coralline (figura 42). Altre alghe *(Prorocentrum* spp., *Pyrodinium* spp., *Gymnodinium* spp., *Gonyaulax polyedra, Coolia monotis, Ostreopsis* spp., *Thecadinium* spp., *Amphidinium* spp.) e cianobatteri (*Hydrocoleum* spp.) sono stati segnalati, seppur raramente, come produttori delle biotossine, come pure alcuni batteri gram negativi isolati da pesci contaminati (Tindall *et al*., 1984; Sierra-Beltran *et al*., 1998; Chateaux-Degat, 2003; Laurent *et al*., 2008; Chinain *et al*., 2010; Dickey e Plakas, 2010). Nessun fenomeno di fioritura algale è associato a questo tipo di intossicazione (FAO, 2004).

Figura 41: Gambierdiscus toxicus.

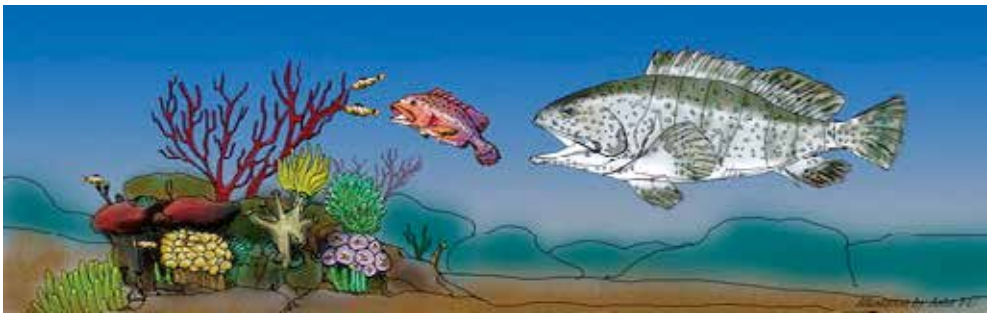
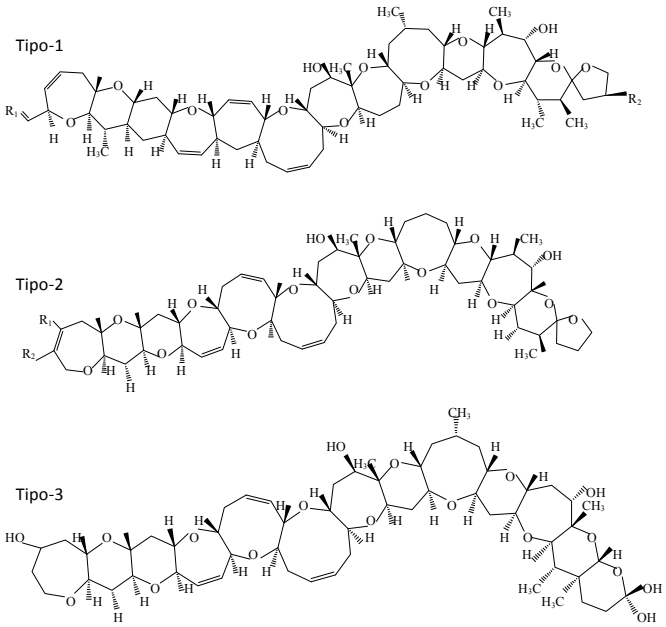


Figura 42: Catena alimentare associata all'intossicazione da ciguatossine.

I pesci più grandi e più vecchi risultano più pericolosi, accumulando una grande quantità di tossina, che si concentra nelle carni e soprattutto nei visceri (fegato e gonadi) (Ade *et al*., 2003).

Sono conosciute almeno 400 specie di pesci responsabili di ciguatera, molti dei quali appartengono alle famiglie *Muraenidae* (murene), *Serranidae* (cernie), *Sphyraenidae* (barracuda), *Scombridae* (sgombri), *Caragnidae* (lucci), *Acanthuridae* (pesci chirurghi), *Scaridae* (pesci pappagallo), *Lutjanidae* ("*snappers*"), *Carcharchinidae* (squali), *Labridae* ("*wrasses*") e *Lenthrinidae* (pesci spazzini) (Withers, 1982; Lewis e Endean, 1983; Lewis e Endean, 1984; Fouw *et al*., 2001).

Le tossine responsabili di CFP sono composti polieterici ciclici, liposolubili e stabili al calore denominate ciguatossine (CTXs – figura 43) e gambiertossine (GB-4A e GB-4B note come CTX-4A e CTX-4B). *Gambierdiscus* spp. produce anche altri composti bioattivi: gambierolo, acidi gambierici e maitotossina (MTX – figura 44) (Nukima *et al*. 1984; Ragelis, 1984; Holmes *et al*., 1990; Lewis *et al*., 1991). Quest'ultima ha un peso molecolare di 3422 Da (il più grande di tutti i prodotti naturali) ed è fra le più potenti tossine marine, con una DL_{50} per il topo i.p. pari a 50 ng/kg (Login *et al,* 1987).



Tossina	Tipo	R_1	R_2	TEF*	DL_{50}	Fonte
P-CTX-1	1	$CH_2OHCHOH$	OH	1	0,25	Pesci carnivori
P-CTX-2	1	$CH_2OHCHOH$	H	0.3	2,30	Pesci carnivori
P-CTX-3	1	$CH_2OHCHOH$	H	0.3	0,90	Pesci carnivori
P-CTX-4A	1	CH_2=CH	H	0.1	2,00	*G. toxicus*, *G. polynesiensis*
P-CTX-4B	1	CH_2=CH	H	0.05	4,00	*G. toxicus*, *G. polynesiensis*, pesci erbivori
P-CTX-2A1	2	OH	OH	0.1	ND	Pesci carnivori
P-CTX-3C	2	H	H	0.2	ND	*G. toxicus*, *G. polynesiensis*, pesci erbivori
C-CTX-1	3	-	-	0.1	3,60	Pesci carnivori

*TEF: Fattore Tossicità Equivalente; DL_{50}: mg/kg i.p.nel topo

Figura 43: Struttura chimica delle ciguatossine (modificata da Lewis, 2001; Wang, 2008).

Tuttavia MTX non sembra rivestire un ruolo importante nella CFP a causa della bassa capacità di accumulo nelle carni di pesce e della scarsa efficacia se somministrata oralmente. Gambierolo viene considerato un bloccante selettivo dei canali del potassio voltaggio-dipendenti, ed è probabilmente implicato nella sintomatologia da CFP, mentre gli acidi gambierici, isolati nelle colture di *G. toxicus*, sono ritenuti dei potenti antifungini (Sasaki *et al.*, 2007; Caillaud *et al.*, 2010).

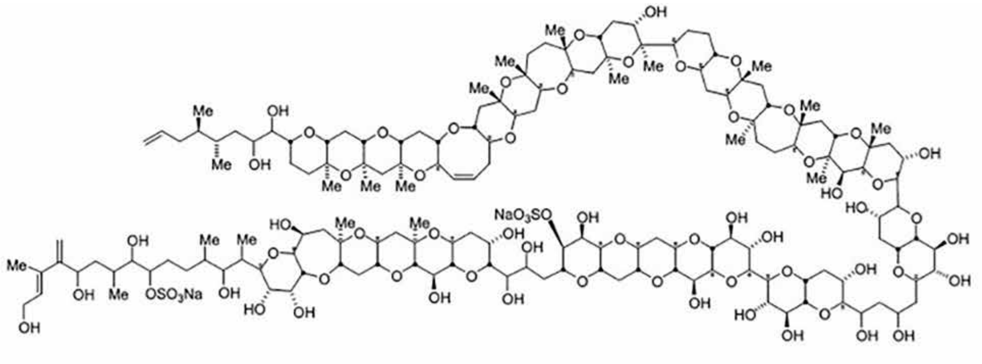


Figura 44: Struttura chimica di maitossina (modificata da Satake, 2007).

Sono conosciuti più di venti analoghi CTX ed essi si ritrovano come tali nei pesci carnivori, mentre nelle colture di *G. toxicus* e nei pesci erbivori si rinvengono i loro precursori, le gambiertossine (CTX-1 deriva da CTX-4B) (Homes *et al.*, 1991).

Epidemie di CFP sono documentate da secoli e i primi casi si fanno risalire ad episodi descritti nel 1606 nelle isole Vanuatu, nel sud del Pacifico. Attualmente CFP sono segnalate prevalentemente nell'Oceano Pacifico (P), nei Caraibi (C) e nell'Oceano Indiano (I) e vengono classificate, in base alla provenienza, in P-C-I-CTXs. Variazioni significative nel tipo di tossine prodotte si verificano nelle diverse specie di *Gambierdiscus* (particolarmente tossici sono alcuni ceppi di *G. toxicus*) e ciò si riflette in una differente tossicità dei pesci provenienti dalle diverse regioni (più tossici se provenienti dall'Oceano Pacifico contenenti CTX-1). La differente derivazione determina anche una diversa sintomatologia, prevalendo gli effetti neurologici nell'area del Pacifico, i danni gastroenterici nell'area caraibica e le alterazioni psichiatriche nei casi di CFP rilevati nell'Oceano Indiano. Recentemente le CTXs sono state identificate in pesci di provenienza europea (Friedman *et al.*, 2008; Dickey e Plakas, 2010; EFSA, 2010a).

CTXs e MTX differiscono tra loro per caratteristiche chimiche, essendo liposolubili le ciguatossine e idrosolubile la maitotossina, e per i meccanismi d'azione (Dickey *et al.*, 1984; Miller *et al.*, 1984).

Le ciguatossine agiscono, analogamente alle brevetossine, a livello dei canali del sodio voltaggio-dipendenti (sito 5 della α-subunità) (figura 9) delle membrane eccitabili dei nervi periferici e dei muscoli scheletrici, determinando un aumento della permeabilità allo ione sodio, con relativa iperpolarizzazione (Legrand e Bagnis, 1984a; Benoit *et al.*, 1986). Esse risultano più potenti delle BTXs in quanto presentano una maggiore affinità per il canale del Na^+.

L'aumento di Na^+ è responsabile dell'attivazione della pompa Ca^{2+}/Na^+ e del rilascio di Ca^{2+} dai depositi interni, con aumento della concentrazione cellulare intracellulare Ca^{2+}. Ciò determina, da un lato, aumento delle contrazioni a livello della muscolatura cardiaca e intestinale, e dall'altro, alterazione dell'omeostasi ionica cellulare con secrezione di liquidi, da cui risulta la specifica sintomatologia cardiovascolare e gastroenterica (Nguyen-Hu *et al.*, 2010; Wang, 2010).

Oltre ai canali del sodio voltaggio-dipendenti, sembra che le CTXs agiscano anche bloccando i canali del potassio voltaggio-dipendenti, anch'essi coinvolti nella eccitabilità di membrana (Sasaki *et al.*, 2007).

Tuttavia sembra che non tutti i sintomi determinati dalle CTX siano dovuti all'interazione con i canali del sodio. Le CTXs determinano infatti liberazione di acetilcolina e di catecolamine, responsabili degli effetti inotropici e cronotropici bifasici che si verificano a livello dei muscoli lisci e cardiaco (Legrand e Bagnis, 1984b; Terao *et al.,* 1991).

La sindrome di stanchezza cronica è stata invece correlata ad un'alta produzione di ossido nitrico (NO), molecola che provoca il rilassamento della muscolatura liscia dei vasi sanguigni e del cuore, mediata dall'ossido-nitrico-sintetasi (NOS), che viene attivato dall'apertura dei canali del Ca^{2+} di tipo L. E' stato anche proposto che la prolungata attività dei canali del Na^{+} voltaggio-dipendenti stimoli l'N-metil-D-aspartato (NMDA), con conseguente aumento dell'afflusso di ioni Ca^{2+}, seguito da attivazione del NOS e aumento di NO. NO, a sua volta, interagisce con il meccanismo dello stress ossidativo, con conseguente stimolazione dell'espressione del gene iNOS, che provoca un ulteriore aumento di NO (Dickey e Plakas, 2010; Cailland *et al*., 2010).

Per quanto riguarda la maitotossina, il suo effetto consiste in un aumento intracellulare di ione calcio, realizzato con meccanismi molteplici. Essa, infatti, agisce primariamente attivando i canali di comunicazione non selettivi (NSCCs) voltaggio indipendenti, permeabili principalmente al Na^{+} al e K^{+}, ma anche al Ca^{2+} e ad altri cationi bivalenti. Agisce altresì attivando sia i canali del calcio specifici voltaggio-dipendenti, sia aumentando la permeabilità al sodio, il quale, a sua volta, attiva la pompa calcio-sodio, sia, infine, creando nuovi canali per il calcio, comportandosi come ionoforo oppure trasformando alcune proteine di membrana in pori (Login *et al.,* 1987; Sladeczek *et al.,* 1988; Faivre *et al.,* 1990; Murata *et al.,* 1991). Non si verifica tuttavia mobilizzazione di ioni Ca^{2+} dalle riserve intracellulari (de la Rosa *et al*., 2007; Sinkins *et al*., 2009).

Gli effetti sono svariati: contrazione calcio-dipendente dei muscoli lisci, scheletrici e cardiaco; necrosi delle cellule cardiache per inibizione della fosfatasi ossidativa mitocondriale, con conseguente carenza di ATP; necrosi della mucosa gastrica; atrofia e necrosi dei tessuti linfoidi; apoptosi per attivazione di diverse proteine chinasi, fosfolipasi C e fosfolipasi A2, liberazione di numerosi ormoni, enzimi e secreti (Berta *et al.,* 1988; Terao *et al*., 1988; Terao *et al*., 1989; Bruno e Volterra, 1990; FAO, 2004; Tartaglione, 2005; de la Rosa *et al*., 2007; Wang, 2010; Lu *et al*., 2013).

L'incidenza di ciguatera è in aumento e ciò è dovuto sia all'incremento del commercio internazionale di prodotti della pesca, ma anche all'espansione geografica delle specie algali tossiche. Attualmente sono stati rilevati casi di intossicazione associati a pesci contaminati e specie di *Gambierdiscus* tossiche nelle isole Canarie, nel Golfo del Messico, nell'Oceano Atlantico e nel Mediterraneo Orientale (Dickey e Plankas, 2010; Skinner *et al*., 2011).

Le CTX sono delle tossine molto potenti con una DL_{50} nei topi (i.p.) pari a 0,25, 2,3 e 0,9 μg/kg per P-CTX-1, P-CTX-2 e P-CTX-3 rispettivamente. Il grado di ossidazione è correlato positivamente con la potenza e la 54-deossiCTX (P-CTX-3) è stata descritta come più potente di P-CTX-1. Le P-CTX sono più tossiche delle corrispondenti tossine C-CTX (3,6 e 1,0 μg/kg per C-CTX-1 e C-CTX-2) e delle tossine I-CTXs (circa 5 μg/kg) (Caillaud *et al*., 2010).

Attualmente l'Unione Europea non ha stabilito limiti normativi per le tossine del gruppo CTX, ma il Regolamento CE 853/2004 (allegato III, sezione VIII, capitolo V, punto E/2) e il Reg. 1021/2008 stabiliscono che non possano essere immessi sul mercato prodotto della pesca contenenti CTXs.

A causa dei limitati dati tossicologici, non è stata indicata né una dose giornaliera tollerabile (TDI), né una dose acuta di riferimento (ARfD). Considerando che diverse pubblicazioni affermano che i casi di CFP nel Pacifico si sono verificati a seguito del consumo di pesce contenente 0,1-5 μg P-CTX-1/kg di carne di pesce e applicando un fattore di incertezza pari a 10, gli esperti EFSA hanno indicato con 0,01 e 0,1 μg equivalenti/kg carne di pesce la concentrazione di tossine P-CTX-1 e C-CTX-1 che non dovrebbero esercitare effetti tossici nei soggetti sensibili (EFSA, 2010a).

11. TETRODOTOXIN FISH POISONIG (TFP)

L'intossicazione da tetrodontidi (TFP) differisce dalle altre intossicazioni finora descritte in quanto le tossine coinvolte, tetrodotossina (TTX) e suoi derivati, non sono prodotte da alghe e l'esposizione dell'uomo è limitata al consumo di determinate specie di pesci.

Nota da lungo tempo, riportata nella farmacopea egiziana (2.500 a.C.) e nel "Diario di Bordo" del Capitano James Cook (1770), principio attivo della "polvere di zombificazione" utilizzata dagli stregoni di Haiti per i riti *vudù* (figura 45), l'intossicazione da tetrodontidi costituisce attualmente un grave problema in Giappone, dove ogni anno si registrano numerosi casi di morte per l'ingestione di pesci palla di cui si apprezzano sia le carni, ritenute particolarmente saporite, che i leggeri effetti anestetizzanti orali, dovuti al consumo dei visceri (fegato).

Figura 45: Riti vudù *degli stregoni di Haiti che utilizzano "polvere di zombificazione" che contiene tetrodotossina come principio attivo.*

TFP si riteneva limitata al Giappone, Taiwan, Bangladesh e alle regioni del sud-est asiatico, ma recenti studi hanno dimostrato che la tossina è diffusa nell'Oceano Pacifico e nel Mar Mediterraneo. Ciò si è verificato a causa dell'aumento di temperatura dell'acqua di tutto il mondo, che ha favorito migrazioni naturali di diverse specie ittiche, e al trasporto di microrganismi con le acque di zavorra delle navi. Nel caso del Mar Mediterraneo si ritengono importanti le migrazioni naturali di molti pesci attraverso il canale di Suez (Bane *et al*., 2014).

Generalmente l'uomo assume l'intossicazione attraverso il consumo di pesci appartenenti alle famiglie *Tetraodontidae* (*fugu* o pesci palla), *Diodontidae* (pesci istrice) e *Molidae* (pesci luna), che divengono tossici in seguito all'accumulo delle tossine, soprattutto nei visceri (gonadi, fegato, intestino) e nella cute (figura 46) (Mosher e Fuhrman, 1984; Nakamura *et al*., 1984; Hwang e Noguchi, 2007).

I pesci risultano resistenti all'azione tossica delle TTX (Soong e Venkatesh, 2006) e le specie marine accumulano tossine prevalentemente nelle ovaie e nel fegato, mentre nelle specie d'acqua dolce o salmastra sono concentrate soprattutto sulla cute (Noguchi e Arakawa, 2008). Si ritiene che le tossine TTX vengano utilizzate dal pesce come arma di difesa biologica per la protezione delle uova o delle larve dai predatori, come arma offensiva (veleno) o, all'interno e tra le specie, come segnale di comunicazione circa la posizione dei compagni, potenziali fonti di cibo, situazioni di pericolo e anche come ferormone attrattivo per il pesce maschio durante la deposizione delle uova (Ikeda *et al*., 2010; Williams e Caldwell, 2009; Williams, 2010; Williams *et al*., 2010, 2011; Chulanetra *et al*., 2011; Itoi *et al*., 2014).

Più recentemente TTX è stata isolata anche nei pesci appartenenti alla famiglia *Gobiidae* (*Gobius criniger)* e *Spheroidae* (*Spheroides maculatus)*, nonché da numerosi altri organismi acquatici e terrestri, di acque marine, salmastre e dolci, tra i quali cefalopodi (*Hapalochlae-*

na maculosa), echinodermi (*Astropectem polyacanthus*), gasteropodi (*Babylonia Japonicam, Charonia sauliae*), crostacei (*Zosimus aeneus*), anfibi (*Atelopus* spp., *Taricha tolosa*) e membri delle *Salamandridae* (salamandre), e non si può escludere che anch'essi possano costituire fonti di intossicazione (Mosher e Fuhrman, 1984; Kim *et al*., 1975; Sheumack *et al*., 1978, Llewellyn et Edean, 1989; Soong e Venkatesh, 2006; Deeds *et al*., 2008b; Hanifin, 2010; Ferreira *et al*.; 2011; Wood *et al*., 2012).

Figura 46: Tetraodontidae (a), Diodontidae (b) e Molidae (c).

Risulta ormai accertato che la tetrodossina (TTX) e i suoi analoghi vengono prodotti da batteri marini tra i quali *Pseudoalteromonas tetraodonis, Vibrio alginoliticus, V. damsela*, *Shewanella alga*, *S. putrefaciens*, *Alteromonas tetraodonis* e alcuni ceppi di *Pseudomonas*, *Staphylococcus*, *Bacillus, Micrococcus*, *Aeromonas*, *Actinomyces*, *Serratia, Actinetobacter*, *Alcaligenes*, *Flavobacterium* e *Microbacterium* (Simidu *et al*., 1987; Yoshikama-Ebesu *et al*., 2001; Kono *et al*., 2008; Yu *et al*., 2011; Pratheepa e Vasconcelos, 2013; Bane *et al*., 2014).

Anche se alcuni ricercatori ritengono che la TTX degli anfibi sia endogena, risulta accertato che essa viene accumulata nei pesci attraverso la catena alimentare marina: la tossina rilasciata dai batteri, viene adsorbita o precipita sul *plancton* e poi assunta da piccoli gasteropodi, crostacei, stelle marine, molluschi e platelminti, i quali, a loro volta, ingeriti da pesci o grossi gasteropodi, ne trasmettono i composti tossici all'uomo (figura 47) (Huss *et al*., 2004).

Un'altra via di accumulo nei pesci potrebbe comprendere fenomeni di parassitismo/simbiosi tra specie batteriche e animali marini (Bane *et al*., 2014) (figura 47). Pesci palla diventano infatti non tossici se alimentati con diete prive di TTX e in ambienti indenni da batteri (Noguchi e Arakawa, 2008).

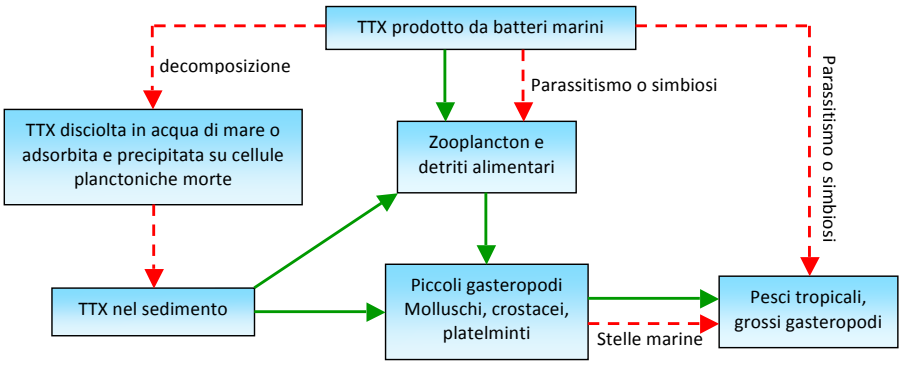


Figura 47: Meccanismo di accumulo di TTX negli animali marini
(→ catena alimentare; - - → parassitismo/simbiosi; decomposizione)

TTX e suoi analoghi sono dei composti altamente tossici (tossicità 100 volte superiore al cianuro di potassio) e la DL_{50} nell'uomo è stimata in 2 mg per un soggetto di 75 kg p.v., mentre la dose minima necessaria per causare sintomi (LOAEL) è fissata a 0,2 mg (Yoshikawa-Ebesu *et al.,* 2001).

Sono conosciuti circa 30 analoghi TTX, chimicamente definiti come derivati della chinazolina (Schantz, 1973; Asakawa *et al.*, 2012), idrosolubili e termostabili (figura 48). Pur presentando una struttura chimica completamente differente dalla saxitossina, ne condividono il meccanismo d'azione, rappresentato da un blocco selettivo dei canali del sodio voltaggio-dipendenti (sito 1, subunità α) presenti a livello del SNC, dei miociti e di alcune regioni del tessuto cardiaco, con conseguente mancata generazione e propagazione dell'impulso nervoso (figura 9) (Doyle *et al.,* 1982; Lee e Ruben, 2008; Zimmer, 2010; Chen e Chung, 2014).

Il gruppo guanidinico, carico positivamente, risulta essenziale nel meccanismo d'azione, essendo il sito che interagisce elettrostaticamente con il gruppo carbossilico, carico negativamente, disposto all'ingresso del canale del Na^+ e sul versante extracellulare della membrana plasmatica. Al contrario, la permeabilità degli ioni K^+ non subisce variazioni (Blair e Bean, 2002; Farmer *et al.*; 2008; Lee e Ruben, 2008; Narahashi, 2008; Medvedeva *et al.*, 2009; Fozzard e Lipkind, 2010; Rocher *et al.*, 2011; Nieto *et al.*, 2012).

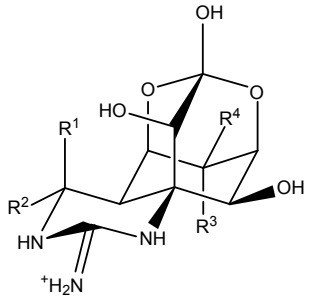
La sintomatologia clinica nell'uomo insorge da 20 minuti a 3 ore dall'ingestione del pesce tossico e risulta analoga a quella descritta per la PSP, evidenziandosi perciò parestesie (intorpidimento e formicolii delle labbra e della lingua e alle estremità), sensazione di leggerezza e flottazione, mal di testa, disturbi gastroenterici e cardiovascolari che possono progredire in debolezza muscolare, paralisi flaccida, bradicardia e ipotensione e, in casi gravi, morte per insufficienza respiratoria e/o cardiovascolare (Zimmer, 2010; Bane *et al.*, 2014).

A differenza dell'intossicazione da saxitossina, tuttavia, nell'avvelenamento da tetrodontidi si manifestano anche ipotensione, ipotermia e vomito, che raramente si evidenziano in corso di PSP. Inoltre, l'avvelenamento da tetrodontidi ha un andamento più sporadico (circa 200 casi ogni anno) e conseguenze più gravi, con letalità del 60%. I pazienti muoiono dopo 4-6 ore per paralisi generalizzata, ma pienamente coscienti e lucidi (OMS, 1986, Sobel e Painter, 2005).

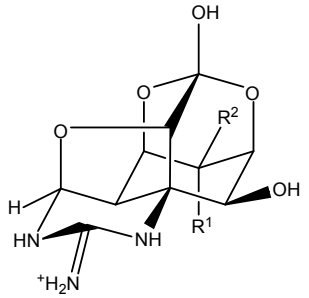
TTX e analoghi non sono regolamentati nell'Unione Europea, ma l'importazione di pesci *Tetraodontidae* o prodotti da essi derivati, non è permessa (Reg. CE 853/2004, allegato III, sezione VIII, capitolo V, punto E/1).

Poiché questo avvelenamento risulta essenzialmente legato a relativamente poche specie ittiche ben conosciute, misure di prevenzione possono essere attuate attraverso il controllo delle importazioni (Cohen *et al.*, 2009). Ciò, comunque, non ha impedito che nel nostro Paese, nel 1977, si verificassero dei casi di intossicazione, di cui uno mortale, dovuti al consumo di pesci luna congelati, importati e commercializzati, sotto falsa etichettatura, come coda di rospo *(Lophius pescatorius)* (Sebastio, 1980; Guandalini, 1991).

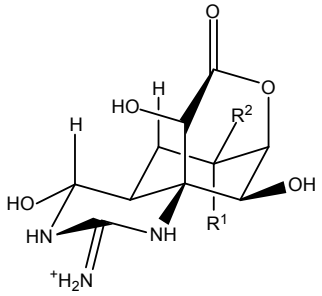
Attualmente inoltre la TTX viene studiata anche per il suo impiego nel diminuire l'ansia e il desiderio nei pazienti eroinomani in astinenza e nella terapia del dolore (Shi *et al.*, 2009). In associazione con gli anestetici locali (bupivacaina, epinefrina), viene utilizzata per prolungare la durata dell'analgesia postoperatoria, mentre il preparato Tectin, derivato TTX a ridotta tossicità, è in fase di sperimentazione come analgesico sistemico iniettabile per la terapia del dolore cronico da cancro (Berde *et al.*, 2011; Nieto *et al.*, 2012).



	R^1	R^2	R^3	R^4
TTX	H	OH	OH	CH_2OH
4-epi-TTX	OH	H	OH	CH_2OH
6-epi-TTX	H	OH	CH_2OH	OH
11-deossi-TTX	H	OH	OH	CH_3
6,11-dideossiTTX	H	OH	H	CH_3
norTTX-6(S)-ol	H	OH	OH	H
norTTX-6(R)-ol	H	OH	H	OH
norTTX-6,6-diol	H	OH	OH	OH
11-oxoTTX	H	OH	OH	$CH(OH)_2$
TTX-11-carbossil acido	H	OH	OH	COO^-



	R^1	R^2
anidroTTX	OH	CH_2OH
6-epianidroTTX	CH_2OH	OH



	R^1	R^2
5-deossiTTX	OH	CH_2OH
5,6,11-trideossiTTX	H	CH_3

Figura 48: Struttura chimica di tetrodotossina e suoi derivati (modificata da Diener, 2008 ; Kudo et al.*, 2012; Bane* et al.*, 2014).*

12. TOSSINE PRODOTTE DA CIANOBATTERI

I cianobatteri sono microrganismi (in passato chiamati anche alghe verdi-azzurre) distribuiti in tutto il pianeta, che hanno in più, rispetto ai batteri tradizionali, la proprietà della fotosintesi in ambiente aerobio e anaerobio.

Considerati tra i più antichi organismi fototrofici conosciuti, essi hanno influito notevolmente sull'evoluzione di piante ed animali sulla terra fin dai tempi preistorici, dato che a loro (e alle alghe in generale) si deve buona parte della produzione di ossigeno nell'aria e nel suolo, con assorbimento contemporaneo di anidride carbonica (Stewart *et al*., 2008).

Si presentano in forme diverse, da rotondeggianti a filamentose/ramificate (tipo *Anabaena*), con dimensioni variabili da 0,2 a 200 μm e sono uni- o pluricellulari (El Gamal, 2010; Churro *et al*., 20012).

Oggi se ne conoscono più di 2000 specie, suddivise storicamente in cinque ordini, oggetto di ripetute e numerose modifiche. Tra le specie più ricorrenti si citano, ad esempio, *Arthrospira* (o *Spirulina*), *Nostoc*, *Anabaena*, *Schizotrix*, *Microcystis*, *Oscillatoria*.

Alcuni generi sono tipicamente d'acqua dolce (*Microcystis*, *Anabaena*, *Cylindrospermopsis*), altre colonizzano le acque di estuario (*Nodularia*, *Aphanizomenon*) e altre sono presenti negli ecosistemi marini (*Lyngbya*, *Synechococcus*, *Trichodesmium*) (O'Neil *et al*., 2012).

Figura 49: Cyanobacterial harmful algal bloom.

Possiedono una parete cellulare pluristratificata e spesso coperta da mucillagine (con funzioni di adesione, difesa e aggregazione in colonie), un citoplasma contenete ribosomi e corpi inclusi, un centroplasma con DNA. Al loro interno possono avere vescicole di gas, utili al galleggiamento e attraverso la loro formazione, compressione ed espansione, sono in grado di controllare la loro posizione verticale all'interno della colonna d'acqua. (Boaru *et al*., 2006; Ellwood e Marchetto, 2011). Si colorano in laboratorio come i batteri Gram-negativi (figura 50) (Churro *et al*., 2012).

I cianobatteri si moltiplicano in diversi modi: scissione, mediante formazione di una parete trasversale nella cellula; frammentazione di catene di cellule (ormogoni) con liberazione di individui mobili; produzione di endospore, molto resistenti alle condizioni ambientali avverse.

Alcune specie formano cellule speciali a parete ingrossata (acineti) che consentono la sopravvivenza in periodi sfavorevoli (secco, oscurità, gelo), per poi rompersi e liberare nuove cellule vegetative (figura 51) (Churro *et al*., 2012).

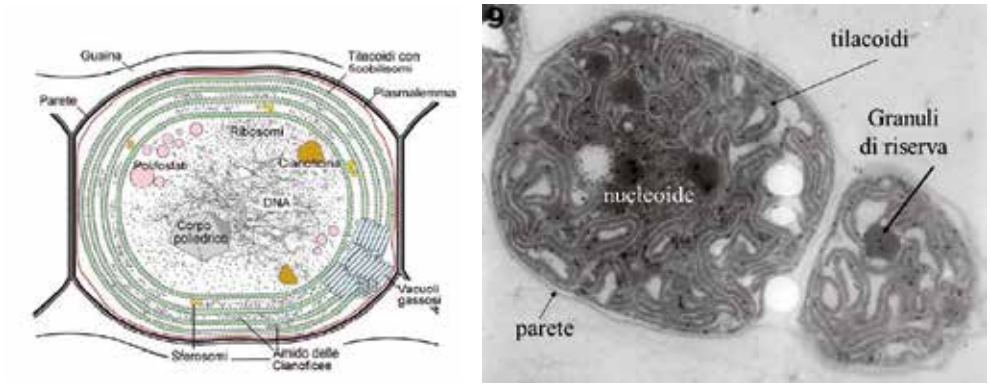


Figura 50: Struttura cellula vegetativa di cianobatteri.

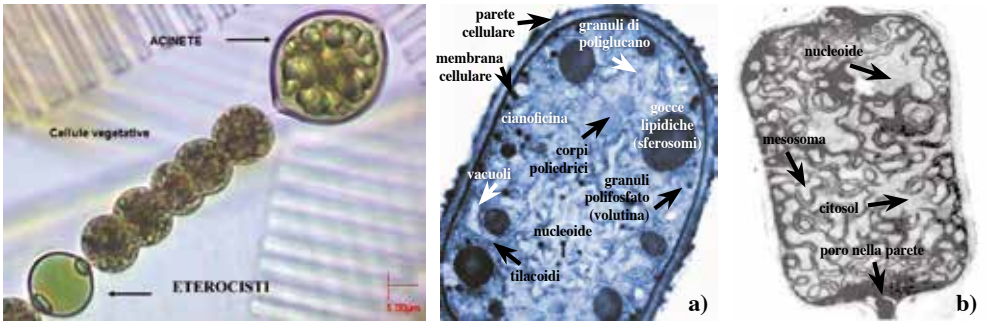


Figura 51: Cellule vegetative, acinete (a) ed eterocisti (b) di cianobatteri.

La fotosintesi avviene a livello della membrana tilacoidea (come nelle alghe e nei vegetali in genere) e si basa sull'assorbimento dell'anidride carbonica, dalla quale il carbonio viene prelevato e convertito in sostanza organica con liberazione di energia. Questa reazione avviene nei cianobatteri soprattutto per opera di due pigmenti specifici simili alla clorofilla, la ficocianina (che dà il colore azzurro all'alga) e la ficoeritrina (colore rossastro), oltre ad altre sostanze con analoghe funzioni (alfa-clorofilla, beta-carotene, zeaxantina, ecc) (Churro *et al*., 2012).

I pigmenti tipici superano in efficienza la clorofilla stessa nel captare la luce, per cui i cianobatteri possono effettuare la fotosintesi anche in acque profonde o mosse (quindi meno trasparenti), con rese migliori durante le ore diurne. Inoltre questi pigmenti, raccogliendo efficacemente la luce a lunghezze d'onda raramente utilizzate da altre specie di *fitoplancton*, danno ai cianobatteri un vantaggio competitivo e una maggiore capacità di colonizzare ambienti diversi (Ellwood e Marchetto, 2011)

Molti cianobatteri sono inoltre capaci di fissare l'azoto atmosferico (N_2), trasformandolo in ammoniaca (NH_3) (ad esempio, *Anabaena* e *Nodularia*), accumulare il fosforo e catturare il ferro. Il fenomeno dell'azoto-fissazione avviene soprattutto di notte nelle eterocisti, grosse vescicole impermeabili all'ossigeno delle dimensioni di circa 1 cm di diametro connesse con le cellule vegetative adiacenti. Quando la concentrazione dei nitrati è molto scarsa, certe cellule (le più grandi del filamento) si differenziano, interrompono la fotosintesi e continuano la fissazione dell'azoto prendendolo dai composti organici (figura 52).

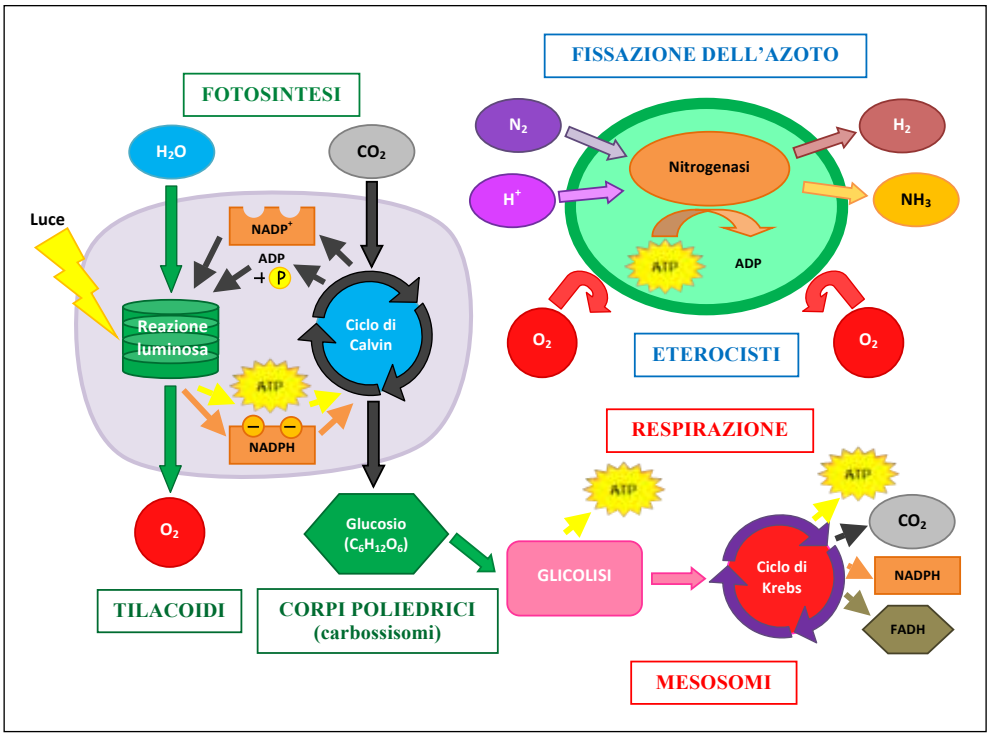


Figura 52: Processi metabolici dei cianobatteri.

I cianobatteri vivono in tutte le acque, anche in quelle termali (con temperatura fino a +80 °C) e sono responsabili, verso la fine dell'estate in condizioni particolari di temperatura, delle cosiddette "fioriture" o "schiume" sulla superficie. In mare formano sugli scogli estese colonie, che appaiono come una pellicola nerastra in corrispondenza del livello massimo di marea (Zanchett e Oliveira-Filho; 2013)

Oltre ad essere parte integrante del *plancton*, primo anello della catena alimentare acquatica, contribuiscono alla formazione di strutture coralline, poiché hanno la proprietà di segregare calcio e magnesio (stomatoliti) (figura 53).

Figura 53: Stomatoliti formate da cianobatteri.

I cianobatteri non sembrano in grado di colonizzare, invadere organismi animali, tuttavia alcune specie vivono in simbiosi con piante acquatiche (piante vascolari) e con licheni, e non si può escludere che stabiliscono un rapporto simbiotico anche con organismi animali (Stipa *et al*., 2006).

La loro espansione nelle acque dolci o salmastre di tutto il mondo è da sempre legata ad alterazioni dell'ecosistema ed è preannunciata dall'intorbidamento dell'acqua, cui fa seguito la morte di invertebrati e pesci per ipossia.

I fattori ambientali che stanno alla base della "fioritura" (*bloom*) dei cianobatteri nelle acque sono: l'aumento di azoto e fosforo; l'aumento della temperatura; la calma persistente in superficie; la stratificazione verticale (figura 54, 55) (O'Neil *et al*., 2012; Paerl e Otten, 2013).

La quantità eccessiva di N e P nell'acqua è attribuita verosimilmente agli scarichi urbani, industriali ed agricoli, che apportano quantità rilevanti di detersivi e fertilizzanti.

L'aumento della temperatura dell'acqua sopra i +20 °C favorisce i cianobatteri, che proliferano anche sopra i +25 °C, mentre, al contrario, diminuiscono di numero le alghe eucariote.

La calma persistente, associata all'aumento della temperatura, favorisce la stratificazione dell'acqua, che diventa più calda in superficie e più fredda in profondità.

I cianobatteri, producendo calore essi stessi per consumo di energia, in queste condizioni, formano bolle di gas, che aumenta il galleggiamento nello strato superficiale delle acque con assorbimento d'ossigeno.

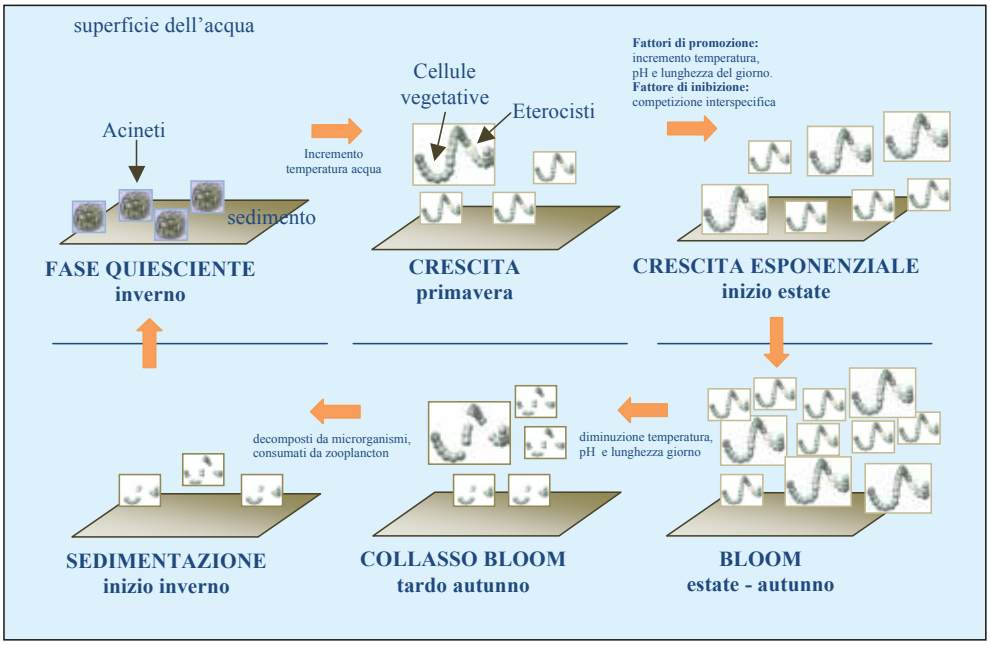


Figura 54: Ciclo vitale dei cianobatteri.

La stratificazione superficiale è favorita (soprattutto nei grandi laghi e nelle lagune costiere) da mancanza di precipitazioni e da scarsità di venti, fatti che si registrano spesso nelle stagioni estive prolungate o con primavere troppo miti.

Un certo effetto ha pure l'aumento della salinità in seguito a maggior evaporazione, anche se i cianobatteri manifestano verso il cloruro di sodio una buona tolleranza. La quantità di

plancton presente, invece, non avrebbe un ruolo concorrenziale decisivo, sebbene quest'ultima relazione sia ancora oggetto di discussioni.

La fine dell'invasione da cianobatteri (che può verificarsi dopo pochi giorni o dopo mesi) sembra avvenire in seguito a diversi eventi concomitanti: la diminuzione del fosforo e lo stato d'ipossia generati dagli stessi batteri, il raffreddamento delle acque e la loro destratificazione, la concorrenza di altri batteri predatori e di virus (fagi o cianofagi).

Questi virus (se ne conosce una quarantina nelle acque dolci) hanno un'importanza tutt'altro che trascurabile, perché è stato dimostrato che possono acquisire e trattenere alcuni geni dei cianobatteri e quindi partecipare alla trasduzione di caratteri di tossicità degli stessi.

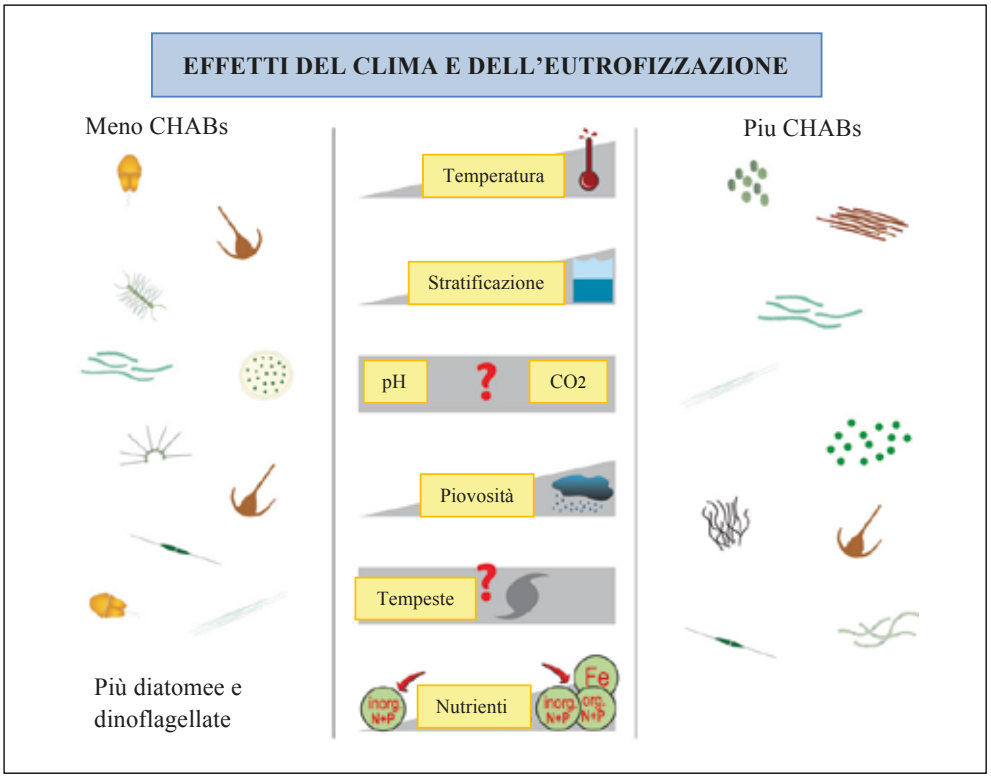


Figura 55: Potenziali effetti dei cambiamenti climatici e dell'eutrofizzazione sullo sviluppo di "Cyanobacterial Harmful Algal Bloom"(CHAB) (modif. da O'Neil et al.*, 2012).*

Tutti i cianobatteri producono come metaboliti secondari una grande varietà di tossine (tabella 4), tra cui le più temute sono le cianotossine, che hanno effetti negativi anche sui mammiferi, prevalentemente a livello dell'epato-pancreas e dei sistemi digestivo, endocrino, dermico e nervoso.

Esse vengono suddivise, in base ai siti di attacco, in epatotossine (microcistine e nodularine), neurotossine (anatossina-a, homo-anatossina-a, anatossina-a(s), saxitossine), citotossine (cilindrospermopsine), tossine ad attività dermatotossiche e gastrointestinali (lyngbyatossina, aplysiatossina e debromoaplysiatossina) e endotossine irritanti (lipopolisaccaridi), mentre, in

base alla struttura chimica, vengono distinte in tre gruppi principali: peptidi ciclici, alcaloidi e lipopolisaccaridi (LPS) (Sivonen e Jones, 1999; Carmichael, 2001, 2002; Funari *et al*., 2008; Dittmann *et al*., 2013).

Attualmente non è noto il significato fisiologico associato alla produzione di cianotossine, tuttavia le microcistine possono essere trasportate all'esterno della cellula nell'ambiente acquatico circostante attraverso processi di trasporto attivo, con dispendio di energia. Ciò farebbe presupporre che i cianobatteri possano utilizzare il rilascio di tossine per difendersi e/o per attaccare organismi competitori (Boaru *et al*., 2006; Mattei e Stefanelli, 2008; Tan e Lee-Goh, 2009).

Le specie che sono più frequentemente coinvolte nella produzione di microcistine appartengono ai generi *Mycrocistis, Dolichospermum* (*Anabaena*), *Planktothrix* (*Oscillatoria*), *Nostoc, Hapalosiphon, Phormidium*. *Nodularia spumigena* produce la tossina nodularina (figura 56) (Sivonen, 2008).

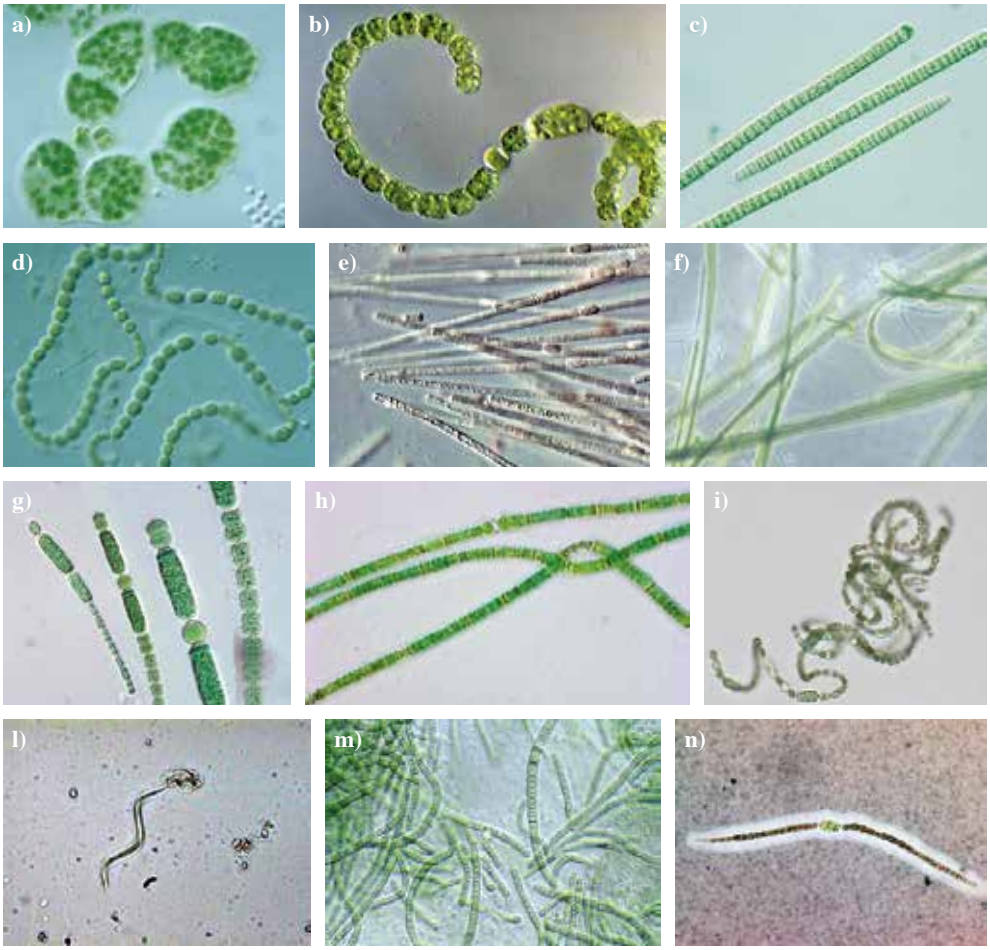


Figura 56: Mycrocistis *(a)*, Anabaena *(b)*, Planktothrix *(c)*, Nostoc *(d)*, Nodularia spumigena *(e)*, Aphanizomenon *(f)*, Lyngbya *(g)*, Cylindrospermopsis *(h)*, Dolichospermum *(i)*, Raphidiopsis *(l)*, Schizothrix *(m)*, Umezakia *(n)*.

Le neurotossine sono frequentemente prodotte da *Dolichospermum* (*Anabaena), Anabaena*, meno frequentemente da *Aphanizomenon*, *Lyngbya*, *Oscillatoria* (figura 56) (Sinoven e Jones, 1999; van Apeldoorn, 2007).

Cylindrospermopsis, *Anabaena, Aphanizomenon, Raphidiopsis* e *Umezakia* producono cilindrospermopsine, mentre alcune specie di *Lyngbya*, *Oscillatoria* e *Schizothrix* sono principalmente coinvolte nella produzione di dermatotossine (figura 56) (Bláha *et al*., 2009; Viaggiu *et al*., 2011).

Ciascuna specie può produrre diversi tipi di tossine o diverse varianti dello stesso tipo di tossina, come pure ceppi tossigeni possono coesistere con ceppi non tossigeni della stessa specie (Zurawell *et al*., 2005; Bláha *et al*., 2009).

I cianobatteri inoltre producono innumerevoli composti bioattivi (aeruginosine, microginine, anabaenopeptine, cianopeptoline, microviridine, ciclamidi). Si tratta di metaboliti secondari costituiti da piccoli peptidi ciclici contenenti amminoacidi eterociclizzati o derivati di amminoacidi isoprenoidi, con un'ampia variabilità strutturale grazie alla possibilità di utilizzare vie biosintetiche ribosomiali e, soprattutto, non ribosomiali (NRPS o NRPS/PKS) (Jones *et al*., 2009).

Ad oggi se ne conoscono più di 600, alcune con attività farmacologiche (antimalarica, antitumorale, antibiotica, antivirale, anticoagulante, antiipertensiva, antiasmatica, erbicida e insetticida) e lo studio degli enzimi coinvolti nella biosintesi, dei meccanismi d'azione e dei geni coinvolti (soprattutto inseriti in ospiti eterologhi come *E. coli*) aprono nuovi scenari nella sintesi chimica e nell'ingegneria genetica (Gademann e Portmann, 2008; Tan e Lee-Goh, 2009; El Gamal, 2010; Purkayastha *et al*., 2010; Sivonen *et al*., 2010; Nagarajan *et al*., 2012; Hameed, 2013; Zanchett e Oliveira-Filho; 2013).

12.1. Microcistine (MC)

Le microcistine (MCs) costituiscono, tra le tossine prodotte da cianobatteri, il gruppo più numeroso e diversificato. Sono conosciute infatti circa 90 varianti diverse della prima tossina identificata, la MC-LR (Sivonen e Jones, 1999; Welker e von Dohren, 2004)

Prodotte da numerose specie cianobatteriche (soprattutto *Microcystis aeruginosa*, *M. viridis*, *M. ichthyoblabe, M. botrys*, *Anabena flos-aquae*, *A. circinalis, A. lemmermannii, Planktothrix rubescens*, *P. agardhii*, *P. mougeotii, Aphanizomenon, Nostoc* spp. e *Snowella lacustris*), più frequentemente rilevate in acque dolci, sono noti epatotossici nell'uomo, nonchè promotori tumorali e probabili cancerogeni (Sivonen e Jones, 1999; Humpage, 2008; Fujiki e Suganuma, 2009).

Implicate in estese morie di pesci e animali acquatici (Rao *et al*., 2002; Xie *et al*., 2005, Miller *et al*., 2010; Trinchet *et al*., 2013), dove determinano patologie del fegato, dei reni e delle branchie. Nei pesci esposti provocano altresì diminuzione e alterato sviluppo delle fasi giovanili (Malbrouck e Kestermont, 2006) e modificazioni comportamentali, questi ultimi effetti probabilmente a causa della abilità di queste tossine di attraversare la barriera ematoencefalica veicolate da polipeptidi trasportatori di anioni (Baganz *et al*., 2004; Ferrão-Filho e Kozlowsky-Suzuki; 2011).

La sensibilità alle tossine nei pesci dipende dalla specie coinvolta e dalla capacità metabolica della specie ittica di disintossicazione attraverso la via della glutatione-S-transferasi, con accumulo della tossina soprattutto nei visceri (particolarmente il fegato), ma anche nei muscoli, con conseguente rischio potenziale per il consumatore (Cazenave *et al*., 2005; Ibelings e Chorus, 2007; Zhang *et al*., 2007a; Bruno *et al*., 2010; Lance *et al*., 2010).

Anche gli animali selvatici, domestici e di allevamento possono essere esposti a livelli particolarmente elevati di microcistine se nel corpo idrico superficiale nel quale si abbeverano sono presenti proliferazioni di cianobatteri (fioriture e schiume), che si accumulano anche in aree prossime alla riva, determinando effetti sia sulla salute degli animali stessi che dell'uomo che potrebbe essere esposto alle cianotossine attraverso il consumo di carni, latte e derivati (Chen *et al*., 2009).

Tabella 4: Intossicazioni prodotte da cianobatteri

Biotossine	Struttura chimica	DL_{50}	Meccanismo d'azione	Principali effetti	Origine
EPATOTOSSINE					
Microcistine	Eptapeptidi ciclici (90 varianti)	50 μg/kg MC-LR	Inibizione fosfatasi PP1 e PP2A Danno ossidativo cellulare	Epatotossiche: (emorragie e necrosi epatiche). Citotossiche e genotossiche Tumor promoter	*Mycrocistis*. *Anabaena*, *Dolichospermum*, *Nostoc*, *Planktothrix*, *Phormidium*, *Anabaenopsis milleri*, *Aphanizomenon ovalisporum*, *Aphanocapsa cumulus*, *Limnothrix redekeii*, *Oscillatoria tenuis*, *Hapalosiphon hibernicus*
Nodularine	Pentapeptidi ciclici (9 varianti)	50 μg/kg NOD	Simili microcistine	Simili microcistine Cancerogeno	*Nodularia spumigena*
CITOTOSSINE					
Cilindrosper-mopsine	Alcaloidi guanidinici (3 varianti)	200-2000 μg/kg/d	Inibizione glutatione (GSH) e sintesi proteica. Bioattivazione da citocromo P450	Epatotossiche Nefrotossiche Citotossiche Genotossiche Mutagene e cancerogene	*Cylindrospermopsis raciborskii*, *Anabaena*, *Umezakia natans*, *Aphanizomenon*, *Raphidiopsis curvata* *Lyngbya*
NEUROTOSSINE					
Anatossina-a **Homo-anatossina-a**	Alcaloidi tropano connessi 2acetil-9azabiciclo (4.2.1) non-2-ene (5 varianti)	375 μg/kg ANA-a 250 μg/kg homo-ANA-a	Agonista nicotinico pre- e post sinaptico dell'acetilcolina e effetti depolarizzanti sulla membrana	Neurotossiche: (sinapsi) Blocco neuromuscolare post-sinaptico	*Dolichospermum, Anabaena*, *Cylindrospermum*, *Aphanizomenon*, *Lyngbya*, *Oscillatoria, Planktothrix*, *Phormidium formosum*, *Raphidiopsis mediterranea*, *Trichodesmium*
Anatossina-a(s)	N-idrossiguanidina metilfosfato estere	20 μg/kg	Inibizione della acetilcolinesterasi e ipereccitabilità nervosa	Blocco giunzioni neuromuscolari. Effetti colino-mimetici	*Dolichospermum flos-aquae* *D. lemmermannii*, *Aphanizomenon*
Saxitossine	Alcaloidi carbammati (> 20 varianti)	10 μg/kg	Blocco canali Na^+	Neurotossiche (assoni)	*Dolichospermum*, *Anabaena perturbata* var. tumida, *A. circinalis*, *Lyngbya wollei*, *Cylindrospermopsis raciborskii*, *Planktothrix*, *Aphanizomenon*
ß-N-metilamino-L-alanina (BMAA)	Amminoacido non essenziale	ND	Agente neurodegenerativo. Agonista glutaminergico. Danno ossidativo cellulare.	Sclerosi laterale amiotrofica-Parkinsonismo-demenza complex (ALS/PDC)	*Microcystis*, *Anabaena*, *Nostoc*, *Planktothrix*, *Trichodesmium* Tutti (?)
DERMATOTOSSINE					
Lyngbyatos-sina-a	Alcaloide derivato dell'indolo	250 μg/kg	Agente infiammatorio e attivazione della chinasi C	Dermatotossiche Gastroenterici Citotossicità	*Moorea producens (ex Lyngbya majuscule)*, *L wollei*
Aplysiatossina **Debromoa-plysiatossina**	Bislattone fenolico (alcaloide poliacetato)	100 μg/kg	Agente infiammatorio e attivazione della chinasi C	Dermatotossiche Gastroenterici Citotossicità	*Lyngbya, Planktothrix* *Oscillatoria nigroviridis*, *Schizothrix calcicola*
ENDOTOSSINE					
Lipopolisac-caride	Lipopolissaccaride	45 - 190 mg/kg	Irritante cutaneo e gastrointestinale. Agente infiammatorio	Irritante (pelle e mucose) Reazioni allergiche.	Tutti. Parte dei cianobatteri

Le MCs sono eptapeptidi monociclici a basso peso molecolare (variabile fra 900 e 1100 Da), contenenti 3 D-amminoacidi (D-alanina – D-Ala, D-eritro-ß-metilaspartato – D-MeAsp e D-glutammato – D-Glu), N-metildiidro-alanina (Mdha), l'Adda (acido 3-ammino-9-metossi-2,6,8-trimetil-10-fenildeca-4,6-dienoico), un amminoacido aromatico tipico dei cianobatteri, e due L-amminoacidi variabili (L-X e L-Y) (figura 57 e 60) (Rinehart *et al*., 1988; Chorus e Bartram, 1999; Isaacs, 2011).

I più comuni sostituenti X sono leucina (L), arginina (R), e tirosina (Z), mentre i sostituenti Y sono arginina (R), alanina (A) e metionina (M). Le diverse MCs si identificano proprio attraverso un suffisso che indica i due L-amminoacidi X e Y presenti. Ad esempio, la più comune forma di microcistina è la MC-LR, dove X sta per L-Leu e Y è invece L-Arg (Sivonen e Jones, 1999; McElhiney e Lawton, 2005).

I diversi congeneri si diversificano tra loro primariamente attraverso i due L-amminoacidi variabili e, secondariamente, per la presenza/assenza di gruppi metilici, esterificazioni ed isomeri ottici su D-MeAsp e/o Mdha come pure sull'Adda. Essi possono avere tossicità molto diverse tra loro e lo 6Z-stereoisomero dell'Adda, come quasi tutti i composti che derivano da modifiche dell'Adda, non è tossico (van Apeldoorn *et al*., 2007; Scardala *et al*., 2008).

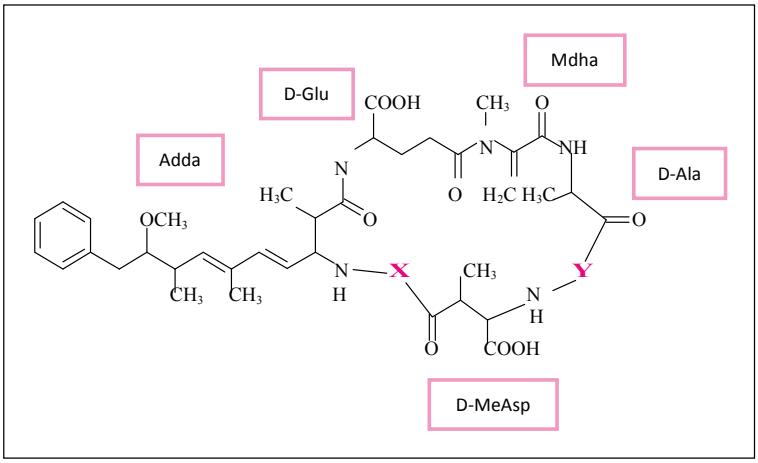


Figura 57: Struttura chimica delle microcistine.

Le MC sono peptidi non ribosomali sintetizzati da un complesso proteina multi-funzionale contenente non ribosomiale peptide sintetasi (PNR) e polichetide sintasi (PKS), presente solo nei procarioti e negli eucarioti inferiori e codificato da grandi *cluster* di geni batterici che comprende almeno due operoni, *mcyABC* (peptide sintetasi) e *mcyDE* (ibrido polichetidico - peptide sintetasi) (Pearson *et al*., 2010; Yadav *et al*., 2011).

Sebbene la tossina possa essere localizzata in tutti regioni interne delle cellule cianobatteri, è stato suggerito che la maggior parte di essa è localizzata nei tilacoidi, in cui la porzione idrofoba ADDA risulta inserita nella membrana e la struttura ciclica polare interagire con citoplasma. Questa localizzazione preferenziale suggerisce che la molecola possa svolgere un ruolo importante nella raccolta della luce e di adattamento alle risposte ambientali (Campos e Vasconcelos, 2010).

Le MC sono altamente idrofile quindi non possono essere assorbite dalla mucosa intestinale attraverso il trasporto passivo, ma solo grazie al sistema di trasporto attivo di anioni organici (OATP), e successivamente entrano negli epatociti attraverso l'attività dei trasportatori degli acidi biliari e OATP (Fisher *et al*., 2005).

Poiché il sistema OATP è un sistema multispecifico, si è osservato che MC sono specifiche solo per alcuni tipi di OATP espressi in diversi tipi cellulari quali enterociti, epatociti e cellule epiteliali renali e organi quali il cuore, polmone, milza, pancreas, cervello e barriera emato-encefalica (OATP1B1, OATP1B3 umani espressi nel fegato e OATP1A2 umano espresso nel cervello e nella barriera emato-encefalica). La distribuzione sistemica di MC negli organi dipende quindi dal grado di perfusione sanguigna e dai tipi e livelli di espressione di OATP (Lu *et al*., 2008; Campos e Vasconcelos, 2010; Fischer *et al*., 2010; Zanchett e Oliveira-Filho; 2013; Niedermayer *et al*., 2014). A livello del fegato le MC vengono poi coniugate con glutatione e cisteina, con perdita di gran parte dell'attività tossica, ed escrete principalmente con le urine (Dittmann e Wiegard, 2006).

L'organo bersaglio principale risulta il fegato, sia per quanto riguarda l'accumulo che l'escrezione, ma anche polmoni, reni e colon risultano colpiti. Le lesioni si esplicano con necrosi degli epatociti, emorragie estese con distribuzione perilobulare, scollamento delle cellule e perdita dell'architettura tissutale, rottura delle cellule dell'endotelio sinusoidale e scomparsa degli spazi di Disse tra epatociti e sinusoidi (Bruno e Viaggio, 2001; De Figueiredo *et al*., 2004).

Le MCs sono dei potenti inibitori irreversibili delle fosfatasi serina/treonina (PP1 e PP2A) mediante la formazione di un legame covalente tra la cisteina delle PPasi e il gruppo Mdha delle MC (figura 58) (Gehringer, 2004; Maynes *et al*., 2006). Le varianti MC che non possiedono l'amminoacido Mdha o le nodularine (dove è sostituito dall'amminoacido Mdhb) danno luogo ad un legame reversibile con le proteine fosfatasi (figura 54) (Sano *et al*., 2004; Fujiki e Suganuma, 2009).

Tale inibizione porta a iperfosforilazione delle proteine strutturali del citoscheletro cellulare, con rottura dell'ultrastruttura epatica e successiva citolisi o apoptosi. Il fegato si presenta ipertrofico (raddoppia), con emorragie intralobulari e necrosi (Jochimsen *et al*., 1998; Boaru *et al*., 2006; Bláha *et al*., 2009).

Lo stress ossidativo sembra essere un altro importante meccanismo biochimico delle MCs. Le MCs infatti sono in grado di indurre la formazione di molecole reattive contenenti ossigeno (Reactive Oxygen Specie - ROS), come ioni ossigeno e perossidi, che, se in eccesso, possono causare danni ossidativi cellulari, quali perossidazione delle membrane lipidiche, genotossicità, clastogenesi e apoptosi (figura 58) (Bláha *et al*., 2009; Zegura *et al*., 2011).

Il legame tra MC e l'aldeide deidrogenasi epatica mitocondriale (ALDH2) è stato recentemente dimostrato e poiché l'alterazione di questa attività enzimatica è coinvolta nell'induzione dello stress ossidativo, è stato ipotizzato che l'enzima potrebbe essere uno degli obiettivi principali del meccanismo di tossicità nell'uomo (Chen *et al*., 2006).

L'inibizione dell'attività delle fosfatasi sembra essere anche il meccanismo principale che sovraintende all'attività cancerogena delle MCs. Studi recenti infatti suggeriscono anche l'implicazione delle MCs come promotori tumorali per i tumori della pelle e del fegato (Boaru *et al*, 2006; Zegura *et al*., 2011; Svirčev *et al*., 2013).

Le MCs inoltre interferiscono con i percorsi di riparazione cellulare del DNA, che insieme ai danni diretti, sono alla base della loro cancerogenicità (Zegura *et al*., 2011).

Le MCs infine aumentano l'espressione del fattore di necrosi tumorale (TNF-α) e dei geni precoce-risposta, comprendenti proto-oncogeni (*c-fos*, *c-jun* e *c-myc*), geni coinvolti nella risposta al danno del DNA, nell'arresto del ciclo cellulare e nell'apoptosi (Sueoka *et al*., 1997; Boaru *et al*., 2006; Li *et al*., 2009).

Per questi motivi nel 2010 l'Agenzia Internazionale per la Ricerca sul Cancro (IARC) ha classificato MC-LR tra i possibili cancerogeni per l'uomo (gruppo 2B) (IARC, 2006).

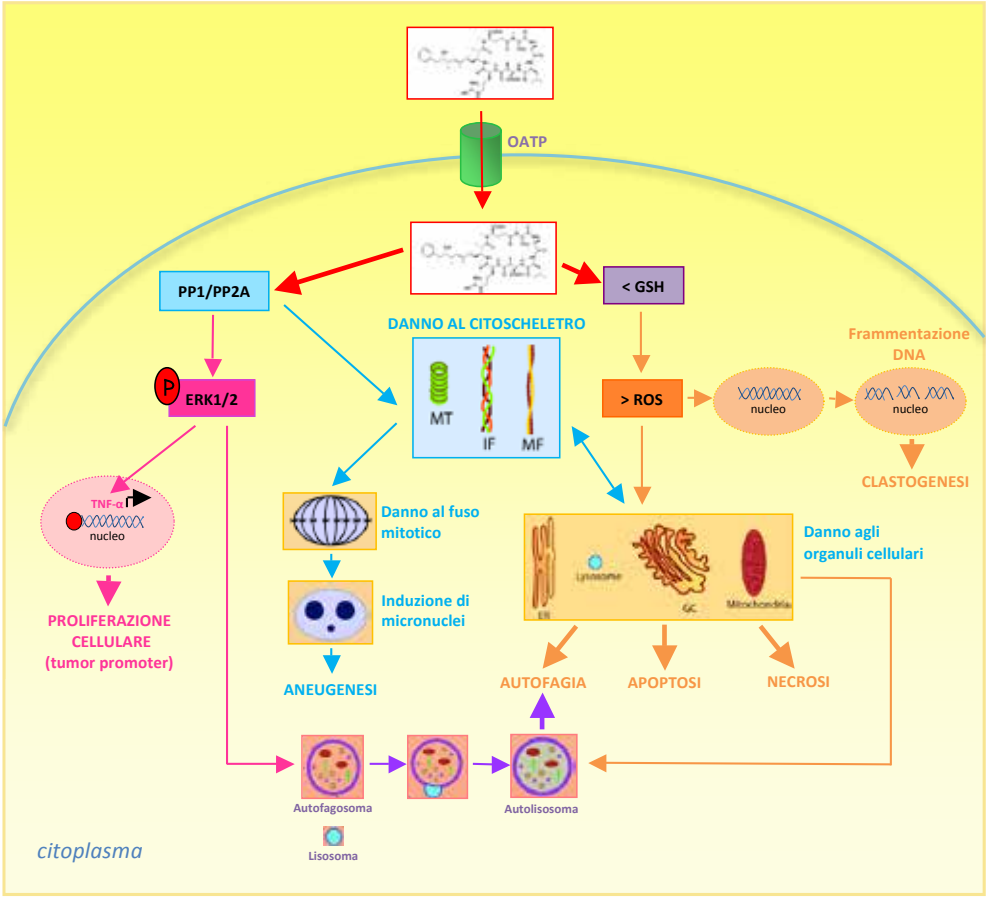


Figura 58: Meccanismo d'azione delle microcistine.

Problemi alla salute umana sono più probabilmente dovuti all'esposizione cronica a basse concentrazioni. L'uomo può essere esposto alle tossine per via orale, attraverso il consumo di acqua contaminata, prodotti ittici (pesci, gamberi, molluschi) o integratori alimentari a base di alghe (utilizzati nelle diete dimagranti), per via cutanea diretta, nel corso di attività sportive nelle acque di balneazione, e per via inalatoria, attraverso aerosolizzazione di acque contaminate (Kuiper-Goodman *et al*., 1999; Rao *et al*., 2002; Funari e Testai, 2008a).

I sintomi insorgono dopo 3-4 ore dall'ingestione e sono prevalentemente di tipo gastroenterico (vomito, diarrea e dolori intestinali), più tardi subentrano febbre, emicrania acuta, debolezza, dolori muscolari e articolari, aumento γ-glutammiltransferasi, indice di danno epatico. Viene descritta anche la sindrome di Haff caratterizzata da vomito, mioglobinuria, dolori muscolari e morte per insufficienza respiratoria. La fase epatica dura circa 2 giorni, a cui seguono 1-2 giorni di fase letargica, con severi squilibri elettrolitici, e una fase diarroica che può durare anche 5 giorni. Alcune lesioni possono evolvere in tumori. Tumore primario del fegato e tumori colon-rettali sono descritti nella popolazione umana correlati all'esposizione a MC. Nel caso di contatto diretto con acque contaminate si rilevano dermatiti, congiuntivi-

ti, vescicole e ulcere sulle labbra e nella cavità orale, mentre episodi di bronchite e asmatici possono comparire nel caso di aereosolizzazione (Bruno e Viaggiu, 2001; Volterra, 1997; Rao *et al*., 2002; Campos e Vasconcelos, 2010).

Il grado di tossicità dipende dai livelli e dalla durata dell'esposizione, dalle modalità di assorbimento e dai processi di disintossicazione ed escrezione (Funari e Testai, 2008b).

Sono stati segnalati diversi livelli di tossicità, variabili a seconda dell'isoforma di MC considerata: in particolare per MC-LR, la tossina più comune, la DL_{50} i.p. nel topo è di 50μg/kg di peso corporeo, mentre per la più rara MC-RR (con sostituenti rappresentati da amminoacidi più polari) la dose per ottenere analogo effetto è di 600 μg. La DL_{50} per via orale è invece variabile tra 5000 e 10.900 μg/kg p.v. (Funari e Testai, 2008a; Pearson *et al*., 2010).

La WHO (1999) ha stabilito in 100 e 40μg/kg p.c./giorno i valori corrispondenti di LOAEL e NOAEL per MC-LR (Falconer, 2008; Mulvenna *et al*., 2012). Dal NOAEL, applicando un fattore di sicurezza uguale a 1000, si può quantificare una dose giornaliera tollerabile (TDI) di 0,04 μg/kg p.c./giorno. I valori limite italiani indicano la soglia di 0,84 μg/L di acqua al giorno il rischio d'intossicazione acuta (circ. Min. San. IX.400.4/13.1/3/1447 del 31 luglio 1998).

Dal TDI è stato elaborato un valore guida (GV) di 1 μg/L per la concentrazione di MC-LR, considerando che l'assunzione di acqua potabile sia 80% di quella totale e che una persona di 60 kg assuma 2L di acqua al giorno (WHO, 1998). Questo limite equivale ad una concentrazione di cellule superiore a 2.000/ml quando è prevalente *M. aeruginosa* o superiore a 15.000/ml quando predominano altre specie di cianobatteri (Churro *et al*., 2012). Per le acque di balneazione, 20.000 cellule per ml vengono considerati un fattore di rischio basso per il consumatore. Rischio medio si ottiene con valori fra 20.000 e 100.000 cellule per ml, mentre valori superiori a 100.000 cellule sono ritenuti ad alto rischio di intossicazione (WHO, 2003; Metcalf e Codd, 2004).

12.2. Nodularine (NOD)

Le nodularine (NODs), sono prodotte dal cianobatterio *Nodularia spumigena*, che determina fioriture tossiche prevalentemente in ambienti salmastri e di estuario. Mar Baltico soprattutto, ma anche Australia, Nuova Zelanda, Nord America e Mare del Nord sono interessati dal fenomeno (Pearson *et al*, 2010).

Le tossine sono state segnalate come causa di estese morie di pesci, uccelli e invertebrati, come pure di animali domestici abbeverati con acqua contaminata. NODs sono state rilevate anche nei molluschi bivalvi e nei gamberi del Mar Baltico e dell'Australia (Kuiper-Goodmann, 1999; Karijalainen *et al*., 2008; Persson *et al*., 2009; Vuorinen *et al*., 2010).

Le NODs sono pentapeptidi monociclici, molto simili alle MCs, contenenti la struttura Adda, acido D-glutammico (D-Glu), N-metildeidrobutirrina (MedhB), acido D-eritro-ß-metilaspartico (D-MeAsp) e L-arginina (L-Arg). (figura 59 e 60) (Rinehart *et al*., 1988; Chorus e Bartram, 1999).

Sono conosciuti 7 analoghi NOD che derivano da modifiche dell'L-amminoacido in posizione C_2 (X) o da demetilazioni. Anche per le NODs la variante 6Z-stereisomero dell'Adda non è tossica.

Il residuo D-Glu è essenziale per la tossicità di NOD, in quanto l'esterificazione del carbossile abolisce la tossicità, mentre la sostituzione nella posizione C_1 ha scarso effetto sulla tossicità (Scardala *et al*., 2008). La variante NOD-Har, prodotta dal ceppo *N. harveyana*, presenta al posto di L-Arg l'omoarginina (Saito *et al*., 2001).

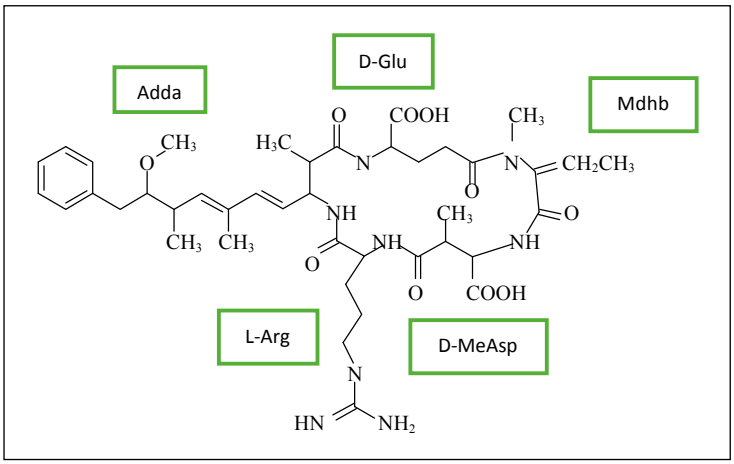


Figura 59: Struttura chimica della nodularina.

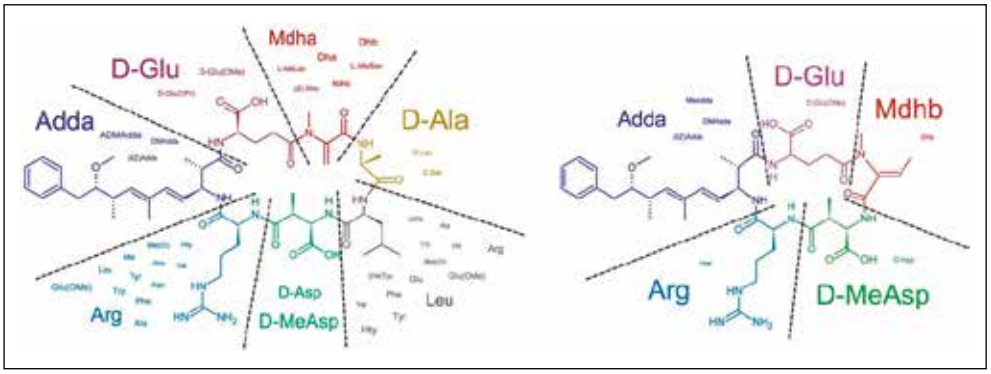


Figura 60: Strutture generali di microcistine (a sinistra) e nodularine (a destra).
La prevalenza di residui presenti all'interno delle tossine è proporzionale alla dimensione dei rispettivi residui.

Le NODs vengono prodotte solo da *Nodularia spumigena*, ma nella spugna marina *Theonella swinhoei* è stato ritrovato un analogo NOD chiamato motuporina che al posto dell'L-arginina contiene L-valina. La motuporina potrebbe essere di origine cianobatterica, dal momento che la spugna che la produce accoglie cianobatteri simbionti (Achene, 2011).

Le NODs condividono con le MCs lo stesso meccanismo d'azione e l'organo bersaglio rappresentato dal fegato.

L'inibizione delle fosfatasi PP1 e, soprattutto, PP2A induce aggregazione dei microfilamenti dell'actina, rigonfiamento cellulare, disgregazione dei sinusoidi epatici ed emorragie intraepatiche (Honkanen *et al.*, 1991).

La DL_{50} nel topo per via i.p. è di 50 μg/kg. A dosi inferiori le NODs agiscono come promotori tumorali favorendo la divisione cellulare, ma anche come cancerogeni primari (Metcalf e Codd, 2004; Mulvenna *et al.*, 2012).

Figura 61: Modalità di trasmissione all'uomo delle cianotossine.

Il meccanismo principale associato all'attività cancerogena è l'iperfosforilazione delle proteine cellulari, che determina l'attività di promozione tumorale. Gli idrofobici ß-amminoacidi dell'Adda in posizione C_{20}, presenti sia nelle MCs che nelle NODs, si legano a siti idrofobici specifici presenti sulla PP e ne bloccano l'azione. Medhb della NOD lega Cys273 di PP2A, come il residuo Medha di MC lega Cys273 di PP1 e Cys266 di PP2A. Tuttavia questi legami non sono di tipo covalente e questa potrebbe essere la ragione delle addizionali proprietà cancerogene delle tossine (Kelker *et al*., 2009; Pearson *et al*., 2010). Infatti il danno al DNA indotto da NOD aumenta sia a 24 che a 48 ore, in contrasto a ciò che si verifica con di MC-LR, suggerendo che NOD sia dotata di effetti cancerogeni più marcati rispetto a MC-LR (Fujiki e Suganuma, 2009).

Ulteriori meccanismi, analogamente alle MCs, è la riduzione dei livelli di glutatione e l'induzione di radicali liberi, con conseguente danno ossidativo del DNA, l'interferenza con i percorsi di riparazione cellulari e l'espressione di TNF-α (fattore di necrosi tumorale α ge-

ne) e geni precoce-risposta (come *c-jun*, *jun B*, *jun D*, *c-fos*, *fos B* e *fra*-1) (Fujiki e Suganuma, 2009). Inoltre NOD induce la formazione di micronuclei e presenta attività aneugenica (Sueoka *et al*., 1997; Bláha *et al*., 2009; Zegura *et al*., 2011).

12.3. Cilindrospermopsina (CYN)

La cilindrospermopsina (CYN) è stata identificata per la prima volta nel 1979 in Australia, dove 148 persone furono ricoverate con sintomi di epatoenterite per aver assunto acqua da un serbatoio contaminato da una fioritura di *Cylindrospermopsis raciborskii* (Bouke *et al*., 1983).

Attualmente, in aggiunta a *C. raciborskii*, sono segnalati come produttori di cilindrospermopsina, *Aphanizomenon ovalisporum*, *A. flos-aquae*, *A. gracile*, *Umezakia natans*, *Raphidiopsis curvata*, *Anabaena bergii*, *A. lapponica*, *A. planctonica* e *Lyngnbya wollei* (Pearson *et al*., 2010).

All'interno delle specie coinvolte, sono tossigeni i ceppi che presentano il gene *cyrJ* (Mihali *et al*., 2008; Mazmouz *et al*., 2010; Mankiewicz-Bocze *et al*., 2012).

CYN rappresenta un esempio di "*global warming*" in quanto negli ultimi dieci anni si è diffusa dalle zone tropicali a quelle temperate di America ed Europa e, oltre al suo impatto per la salute pubblica, avvelenamenti da CYN sono stati collegati alla morte di animali domestici (Saker *et al*., 1999; Kinnear, 2010; Sinha *et al*., 2012).

Attualmente la sua distribuzione è quasi cosmopolita e organismi produttori di CYN sono registrati in diversi habitat compresi laghi, bacini, fiumi, stagni e dighe. Lo sviluppo dei microrganismi produttori di rado si evidenzia in superficie, anche durante fioriture intense (Kinnear, 2010). Nel 2004 è stata rilevata anche in Italia (Manti, 2005).

CYN è molecola di basso peso molecolare (415Dalton), chimicamente definita alcaloide solfato-guanidinico, dove un gruppo guanidinico triciclico è combinato con idrossimetil-uracile (figura 62). Sono stati rilevati anche un epimero (7-epi-cilindrospermopsina), una variante che manca del gruppo ossidrile in C7 (7-deossi-cilindrospermopsina) e un'altra in cui manca il gruppo metilico (demetossi-cilindrospermopsina) (Banker *et al*. 2001; Li *et al*., 2001).

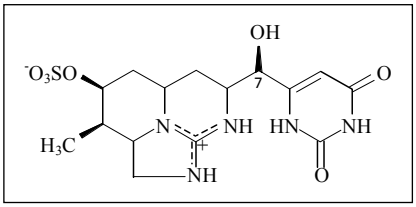


Figura 62: Struttura chimica della cilindrospermopsina.

CYN è una molecola altamente idrofila e per il suo assorbimento intestinale e la penetrazione negli epatociti necessita di sistemi di trasporto attivo. Tuttavia, a causa delle sue piccole dimensioni, è possibile una sua limitata diffusione passiva attraverso le membrane biologiche (Chong *et al*., 2002).

Per CYN la DL_{50} nel topo per via i.p. è di 200-2000 μg/kg p.v., mentre per via orale varia fra 4.400 e 6.900 μg/kg p.v.. La dose più alta si riferisce alla morte del topo dopo 24-120 ore di osservazione, ma se viene prolungata a 144 ore il dosaggio risulta 10 volte più basso (a 7 giorni 0,18 mg/kg p.v.). Il NOAEL per via orale è indicato in 30 μg/kg p.v./giorno, mentre il LOAEL è fissato a 60 μg/kg p.v./giorno (Metcalf e Codd, 2004; Falconer, 2008; Mulvenna *et al*., 2012).

Determina tossicità acuta, ritardata e progressiva.

Assunta per via orale con l'acqua, attraverso il consumo di pesci, gamberi, molluschi e

anfibi o con colture irrigate con acqua contaminata (White *et al*., 2007; Berry e Lind, 2010; Kinnear, 2010; Ferrão-Filho e Kozlowsky-Suzuki; 2011), può causare gastroenteriti con diarrea sanguinolenta per lesioni alle pareti intestinali, epatiti con danni agli epatociti, emorragie, disfunzioni renali e grave disidratazione con perdita di proteine, elettroliti, glucosio e chetoni con le urine (Wiegand *et al*., 2005).

Tuttavia, nell'esposizione ad alte dosi, CYN si dimostra citotossica, con una tossicità ritardata che coinvolge più organi, principalmente il fegato e i reni, mentre più raramente sono interessati intestino, cuore, polmoni, milza e timo (Funari e Testai, 2008b; Kinnear, 2010).

A livello epatico il danno è localizzato a livello centrolobulare, con vacuolizzazione degli epatociti e aumentata pigmentazione dei nuclei e del citoplasma, mentre a livello renale si realizzano infiammazione interstiziale, necrosi, aumento della sezione dei tubuli prossimali e alterazioni glomerulari (Chernoff *et al*., 2010; Achene, 2011).

Il meccanismo d'azione di CYN è l'inibizione irreversibile della sintesi proteica glutatione-coniugata e probabilmente la tossina inibisce la traduzione ribosomiale attraverso il legame ad una proteina associata con il sistema di traduzione eucariotica. A dosi più alte domina invece un processo più rapidamente tossico, metabolismo-dipendente, mediato da metaboliti citocromo P-450-generati. Infatti CYN è pro-genotossico e l'attivazione del citocromo P-450 è essenziale per la sua attività genotossica (Froscio *et al*., 2001; Humpage *et al*., 2005; Froscio *et al*., 2008; Funari e Testai, 2008b; Štraser *et al*., 2011).

Nelle cellule metabolicamente competenti si evidenziano rotture del DNA, effetti clastogenici e aneugenici (Humpage *et al*., 2000, 2005).

Inoltre CYN induce un incremento dell'espressione di geni della proteina tumorale 53 (p53), che ha funzione di soppressore tumorale attraverso l'arresto del ciclo cellulare, la riparazione del DNA danneggiato e l'apoptosi. CYN ha anche capacità di trasformazione e studi sui roditori indicano che potrebbe agire come attivatore iniziale tumorale (*tumor-initianting*) (Humpage *et al*., 2005; Zegura *et al*., 2011).

Studi recenti evidenziano che CYN potrebbe agire anche come interferente endocrino, inibendo la produzione di HCG e progesterone, con conseguente alterazione del rapporto progesterone/estrogeni nelle donne (Young *et al*., 2008).

Infine, la somministrazione in animali di laboratorio in gestazione ha evidenziato riduzione della prole, nascita di animali prematuri e sottopeso, con sanguinamento del tratto gastrointestinale, e mortalità perinatale. I nuovi nati permangono di peso ridotto per 1 anno e mezzo dopo la nascita (Chernoff *et al*., 2010).

12.4. Anatossine

L'anatossina-a (ANA-a) e l'homo-anatossina-a (homo-ANA-a) sono alcaloidi a basso peso molecolare (165 Da) ad azione neurotossica.

ANA-a, identificata nel 1960 in Canada in *Anabaena flos-aquae,* da cui la tossina ha preso il nome, è prodotta anche da diversi ceppi di cianobatteri quali *Anabaena, Planktothrix* (*Oscillatoria*), *Aphanizomenon, Cylindrospermum, Phormidium* e *Microcystis* spp.. Successivamente è stata rilevata anche in America ed Europa, Italia compresa, spesso implicata in casi di mortalità di bestiame, di uccelli e di cani che si erano abbeverati con acqua contaminata (James *et al*., 2007; Puschner *et al*., 2008).

Homo-ANA-a, analogo di ANA-a, isolata per la prima volta da *Planktothrix* (*Oscillatoria) formosa* in Norvegia, viene rilevata meno frequentemente di ANA-a e spesso ad essa associata; è stata recentemente segnalata in Irlanda e Giappone in colture di *Planktothrix* (*Oscillatoria)* e *Raphidiopsis* (James *et al*., 2007).

Fioriture di *Anabaena flos-aquae*, campionati in Canada nel 1970, hanno portato alla scoperta di anatossina-a(s). ANA-a(s) ha determinato segni simili di avvelenamento da ANA-a ,

ma ha anche prodotto grave salivazione e lacrimazione, e talvolta cromodacriorrea (lacrime di sangue) negli animali da laboratorio (James *et al*., 2007).

Dal punto di vista chimico ANA-a è un alcaloide ammino biciclico, definito come 2-acetil-9-azabiciclo(4.2.1)non-2-ene, mentre l'homo-anatossina-a è un analogo dell'ANA-a dove il gruppo propionilico in posizione C2 sostituisce il gruppo acetilico (figura 63) (Armesto Arbella *et al*., 2007).

Oltre a queste tossine, i cianobatteri possono produrre molti altri metaboliti, tra cui prodotti di degradazione tossici, quali epossianatossina-a (epossiANA-a) e diidroanatossina-A (H_2ANA-a) (Sanchez et al., 2014).

ANA-a ha un NOAEL stimato di 100 μg/kg p.v. e la DL_{50} nel topo per via i.p. è di 375 μg/kg p.v. (> a 5000 μg/kg p.v. per via orale), con morte per paralisi muscolare e insufficienza respiratoria in un tempo molto breve, mentre per homo-ANA-a la DL_{50} i.p. è di 250 μg/kg p.v. (Metcalf e Codd, 2004; Falconer, 2008).

La ANA-a(s) ha una struttura chimica diversa, essendo un estere fosforico della N-idrossiguanidina (figura 63), strutturalmente correlato con gli insetticidi organofosforici e con una e una DL_{50} nel topo di 20 μg/kg p.v. se somministrata per via i.p.(tempo di sopravvivenza 5-30 minuti) (Metcalf e Codd, 2004; Falconer, 2008).

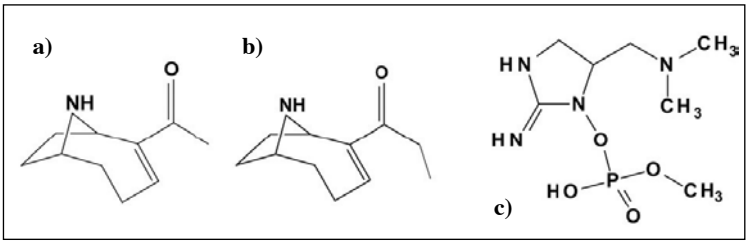


Figura 63: Struttura chimica della ANA-a (a), della homo-ANA-a (b) e della ANA-a(s) (c).

L'ANA-a e homo-ANA-a sono potenti agonisti nicotinici colinergici pre- e post-sinaptici. ANA-a è circa 50 volte più potente della nicotina e circa 20 volte più potente di acetilcolina, si lega stabilmente ai recettori nicotinici dell'acetilcolina nel SNC, periferico e nelle giunzioni neuromuscolari, con apertura del canale del sodio, depolarizzazione di membrana e conseguente contrazione muscolare. Il legame tra ANA-a e recettore nicotinico non è suscettibile all'idrolisi dell'enzima acetilcolinesterasi e pertanto si determina una continua stimolazione del tessuto muscolare, blocco della trasmissione dell'impulso nervoso e, nel caso di avvelenamento acuto, ciò può determinare la morte per paralisi muscolare e asfissia (Volterra, 1997).

L'ANA-a(s) invece inibisce in modo irreversibile l'attività dell'acetilcolinesterasi, ma solo a livello del sistema nervoso periferico (giunzioni neuromuscolari). A causa del blocco dell'idrolisi, l'acetilcolina si accumula con conseguente ipereccitabilità nervosa (Mahmoond e Carmichael, 1986b, 1987).

La presenza di ANA-a nelle acque, determinata dalle fioriture delle specie produttrici, oltre ai danni per la salute umana, è spesso causa di morie ittiche, di anatidi e mammiferi domestici e selvatici. Negli animali si rilevano a fascicolazioni, collasso, respirazione addominale, cianosi, convulsioni e morte rapida, spesso entro 30 minuti. Mancano solitamente lesioni macroscopiche o istologiche (Falconer, 2002; Puschner *et al*., 2008; Stewart *et al*., 2008).

Figura 64: Cartelli di divieto nei laghi contaminati da cianobatteri.

Per fortuna, luce e pH alcalino, così pure l'utilizzo di solfato di rame, causano una rapida degradazione di ANA-a, con un tempo di dimezzamento di 1-2 ore, e, in fioriture naturali di laghi eutrofici, l'emivita ANA-a è calcolata tipicamente in meno di 24 ore (James *et al*., 2007; Westrick, 2008).

Preoccupante risulta la rilevazione di ANA-a in integratori alimentari contenenti cianobatteri (soprattutto *Spirulina* e *Aphanizomenon*) commercializzati con presunte proprietà salutari per consumo animale e umano (Rellán *et al*., 2009).

Al contrario, di estremo interesse è l'utilizzo di ANA-a come sonda farmacologica utile nel fornire informazioni sul meccanismo della neurotrasmissione acetilcolina-mediata e sugli stati patologici associati con le anomalie in questa importante via di segnalazione. Infatti, derivati sintetici, a tossicità ridotta, possono essere utilizzati per la cura di sindromi degenerative delle fibre colinergiche, quali il morbo di Alzheimer, la miastenia grave, la distrofia muscolare e la malattia di Parkinson (Bruno e Viaggiu, 2001; Armesto Arbella *et al*., 2007).

12.5. Dermatossine

Lyngbyatossina-a, aplysiatossina, debromoaplysiatossina sono state isolate nelle acque superficiali contaminate con cianobatteri dei generi *Lymgbya, Oscillatoria* e *Schizothrix* (Cardellina *et al*, 1979; Purkayastha *et al*.; 2010) soprattutto in Florida, Stati Uniti, Giappone, Hawaii e Australia (Burns, 2008; Osborne e Shaw, 2008).

Lyngbyatossina-a (LYA) viene prodotta da cianobatteri di origine marina (*Moorea producens* chiamata precedentemente *Lyngbya majuscula*) e di acqua dolce (*L. wollei*) (Bridgeman e Penamon, 2010). Chimicamente definita alcaloide derivato dall'indolo (figura 65), è una tossina di basso peso molecolare (437 Da) e con una DL_{50} nel topo di 250 μg/kg (per *os*) (Ito *et al*., 2002).

Prodotta come secrezione difensiva dei cianobatteri, la sua presenza è collegata alla comparsa nell'uomo, 3-20 ore dalla balneazione, di dermatite caratterizzata da prurito, arrossamento, bruciore e vesciche cutanee. Gravi infiammazioni orali e congiuntiviti avvengono per contatto con le mucose, sintomi asmatici per aerosolizzazione, mentre mal di testa e sintomatologia gastrointestinale insorgono per contemporanea assunzione del cianobatterio intatto con l'acqua (Osborne *et al*. 2000; Osborne e Shanw, 2008; Rzymski e Poniedzialek, 2012; Joob e Wiwanitkit, 2014).

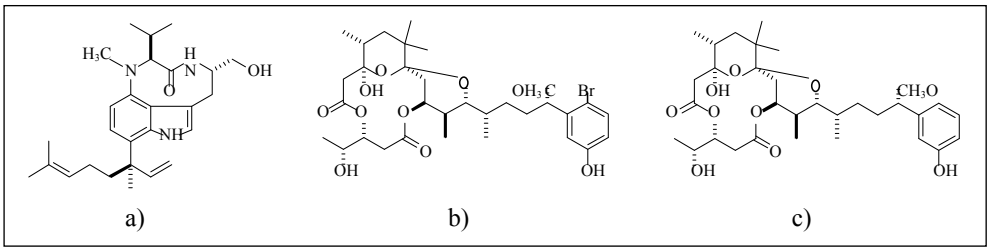


Figura 65: Struttura chimica di Lyngbyatossina-a (a), aplysiatossina (b) e debromoaplysiatossina.

Lyngbyatossina-a agisce anche come promotore tumorale cutaneo attraverso l'attivazione della proteina chinasi C (PKC), una chinasi multifunzionale che fosforila i residui di serina e treonina di molte proteine (Fujiki *et al*., 1981; Edwards e Gerwich, 2004) e che coordina un'ampia varietà di processi cellulari, compresi quelli coinvolti nello sviluppo, nella memoria, nella proliferazione e nella differenziazione cellulare e nella carcinogenesi (Paul *et al*.; 2007; Sinclair *et al*., 2008).

Recentemente è stato identificato anche un nuovo derivato, 12-epi-lyngbyatossina-a, con tossicità simile a lyngbyatossina-a, anche se con affinità 100 volte più bassa per la proteina chinasi C. Questo suggerisce che il meccanismo di tossicità potrebbe comprendere altre vie di attivazione non-PKC (Jiang *et al*., 2014a).

Aplysiatossina (AT) e debromoaplysiatossina (DAT), sono invece bislattoni fenolici con massa molecolare di 671 e 592 Da rispettivamente e che differiscono tra loro per la presenza o meno di un singolo atomo di bromo (figura 65). AT presenta una DL_{50} di 100-120 μg/kg p.v. nel topo per via i.p. (Ito e Nagai, 2000).

Entrambe possono causare, analogamente alla LYA, irritazione cutanea acuta, con eruzioni cutanee e vesciche per contatto diretto con acqua contaminata e bronchite per inalazione. Inoltre AT e DAT, in quanto attivatori di proteine chinasi C, posseggono proprietà tumorigene (Fujiki *et al*., 1982).

LYA, AT e DAT sembrano accumularsi anche in organismi acquatici e questo può diventare un'ulteriore fonte di rischio di esposizione umana (Capper *et al*., 2005; Rzymski e Poniedzialek, 2012; Jiang *et al*., 2014a).

Recenti studi hanno evidenziato altri analoghi di AT: anidrodebromoaplysiatossina, 3-metossiaplysiatossina e 3-metossidebromoaplysiatossina. I derivati debrominati hanno dimostrato attività antivirale, in particolare contro il virus *Chikungunya*, e potrebbero perciò rappresentare una nuova classe di agenti antivirali (Gupta *et al*., 2014).

Inoltre *Lyngbya* spp. rappresenta, fra i cianobatteri, uno dei gruppi più efficienti produttori di metaboliti secondari, molto importanti dal punto di vista farmaceutico. Tra le sue varie specie, *L. majuscula* è tra i maggiori produttori di biomolecole commercialmente importanti ad attività antibatterica, antimicotica, insetticida, e inibitoria enzimatica (Zanchett e Oliveira-Filho; 2013; Shaala *et al*., 2013; Kumar, 2014). Inoltre un analogo di aplysiatossina, aplog-1, presenta azione antiproliferativa e viene attualmente utilizzato nella terapia tumorale (Irie *et al*., 2012).

12.6. Endotossine lipopolisaccaridiche (LPS)

Le endotossine lipopolisaccaridiche (LPS) sono componenti esterni delle membrane cellulari della maggior parte dei cianobatteri e dei batteri Gram-negativi dove formano complessi con proteine e fosfolipidi. La molecola è costituita da un glicolipide interno (lipide A), un *core* oligosaccaridico e una specifica catena polisaccaridica (catena O) (figura 66) (Weirich e Miller, 2014).

Tra i batteri la subunità esterna presenta una maggiore diversificazione ed è alla base della specifica sierologia, ma anche il lipide A è variabile. Nei cianobatteri le endotossine LPS si diversificano da quelle dei batteri soprattutto per la presenza di gruppi fosfato e sono meno potenti delle tossine prodotte dai batteri gram negativi (Sivonen e Jones, 1999).

La LD_{50} per i topi per via orale varia da 40 mg/kg a 425 mg/kg (per *M. aeruginosa* DL_{50} è di 50 mg/kg) (Stewart *et al*., 2006).

Mentre nei batteri Gram-negativi il lipide A è ritenuta la porzione che determina la tossicità, questo non è ancora stato dimostrato per i cianobatteri. In ogni caso le endotossine LPS sono coinvolte nella irritazione e sensibilizzazione cutanea, come pure nella sintomatologia respiratoria (tosse, mal di gola, brividi e febbre) che spesso si verificano in concomitanza delle fioriture di cianobatteri (Funari e Testai, 2008b).

Tuttavia, non sono direttamente tossiche, ma il legame con recettori di transmembrana determina l'avvio di una cascata di risposte, tra cui il rilascio di citochine e altri mediatori dell'infiammazione, la stimolazione di monociti e macrofagi, l'aggregazione di neutrofili e piastrine nei microcapillari con conseguenti lesioni vascolari (Stewart *et al*., 2006).

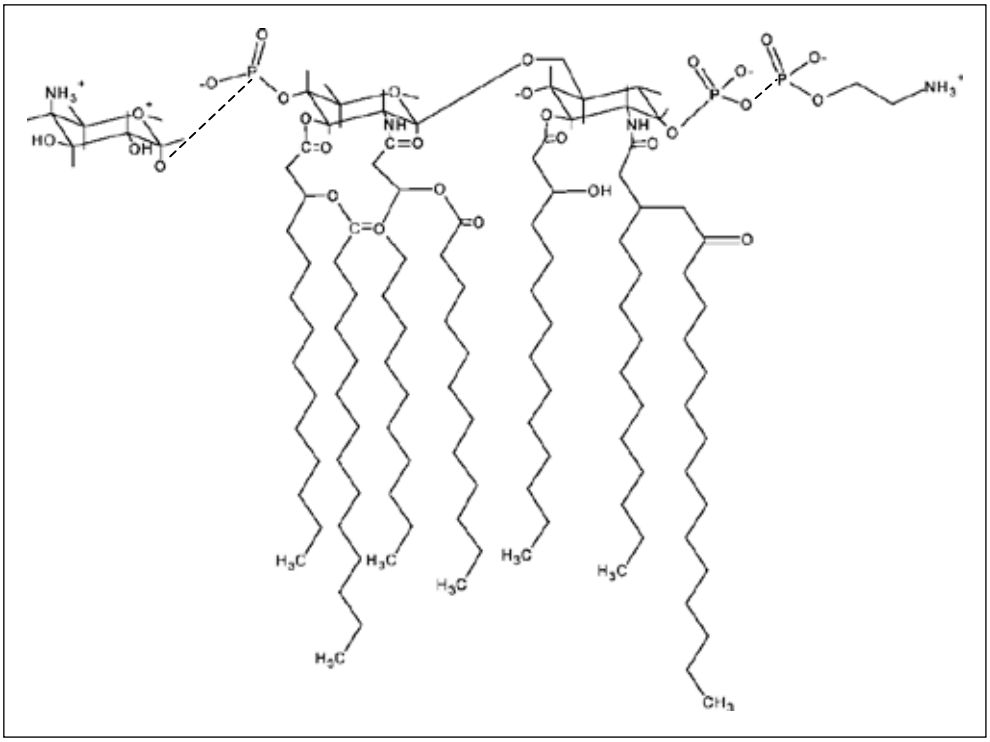


Figura 66: Struttura chimica generale della endotossina lipopolisaccaridica.

12.7. ß-metilamino alanina (BMAA)

ß-N-metilamino-L-alanina (BMAA) (figura 67) è un amminoacido, non proteico, ad attività neurotossica, originariamente isolato da una pianta, *Cycas circinalis*, presente nell'isola di Guam nell'India meridionale (figura 68). Dai semi della pianta si ottiene una farina utilizza-

ta dalle popolazioni locali nei periodi di carestia. Tuttavia è nota la tossicità di tale alimento, che necessita di trattamenti specifici (lavature) prima di poter essere consumato e comunque, se assunto regolarmente, provoca danni anche gravi all'organismo, come malattie neurodegenerative tra le quali la malattia di Alzheimer, la sclerosi laterale amiotrofica/demenza di Parkinson complex (ALS/PDC) (Sinclair *et al*., 2008; Humpage, 2008; Brand *et al*., 2008).

Alcune specie di *Nostoc* simbiotici, associati con le radici di *Cycas*, producono BMAA che si accumula nei semi della pianta. Gli indigeni locali inoltre nutrono volpi volanti (pipistrelli della frutta) e maiali selvatici con questi semi e, attraverso il consumo delle loro carni dove la tossina risulta concentrata, si intossicano ulteriormente (biomagnificazione) (figura 63) (Sinclair *et al*., 2008; Holtcamp, 2012).

Benché BMAA sia più comune nelle specie di *Nostoc*, sembra che sia presente in quasi tutte le specie di cianobatteri sia di acque dolci che marine, come amminoacido libero o legato alle proteine (Cox *et al*., 2005).

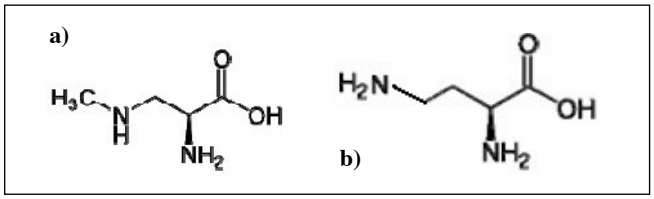


Figura 67: ß-N-metilamino-L-alanina (BMAA) (a) e acido 2,4-diamino-butirrico (DABA) (b).

Infatti BMAA è stato successivamente individuato in cianobatteri isolati da fioriture e di laboratorio, provenienti da fonti marine e di acqua dolce e da località di tutto il mondo tra cui: Iraq, Qatar, Hawaii, Florida, Cina, Regno Unito, Sud Africa, Paesi Bassi e Svezia (Ferrão-Filho e Kozlowsky-Suzuki; 2011). È stato altresì evidenziato, che BMAA può essere prodotto anche da diatomee e dinoflagellate (Jiang e Ilag, 2014; Jiang *et al*., 2014b).

Studi recenti hanno dimostrato che si verifica bioaccumulo di BMAA sia nello *zooplancton* che sia nutrito di cianobatteri, come pure in specie ittiche bentoniche, in molluschi e gamberi che si siano alimentati di zooplancton, con conseguente ulteriore rischio di esposizione per la salute umana (Ferrão-Filho e Kozlowsky-Suzuki; 2011; Al-Sammak *et al*., 2014).

Esso è stato inoltre rilevato nel cervello di malati di Alzheimer o con patologie degenerative che non avevano consumato né farina di *Cycas* né carni di volpi volanti. Si ritiene pertanto che questi pazienti possano aver assunto la tossina attraverso l'acqua potabile contaminata da fioriture di cianobatteri o attraverso il consumo di alimenti di origine marina (Murch *et al*., 2004a, 2004b; Pablo *et al*., 2009).

Infine, recenti studi eseguiti sui ratti, evidenziano che l'esposizione prenatale e neonatale a BMAA determinano l'assorbimento selettivo della tossina nell'ippocampo e *deficit* di apprendimento e di memoria nei ratti adulti (Karlsson *et al*., 2009, 2011, 2012).

BMAA sembra agire sia come agonista glutaminergico a livello dei recettori N-metil-D-aspartato (NMDA) che determinando la produzione di molecole reattive contenenti ossigeno (ROS) che conducono a stress mitocondriale e danno del DNA (Chiu *et al*., 2012; Weirich e Miller, 2014).

Lo stesso potenziale tossico di BMAA sembra essere presente nell'acido 2,4-diamino-butirrico (DABA), amminoacido non proteico, BMAA-isomero (Figura 67) (Al-Sammak *et al*., 2014).

Figura 68: Cycas circinalis, *suoi semi e volpi volanti, piatto tipico degli indigeni Chamorro di Guam.*

13 PRINCIPALI METODI DI RILEVAZIONE DELLE BIOTOSSINE ALGALI

Biotossine	*Tipologia di metodica*	*Metodo di rilevazione*	*LMR (ppb)*	*Caratteristiche*	*Riferimenti bibliografici*
PARALYTIC SHELLFISH POISONING					
Saxitossine e Gonyautossine	Metodi biologici	*Biotest* sul topo (MBA)	370	Metodo di riferimento CE (Reg. 2074/05 e 1664/06). Rileva la reale tossicità del campione, rapido, semplice, non discrimina le diverse tossine coinvolte, problemi di sottostima/sovrastima tossicità. Risvolti etici	AOAC 959.08
	Metodi biomolecolari	Saggi recettore-canale	20	Rilevano la reale tossicità del campione, aspecifici, richiedono isotopi radioattivi	Louzao *et al*., 2004 Van Dolah *et al*., 2012
		Saggi citotossicologici	30	Rilevano la reale tossicità del campione, aspecifici, risultati insoddisfacenti nei test interlaboratorio	Manger *et al*., 1995
		ELISA indiretta	50	Rilevano la reale tossicità del campione, aspecifici, utili come test di screening	Oshiro *et al*., 2006 Dubois *et al*., 2010
		Biosensori SPR	10	Rapidi, sensibili, utili come test di screening	Campbell *et al*., 2011
	Metodi chimici	LC-FLD post-colonna	0,5-25	Rilevazione delle diverse tossine separatamente	AOAC 2011.02 - P COX van de Riet *et al*., 2011
		LC-FLD pre-colonna	0,1-1	Validato. Metodo di riferimento CE (Reg. 2074/05 e 1664/06). Minore separazione delle tossine, sensibile, preparazione del campione più lunga e complessa	Metodo Lawrence AOAC 2005.06
		HILIC-MS/MS	0,1-0,6	Separazione delle diverse tossine, sensibile	Dell'Avesano *et al*., 2005 Diener *et al*., 2007b
NEUROTOXIC SHELLFISH POISONING					
Brevetossine	Metodi biologici	*Biotest* sul topo (MBA)	200	Metodo storicamente utilizzato, non quantitativo, aspecifico	APHA, 1970
	Metodi biomolecolari	Saggi recettore-canale	30	Rilevano BTX tipo 2, sottostima BTX tipo 1	Bottein Dechraoui *et al*., 2007a; Fire *et al*., 2008
		Saggi citotossicologici	250	Rilevano la reale tossicità del campione, aspecifici	Plakas e Dickey, 2010
		ELISA indiretta	25	Rilevano la reale tossicità del campione, aspecifici, utili come test di screening	Naar *et al*., 2002 Poli *et al*., 2007 Zhou *et al*., 2010
	Metodi chimici	ESI-MS/MS	1	Sensibile e specifico	Ishida *et al*., 2004

Biotossine	*Tipologia di metodica*	*Metodo di rilevazione*	*LMR (ppb)*	*Caratteristiche*	*Riferimenti bibliografici*
DIARRHETIC SHELLFISH POISONING					
Acido ocadaico, Dinofisitossine, Pectenotossine e Yessotossine	Metodi biologici	*Biotest* sul topo (MBA)	200	Aspecifico, viene utilizzato per tutte le tossine DSP e anche per AZA, BTX, CI, PLTX, CTX, AT, LYT	Yasumoto *et al*., 1984
	Metodi biomolecolari	Saggi recettore-canale	2-10	Aspecifico, non discrimina le diverse tossine	Tubaro *et al*., 1996 Gonzales *et al*., 2002
		Saggi funzionali (E-caderina)	100	Per YTX, aspecifico, non discrimina le diverse tossine, anche per AZA tossine	Pierrotti *et al*., 2003, 2007 Leira *et al*., 2003 Rossini *et al*., 2005
		ELISA indiretta	10	Per OA e DTX, monoclonale, semplice, veloce, sensibile, non riesce a rilevare tutte le tossine	Hu *et al*., 2010
		ELISA indiretta	150	Per YTX, policlonale, non riesce a rilevare tutte le tossine	Briggs *et al*., 2004
		Biosensori SPR e recettoriali	10	Rapidi, sensibili, utili come test di screening	McGranth *et al*., 2012 Fournel *et al*., 2012
	Metodi chimici	LC-FLD	100	Per OA e DTX	Lee *et al*., 1987
		LC-MS/MS	40 80 100	OA e DTX PTX YTX Metodo ufficiale UE (R. 15/2011). Validato	McNabb *et al*., 2005 Gerssen *et al*., 2009a Villar-Gonzáles *et al*., 2011
AZASPIRACID SHELLFISH POISONING					
Azaspiracidi	Metodi biologici	*Biotest* sul topo (MBA)	200	Aspecifico	Yasumoto *et al*., 1984
	Metodi chimici	LC-MS/MS	50	Metodo ufficiale UE (R. 15/2011). Validato	McNabb *et al*., 2005
INTOSSICAZIONE DA IMMINE CICLICHE					
Immine cicliche	Metodi biomolecolari	Saggi recettore-canale	80	Aspecifico, non discrimina le diverse tossine	Vilariño *et al*., 2009 Fonfría *et al*., 2010
	Metodi chimici	ESI-MS/MS	1-20	Metodi multitossine lipofile	Fux *et al*., 2007 Gerssen *et al*., 2009a Miles *et al*., 2010

Biotossine	*Tipologia di metodica*	*Metodo di rilevazione*	*LMR (ppb)*	*Caratteristiche*	*Riferimenti bibliografici*
INTOSSICAZIONE DA PALITOSSINA					
Palitossina	Metodi biologici	*Biotest* sul topo (MBA)	50	Difficoltà di interpretazione dei risultati	Taniyama *et al*., 2002
	Metodi biomolecolari	Saggi emolitici	50	Aspecifico, non discrimina le diverse tossine	Aligizaki *et al*., 2008, 2011; Riobó *et al*., 2008
		Saggi citotossici	50	Specifico	Bellocci *et al*., 2008 Espiña *et al*., 2009 Pelin *et al*., 2012
		ELISA	1-40	Interferenza matrice	Garet *et al*., 2010a Boscolo *et al*., 2013
	Metodi chimici	LC-MS/MS	36	Specifico, problemi di purificazione del campione	Ciminiello *et al*., 2008 Rossi *et al*., 2010
AMNESIC SHELLFISH POISONING					
Acido domoico	Metodi biologici	*Biotest* sul topo (MBA)	40 ppm	Non rileva il limite di legge, non applicabile per la verifica della conformità dei molluschi	AOAC 959.08 Quilliam e Wright, 1989
	Metodi biomolecolari	ELISA diretta	3	Metodo di *screening* ufficiale (Reg. 1244/07), sensibile, validato	AOAC 2006.02
	Metodi chimici	HPLC-UV (Lawrence)	1 ppm	Metodo ufficiale (Reg. 2074/05), validato	AOAC 991.26
		HPLC-UV (Quilliam)	0,2 ppm	Raccomandato Codex Alimentarius, validato	Quilliam *et al*., 1995
		LC-MS/MS	15	Metodo multitossina, rileva contemporaneamente altre tossine lipofile	McNabb *et al*., 2005 Ciminiello *et al*., 2005
		TLC	10 ppm	Semplice e non necessita di strumentazione complessa. Rileva le tossine al di sotto dei limiti di legge	Quilliam *et al*., 1998
CIGUATERA FISH POISONING					
Ciguatossine	Metodi biologici	*Biotest* sul topo (MBA)	0,56	Aspecifico	Yasumoto *et al*., 1984
	Metodi biomolecolari	Saggi recettore-canale	0,039	Aspecifico, utilizza isotopi radioattivi, utilizzato dai laboratori FDA degli Stati Uniti	Bottein Dechraoui *et al*., 2005
		Saggi citotossici	0,002	Utilizzato anche per rilevare brevetossine	Manger *et al*., 1995 Bottein Dechraoui *et al*., 2007b
		ELISA diretta	0,002	Monoclonale, specifica per tossine CTX	Campora *et al*., 2008a, b
		Saggio membrana *immunobead* (MIA)	0,032	*Stick test*, interpretazione variabile, non validato	Hokama *et al*., 1998a
	Metodi chimici	LC-MS/MS	< 1	Separazione delle diverse tossine. Utilizzati come metodi di conferma	Lewis *et al*., 2009 Stewart *et al*., 2010

Biotossine	*Tipologia di metodica*	*Metodo di rilevazione*	*LMR (ppb)*	*Caratteristiche*	*Riferimenti bibliografici*
TETRODOXIN SHELLFISH POISONING					
Tetrodotossine	Metodi biologici	*Biotest* sul topo (MBA)	200	Aspecifico, bassa sensibilità	Yasumoto, 1991
	Metodi biomolecolari	ELISA indiretta	5-10	Sensibili e specifici	Tao *et al*., 2010 Stokes *et al*., 2012
		Biosensori SRP	20	Rilevazione rapida, specifici	Campbell *et al*., 2013
		Fluidic Force Discrimination (FFD)	15 ng/ml	Rapido, applicabile a matrici complesse	Plankas e Dickey, 2010 Yales *et al*., 2010
	Metodi chimici	HPLC-UV	5 ng/ml	Non impiegato su campioni biologici	Yu *et al*., 2010
		HPLC-FLD	20 ng/ml	Non impiegato su matrici complesse	O'Leary *et al*., 2004
		HILIC-MS/MS	0,1 ng/g-ml	Sensibile, anche per matrici complesse	Diener *et al*., 2007a Fog *et al*., 2011

LMR: limite di rilevazione; SPR: risonanza plasmonica di superficie; LC-FLD post-colonna: cromatografia a fase inversa con ossidazione alcalina post-colonna e rilevazione in fluorescenza; LC-FLD pre-colonna: cromatografia a fase inversa con ossidazione alcalina pre-colonna e rilevazione in fluorescenza; HILIC-MS/MS: cromatografia a interazione idrofilica in combinazione con la spettrometria di massa; ESI-MS: cromatografia liquida con modalità di ionizzazione *elettrospray* associata a cromatografia di massa; LC-MS/MS: cromatografia liquida associata a spettrometria di massa; TLC: cromatografia su strato sottile

METODI DI ANALISI PER LE CIANOTOSSINE

Metodo di rilevazione	Tossine	Limite di rilevazione	Caratteristiche	Riferimenti bibliografici
METODI BIOLOGICI				
***Biotest sul topo* (MBA)**	MC, NOD, CYN, AT, LYT	50-500 µg/kg	Rileva tutte le cianotossine, non selettivo, bassa sensibilità e precisione. Risvolti etici	Yasumoto *et al*., 1984 Bláha e Maršálek, 2000 Testai e Mattei, 2008
METODI BIOMOLECOLARI				
Saggi recettoriali	MC, NOD	0,1-0,25 µg/L	Colorimetrici, sensibili, aspecifici, costosi	Bouaicha *et al*., 2002
ELISA policlonale	MC, NOD, CYN	0,6-2,5 µg/L	Colorimetrica. Sensibile, rapida. *Cross*-reattività variabile	McElhiney e Lawton, 2005 Bláhová, *et al*., 2009
ELISA monoclonale	MC, NOD, CYN	0,1 µg/L	Sensibile, rapida, costosa. Cross-reattività variabile.	Zeck *et al*., 2001
ELISA policlonale	CYN	0,04 µg/L	Rapida e sensibile	Bláhová, *et al*., 2009
ImmunoStrip	MC, NOD	10 µg/L	Semplice, rapido, sensibile	Lawton *et al*., 2010
Biosensori elettrochimici	MC, NOD	0,1 µg/L	Rapido, sensibile, portatile	Zhang *et al*., 2007 Zao et al., 2013
Biosensori SPR	MC, NOD	0,02 µg/L	Altamente sensibile.	Herranz *et al*., 2010 Hu *et al*., 2009
METODI CHIMICI				
HPLC-UV/PDA	MC, NOD, CYN	0,25-100 µg/L	Selettività in funzione della separazione cromatografica, richiede purificazione campione	ISO 20179 Lawton *et al*., 1994 Spoof *et al*., 2010 Triantis *et al*., 2010
LC-MS/MS	MC, NOD, CYN	0,002-0,017 µg/L	Sensibile e selettiva. Analisi quantitativa e contemporanea di diverse microcistine	Meriluoto *et al*., 2004 Oehrle *et al*., 2010
LC-MS/MS	CYN	0,3 µg/L	Sensibile e selettiva. Analisi diretta	Bogialli *et al*., 2006b Guzmán-Guillén *et al*., 2012
LC-ESI-MS	MC, NOD	50 ng/L	Anche altre tossine lipofile	Barco *et al*., 2002
MALDI-TOF	MC, NOD, CYN	0,1-0,5 µg/L	Rilevazione simultanea di diverse tossine, specifico, interferenze matrice.	Welker *et al*., 2008
GC/MS	MC	140 µg/kg	In matrici complesse. Rilevamento UV. Bassa sensibilità, processo lungo.	Suchy e Berry, 2012
TLC	MC	0,01 µg/kg	Bassa sensibilità, rapido, semplice, economico	Pelander *et al*., 2000
HPLC-PDA	ANA-a e analoghi	0,05 µg/L	Richiede purificazione del campione	Gugger *et al*., 2005
HPLC-FLD	ANA-a e analoghi	0,01 µg/L	Richiede purificazione del campione e derivatizzazione	James *et al*., 1998
LC-MS/MS	ANA-a e analoghi	0,008-0,2 µg/L	Sensibile e selettiva. Analisi quantitativa. Rileva anche altre tossine lipofile	Dimitrakopoulos, *et al*., 2010; Bogialli *et al*., 2006a
TLC	ANA-a e analoghi	10 µg/L	Analisi diretta, rapida	Ojanpera *et al*., 1991

HPLC-UV/PDA: cromatografia a fase inversa con rilevazione a serie di diodi; LC-ESI-MS: cromatografia liquida accoppiata alla spettrometria di massa con ionizzazione *elettrospray*; MALDI-TOF: desorbimento/ionizzazione laser assistita da matrice (MALDI) con analizzatori *Time of Flight*; GC: gas cromatografia; FLD: rilevazione in fluorescenza; TLC: cromatografia su strato sottile.

14. NORMATIVA DI RIFERIMENTO

Nell'Unione Europea la prevenzione e il controllo delle biotossine algali sono normate dai Regolamenti CE 853/2004 (norme specifiche in materia di igiene per gli alimenti di origine animale) e 854/2004 (organizzazione dei controlli ufficiali sui prodotti di origine animale destinati al consumo umano).

In particolare il Reg. 853/2004 prescrive all'allegato III, sezione VII, i requisiti generali per l'immissione sul mercato, i requisiti igienici applicabili alla produzione, raccolta e trattamento e i requisiti dei centri di stabulazione, di depurazione e di spedizione per i molluschi bivalvi.

Nell'alleg. III, sez. VII, capitolo V, sono altresì indicate le norme sanitarie previste per i molluschi bivalvi e, al punto 2, i limiti previsti per talune biotossine marine.

I molluschi non devono contenere biotossine marine in quantità totali (misurate nel corpo intero o nelle parti consumabili separatamente) superiori ai seguenti limiti (figura 69):

a) PSP ("*Paralytic Shellfish Poisoning*"): 800 μg/kg;
b) ASP ("*Amnesic Shellfih Poisoning*"): 20 mg/kg acido domoico;
c) acido ocadaico, dinofisitossine e pectenotossine complessivamente: 160 μg di eq. OA/kg;
d) yessotossine: 3,75 mg di eq. YTX/kg (Reg. CE 786/2013);
e) azaspiracidi: 160 μg di eq. AZA/kg.

Le modalità di attuazione dei Reg. 853/2004 e 854/2005, per quanto riguarda i metodi di analisi riconosciuti per le biotossine marine, sono definite nel Reg. CE n. 2074/2005, modificato dal Reg. 1664/2006 (tossine PSP), dal Reg. CE 1244/2007 (tossine ASP) e dal Reg CE n.15/2011 (tossine lipofile) (figura 69).

Sempre nel Reg. 853/2004, all'allegato III, sezione VIII (prodotti della pesca), capitolo V, punto E, è specificato che non devono essere immessi sul mercato i prodotti della pesca ottenuti da pesci velenosi apparteneti alle famiglie *Tetrodontidae*, *Molidae*, *Diodontidae* e *Canthigasteridae*, né prodotti della pesca contenenti ciguatossina o tossine che paralizzano i muscoli.

Il Reg. CE 854/2004 prescrive, al capo II dell'allegato II, i controlli ufficiali sui molluschi bivalvi vivi e, per analogia, sugli echinodermi vivi, sui tunicati vivi e sui gasteropodi marini vivi, provenienti da zone di stabulazione e di produzione classificate.

Tra i parametri da monitorare periodicamente vi è la presenza di *plancton* tossico nelle acque di produzione e di stabulazione e di biotossine nei molluschi bivalvi vivi.

Devono essere definiti piani di campionamento per rilevare la presenza di *plancton* tossico e di biotossine nei molluschi che tengano conto delle possibili variazioni della presenza di *plancton* contenente biotossine marine e della diversa sensibilità delle specie dei molluschi.

Il campionamento periodico ha lo scopo di individuare eventuali cambiamenti della composizione del *plancton* contenente tossine e della relativa distribuzione geografica e, qualora i risultati ottenuti facciano sospettare un accumulo di tossine nella polpa dei molluschi, si procede a un campionamento intensivo. Sui molluschi più sensibili alla contaminazione e provenienti dalla zona in questione, si eseguono prove periodiche di tossicità.

Il prelievo, nel periodo in cui è consentita la raccolta, deve essere di regola settimanale, ma la frequenza può essere aumentata o diminuita a seconda della valutazione del rischio.

Per il monitoraggio del *plancton* nelle acque, i campioni devono essere rappresentativi della colonna d'acqua e devono fornire informazioni sulla presenza di specie tossiche e sulle tendenze in atto all'interno della popolazione esaminata. Qualora i risultati ottenuti evidenzino cambiamenti della popolazione algale verso popolazioni tossiche, sarà necessario aumentare la frequenza dei campionamenti dei molluschi, riclassificare la zona di produzione interessata oppure stabilire la chiusura precauzionale delle zone coinvolte.

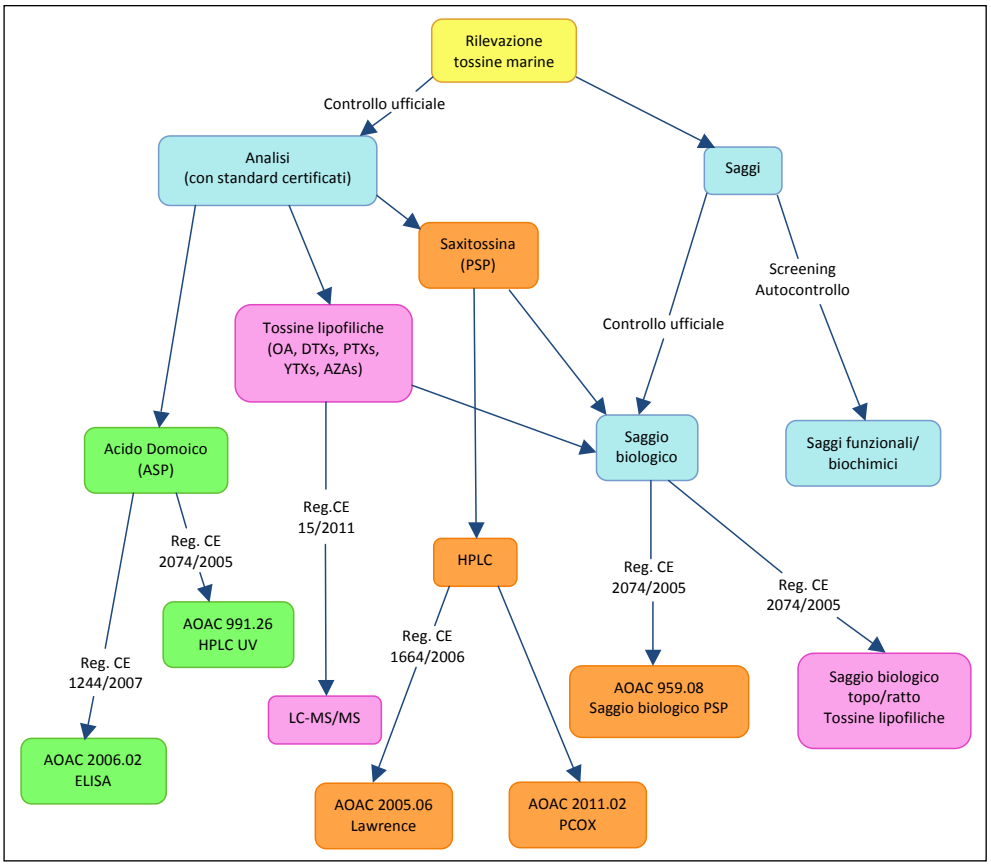


Figura 69: Metodi di rilevazione e normativa di riferimento.

Il sistema deve comprendere il controllo del prodotto finito in tutte le fasi della produzione, della trasformazione e della distribuzione. I molluschi bivalvi, come pure echinodermi, tunicati o gasteropodi marini che contengono biotossine in quantità tali da superare i limiti previsti dal regolamento (CE) n. 853/2004 sono dichiarati non idonei al consumo umano.

Nell'attuale normativa nazionale ed europea non vengono definiti valori soglia per definire la qualità delle acque destinate al consumo umano, né per quanto riguarda la densità per volume di cellule algali, né per le tossine da esse derivanti (Bonadonna e Bottoni, 2011).

L'Organizzazione Mondiale della Sanità (WHO, 1998, 2003) ha invece indicato un valore guida provvisorio per l'acqua potabile di 1,0 μg di MC-LR/L totale (sia disciolta che contenuta nelle cellule algali), oltre il quale si verifica un rischio per la salute umana.

Valori guida di 1,0 μg/L sono stati assunti anche per nodularine, anatossina-a(s), cylindrospermopsina, mentre per anatossina-a e homo-anatossina-a i valori sono di 6,0 μg/L e 2,0 μg/L rispettivamente (Churro *et al.*, 2012).

Il limite di 1,0 μg/L si verifica con un numero di cellule superiore a 2.000/ml quando predomina *Microcystis aeruginosa* o superiore a 15.000 cellule/ml quando altri cianobatteri ri-

sultano prevalenti e presuppone il passaggio dall'azione di monitoraggio di sorveglianza al monitoraggio operativo al fine di determinare e quantificare le tossine eventualmente presenti e valutare la potabilità dell'acqua (figura 70) (Bonadonna e Bottoni, 2011).

Figura 70: Organigramma delle fasi coinvolte nella gestione del rischio dei cianobatteri.

15. CONCLUSIONI

Le fioriture algali e da cianobatteri rappresentano un vasto e complesso problema per i danni che esse provocano alla pesca, all'acquacoltura, agli ecosistemi acquatici e alla salute dell'uomo. Esse rappresentano un tipico esempio di come un problema ambientale diventi anche un problema di sicurezza alimentare.

Lo sviluppo abnorme di alcune specie algali (*Noctiluca scintillans* e *Skeletonema costatum*) provoca una condizione di ipo/anossia che danneggia direttamente la fauna ittica, altre alghe invece producono tossine responsabili di estese morie di pesci, uccelli e animali. Nei pesci, in particolare, influenzano lo sviluppo e la vitalità degli stadi giovanili, sono direttamente tossici per diversi organi bersaglio e determinano alterazione dei meccanismi di trasporto delle cellule branchiali.

Alcuni tipi di alghe infine sono in grado di produrre tossine che, accumulandosi nei prodotti della pesca, possono rappresentare un potenziale pericolo per la salute del consumatore che si alimenti di tali prodotti ittici contaminati. Queste tossine sono dei composti termostabili (non vengono distrutte dai normali processi di cottura e preparazione) e la loro eliminazione richiede settimane di permanenza dei molluschi in acque depurate.

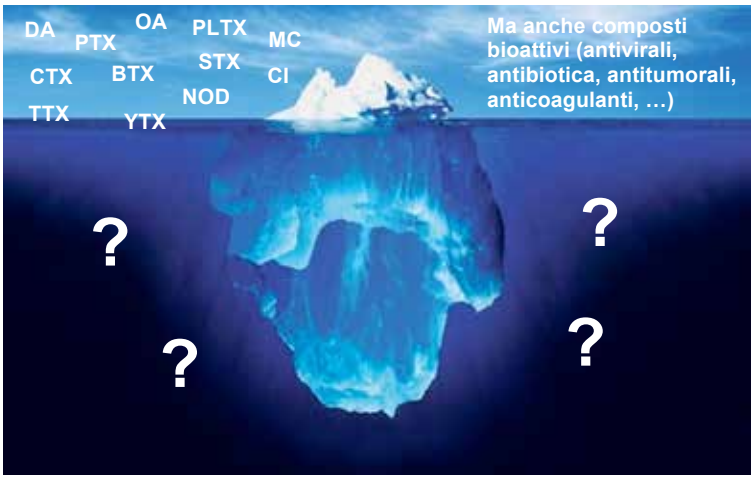


Figura 71: L'iceberg rappresenta figurativamente quanto ci sia ancora da conoscere riguardo alle tossine algali e cianobatteriche.

I fattori che influenzano l'accumulo di ficotossine nei molluschi e nei pesci sono intensamente studiati. Alcune tossine si accumulano regolarmente in determinate specie di molluschi di talune aree geografiche in stagioni ben precise (vedi *Pseudo-nitzschia* nelle cappesante giapponesi in primavera e autunno), ma, in generale, per molte specie algali la previsione dei livelli di contaminazione rimane molto difficile a causa della necessità di valutare una serie di fattori fisici (meteorologici e climatici), chimici (disponibilità di nutrienti, salinità, inquinamento antropologico) e parametri biologici (evoluzione della struttura della comunità algale, presenza di batteri o virus associati) (Anderson *et al*., 2012).

Negli ultimi anni inoltre, a causa dell'aumentata richiesta dei consumatori, si è avuto un incremento nelle importazioni di prodotti ittici da mercati esteri, anche extracomunitari. Poiché molluschi e pesci contaminati si presentano idonei all'ispezione visiva, il riconoscimento della loro potenziale pericolosità necessita dello sviluppo e dell'adozione di metodi di analisi

rapidi, semplici, sensibili e che consentano la determinazione contemporanea di diversi gruppi di tossine. Queste metodiche, peraltro non sempre disponibili, applicate come metodi di *screening* consentirebbero l'immissione sul mercato di prodotti della pesca sufficientemente sicuri.

Oltre a questo, in particolare per evitare il rischio relativo a ciguatossine e tetrodotossine, è altresì auspicabile una più approfondita conoscenza della morfologia dei pesci possibili accumulatori da parte di veterinari e operatori del settore.

É opportuno infine ricordare che le tossine oggetto della presente relazione costituiscono solamente una piccola frazione della moltitudine di tossine acquatiche esistenti in natura, la maggior parte delle quali rimangono ancora scarsamente conosciute. Solo da poco tempo, infatti, sono stati intrapresi studi sistematici per chiarirne l'origine, la natura chimica, gli effetti biologici e i possibili rischi sanitari, sia per l'uomo, legati essenzialmente ad un'eventuale contaminazione delle catene alimentari e delle acque potabili, sia per gli animali domestici e selvatici, che potrebbero risultarne direttamente esposti. È lecito supporre che le problematiche conseguenti alla loro presenza subiranno un continuo ampliamento, coinvolgendo un numero sempre maggiore di operatori sanitari ed economici.

BIBLIOGRAFIA

Nel corso della ricerca bibliografica sono stati raccolti più di 1000 lavori sull'argomento, pertanto la bibliografia è stata omessa per motivi di impaginazione. I dati bibliografici vengono forniti, su richiesta, dall'Autore del capitolo.

ABBREVIAZIONI E ACRONIMI

Ab	Anticorpi
ALS/PDC	Sclerosi laterale amiotrofica/ Demenza di Parkinson complex
AMPA	α-ammino-3-idrossi-5-metil-ossazol-4-propionato
AMPc	Adenosina monofosfato ciclico
ANA-a	Anatossina
AOAC	Association of Official Analytical Chemists
ARfD	Dose Acuta di Riferimento
ASP	Amnesic Shellfish Poisoning
AT	Aplysiatossina
AZA	Azaspiracide
AZP	Azaspiracid Shellfih Poisoning
Bcl-2	B-cell lymphoma 2
BMAA	ß-N-metilamino-L-alanina
BSA	Siero albumina bovina
BTX	Brevetossina
b.w.	Peso Corporeo
CFP	Ciguatera Fish Poisoning
CI	Immine cicliche
CEN	Comité Européen de Normalisation
CRL-MB	Laboratorio Comunitario di Riferimento per le Biotossine Marine
CTX	Ciguatossina
CYN	Cilindrospermopsina
DA	Acido Domoico
DABA	Acido 2,4-diamino-butirrico
DAT	Debromoaplysiatossina
DL_{50}	Dose letale mediana
DM	Decreto Ministeriale
DNA	Acido desossiribonucleico
DSP	Diarrhetic Shellfish Poisoning
DTX	Dinofisitossina
EFSA	European Food Safety Autority
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
eq.	Equivalenti

ERK	Extracellular-signal-regulated kinase
ESI	Ionizzazione electrospray
FAB	Bombardamento con atomi veloci
FAO	Food and Agriculture Organization
FFD	Forza Fluidica di Discriminazione
FLD	Rilevazione in fluorescenza
GABA	γ-amminobutirrico
GB	Gambiertossina
GC	Gas Cromatografia
Glu	Recettore glutammatergico
GMPc	Guanosin monofosfato ciclico
GSK	Glicogeno Sintasi Chinasi
GTX	Gonyautossina
GYM	Gymnodimine
HPCE	Elettroforesi capillare ad alta risoluzione
HILIC	Cromatografia a interazione idrofilica
LC-PDA	Cromatografia a fase inversa con rilevazione a serie di diodi
HPLC	Cromatografia liquida ad alte prestazioni
IARC	Agenzia Internazionale per la Ricerca sul Cancro
JNK	c-Jun N-terminal kinase
KA	Acido cainico
LOAEL	Lowest Observed Adverse Effect Levels
LOD	Limite di rilevazione
LOQ	Limite di quantificazione
LPS	Lipopolisaccaridie
LYA	Lyngbyatossina
MALDI	Desorbimento/ionizzazione laser assistita da matrice
MBA	Saggio biologico sul topo
MAPK	Proteine Chinasi mitogeno-attivate
MC	Microcistina
MIA	Saggio membrana immunobead
MIP	Macrophage Inflammatory Proteins
MS	Spettrometria di massa
MTX	Maitotossina
MU	Unità topo
NOD	Nodularina
NF-kB	Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
NMDA	N-metil-D-aspartato recettori
NO	Ossido nitrico
NOAEL	No Observed Adverse Effect Levels
NOS	Ossido nitrico sintetasi
NSCCs	canali di comunicazione non selettivi
NSP	Neurotoxic Shellfish Poisonin
OA	Acido ocadaico
OATP	Trasporto attivo di anioni organici
OPAC	Organisation for the Prohibition of Chemical Weapons
Ost	Ostreocina
PbTx	Brevetossina
PCB	Policlorobifenili
PCI	Intossicazione da Imine Cicliche
PDA	Fosfodiesterasi
PDA	Rilevazione a serie di diodi
PGE2	Prostaglandina E2
PKC	Proteina Chinasi C
PLA2	Fosfolipasi A2
PLTX	Palitossina
pNPP	Para-nitrofenilfosfato
PnTX	Pinnatossina
PP	Intossicazione da Palitossina
PP1	Protein phosphatase 1
PP2A	Protein phosphatase 2A
ppb	parti per bilione
ppm	parti per milione
PSP	Paralytic Shellfish Poisoning
PtTX	Pteriatossina
PTX	Pectenotossina

p.v.	Peso Vivo
QQQ	Spettrometro di Massa Triplo Quadrupolo
Q-ToF	Quadrupole-Time of Flight
Reg.	Regolamento CE
RBA	Saggio biologico su ratti
RIA	Saggio radioimmunologico
ROS	Molecole reattive contenenti Ossigeno
SELDI	Surface-enhanced laser desorption/ionization
SERS	Spettroscopia Raman amplificata da superfici
SIM	Monitoraggio di ioni selezionati
SM	shellfish meat
SPE	Estrazione su fase solida
SRM	Monitoraggio reazione prescelta
SNC	Sistema Nervoso Centrale
SPR	Risonanza Plasmonica di Superficie
SPX	Spirolide
STX	Saxitossina
TDI	Dose giornaliera tollerabile
TFP	Tetrodotoxin Fish Poisoning
TLC	Thin-layer chromatography
TNF-α	Fattore di Necrosi Tumorale
TOF	Analizzatori a tempo di volo
TPA	phorbol 12-tetradecanoate 13-acetate
TTX	Tetrodotossina
UE	Unione Europea
UHPLC	Cromatografia liquida ad ultra alta prestazione
US FDA	Center for Food Safety and Applied Nutrition, Food and Drug
UV	Rilevazione ultravioletta
VSP	Venerupin Shellfih Poisonig
WHO	World Health Organization
YTX	Yessotossina

Capitolo 4

UTILIZZO DELLE ALGHE IN ALIMENTAZIONE UMANA, ZOOTECNIA, AGRICOLTURA, FARMACOLOGIA E COSMESI, ENERGIE ALTERNATIVE, EDILIZIA E ALTRI USI

MAURIZIO ZAVANELLA[1], CLAUDIO MACCA[2], DANIELA DAGRADI[3]

LE ALGHE MULTIVALENTI NELLA COLTURA ANTICA E MODERNA DEI POPOLI ASIATICI

CONSIDERAZIONI
GENERALI
SULLE ALGHE
e da un'Appendice sulle Alghe
GIO. DOMENICO D.r NARDO
VENEZIA
DAI TIPI DI GIUSEPPE ANTONELLI

È noto fin dai testi del XIX secolo (De Nardo, 1835, nella foto) che le popolazioni costiere dell'Asia da sempre consideravano le alghe marine un cibo pregiato da raccogliere e consumare al pari dei vegetali coltivati, sottoponendole a diversi metodi di cottura. Ed è pure naturale che, davanti a tanta abbondanza depositata dal mare sulle spiagge, queste genti, con lo sviluppo dell'agricoltura, ne abbiano tratto vantaggio per concimare i campi, come foraggio per gli animali allevati o, in mancanza di legname, come materiale edilizio per coprire i tetti delle case.

Probabilmente, dopo l'uso alimentare, certe specie di alghe sono entrate pian piano a far parte della medicina popolare (*folk medicine*) allo scopo di trattare un'ampia varietà di disturbi o vere e proprie malattie. Ad esempio, il thé caldo, fatto con estratto di alghe marine, si è diffuso in Asia come bevanda stimolante del ricambio urinario. Ancora, con decotti di alghe *Digenia simplex* si combattevano le parassitosi da vermi e l'infestazione da acari. Si è capito solo in epoca più recente che effettivamente le alghe possiedono un principio attivo vermicida, l'acido kainico, potente sostanza eccitotossica, il cui nome significherebbe "terrore che arriva dal mare".

In Giappone e in Cina già 300 anni a.C. si trattavano il gozzo e altre disfunzioni ghiandolari con infusi di *Chondria, Gracilaria, Pterocladia e Gelidium*. La stessa pozione valeva per costipazione, mal di stomaco e ulcera.

Queste pratiche tramandate di medicina popolare sono arrivate chissà come fino all'epoca romana, quando i marinai con le alghe curavano ferite, ustioni ed eruzioni cutanee.

Ma anche altre applicazioni delle alghe (o dei loro derivati) sono nate in Oriente, come, ad esempio, la funzione insetticida attribuita a *Macrocystis pyrifera* contro le larve delle zanzare. Invece le alghe rosse (*Laurencia obtusa, Wrangelia argus*), verdi (*Caulerpa racemosa*) o azzurre (*Lyngbya majuscula*) avrebbero manifestato nella tradizione popolare attività battericida e fungicida.

Il progresso tecnologico maturato attraverso i secoli ha poi messo a frutto alcune conoscenze empiriche delle antiche culture asiatiche, tanto è vero che l'industria chimica giapponese oggi è all'avanguardia nella fabbricazione di derivati dalle alghe marine: gli alginati da *Laminaria japonica* (che servono, tra l'altro, per i cosmetici) e il glutammato monosodico. Nasce nel 1908 all'Università di Tokyo, dalle alghe *Kombu*, che il Professor Ikeda gradiva per il sapore, in giapponese "*Umami*" (= gusto buono). Questo ingrediente entra in così tanti piatti della cucina orientale da essere definito "il quinto gusto" (Abdussalam, 1990).

UTILIZZO DELLE ALGHE NELL'ALIMENTAZIONE UMANA[1,2]

Ricche di proteine, minerali, vitamine e altri nutrienti specifici, come gli acidi grassi insaturi, si distinguono per l'alto contenuto di oligoelementi. Le sostanze di cui ha bisogno l'essere umano si ritrovano nelle alghe in quantità sufficienti e bilanciate.

Non occorre citare che l'alga *Spirulina* era il cibo per eccellenza degli Aztechi e che il *Kombu,* oltre che da alimento, funzionava addirittura da moneta di scambio nell'antico Giappone. In Europa le alghe sono arrivate nei supermercati senza troppo clamore, un po' sopraffatte dai prodotti di soia, dai vari tipi di riso orientale, dal tofu e dallo yogurt greco. Probabilmente il grosso pubblico le riteneva un cibo strano, più adatto alle popolazioni che consumano pesce crudo ed erbe a noi sconosciute. In effetti, il commercio d'alimenti derivati dalle alghe vede al primo posto il Giappone, seguito dalla Cina e da altri paesi del sud-est asiatico (Filippine, Malesia, Bali, Singapore, Sri Lanka).

Ma questo è un pregiudizio, perché in Scandinavia si prepara tuttora un "*pane d'alghe*", che avrebbe la proprietà di diminuire l'assimilazione dei grassi in virtù dell'abbondanza di fibra e quindi di essere indicato contro l'obesità. In Inghilterra (Scozia, Galles) la vendita di alghe al minuto nei mercati, accanto al pesce, è usanza comune.

D'altronde, anche a Venezia si serve la "*lattuga di mare*" (*Ulva lactuca*), un piatto tipico molto apprezzato, mentre a Napoli c'è una tradizione antica, che si chiama "*zeppole 'e pasta crisciuta*" (in alto, a destra, la vendita per strada).

Comunque, i cibi che hanno a che fare con le alghe sono oggi parecchi e basta visitare il reparto dei "biologici" in un supermercato o entrare in un'erboristeria per rendersene conto. Evidentemente, oggi c'è una maggior attenzione da parte dei consumatori verso i composti naturali bioattivi in veste di ingredienti funzionali nella dieta. In particolare, i composti bioattivi derivati da organismi marini sono stati riconosciuti come una ricca fonte di componenti in grado di migliorare la salute (Yong-Xin *e Coll*., 2011).

Qui di seguito si riportano solo alcuni esempi di prodotti in commercio, presi da più fonti specializzate, tra cui i siti www.aamterranuova.it e www.naturopata.online.com, ai quali si rimanda per informazioni maggiormente ampie e dettagliate.

Alcuni piatti tipici preparati con alghe marine

Nome latino dell'alga	Piatto corrispondente
Ascophyllum nodosum	*Egg wrack* (uova *wrack*)
Chondrus crispus	*Irish moss* / *Carrigeen* (muschio d'Irlanda)
Enteromorpha intestinalis	*Sea grass* (erba di mare)
Himanthalia elongata	*Sea spaghetti* (spaghetti di mare)
Laminaria digitata / *japonica*	*Kombu* / *konbu*
Laminaria saccharina	*Royal* / *sweet kombu* (*Kombu* reale o dolce)
Palmaria palmata	*Dulse* / *Dillisk*
Porphyra umbilicalis	*Nori*
Ulva lactuca	*Sea lattuce* (insalata lattuga di mare)
Undaria pinnatifida	*Wakame*

WAKAME (*Undaria pinnatifida*) - Origine: Giappone

Per il suo gusto delicato si combina bene con le verdure; è anche un ingrediente prezioso per minestre. Ammorbidisce le fibre degli alimenti con cui viene cotta; utile con i legumi. Ricca di calcio, vitamine del gruppo B, vitamina C, magnesio e ferro.
Effetti benefici: proprietà benefiche per capelli, unghie, pelle. Aiuta per i problemi cardiaci, l'eliminazione dei grassi, abbassa la pressione, disintossica il fegato e aiuta a depurarsi dalle scorie radioattive e dai metalli pesanti.

KOMBU (*Laminaria japonica*) - Origine: Giappone

Usata per insaporire, ammorbidire altri cibi o semplicemente come una qualsiasi altra verdura. Venduta secca ed impacchettata a strisce. Ricca di polisaccaridi e minerali (ferro, calcio, iodio, magnesio, acido alginico, acido glutammico).
Effetti benefici: sclerosi, artriti, ipertensione, squilibri ghiandolari; malattie polmonari, cardiovascolari, della tiroide; prevenzione delle malattie degenerative. L'acido alginico non è digeribile, ma agisce come un depurativo naturale dell'intestino; l'acido glutammico è un insaporitore naturale dei cibi.

DULSE (*Palmaria palmata*) - Origine: Atlantico/ Pacifico

Alga rosso porpora, morbida e dal gusto piccante.
Si usa per preparare zuppe e condimenti; cotta brevemente, si combina con le cipolle e accompagna piatti di cereali.
Ricca di ferro, potassio, magnesio, iodio e fosforo.
Effetti benefici: il ferro cura l'anemia;, utile in gravidanza; Indicata per problemi gastrici, intestinali e per squilibri tiroidei.

NORI (*Porphyra tenera*) - Origine: Giappone

Ricca di proteine, vitamine A, C e B in gran quantità. Viene venduta secca, in fogli ripiegati in quadrati, che devono essere tostati sulla fiamma dal lato lucido prima dell'uso.
Effetti benefici: riduce il tasso di colesterolo nel sangue, aiuta ad eliminare i depositi di grassi, facilita la digestione e la lucidità mentale.

HIJIKI (*Sargassum fusiforme*) - Origine: Giappone, Corea, Cina

Alga con foglie che ricordano i rami degli alberi; è nera e dura, possiede la maggior quantità di minerali importanti ed oligoelementi (34%); ricchissima di calcio (14 volte più del latte).
Effetti benefici: tonifica il corpo e purifica il sangue, ricostituente, cicatrizzante, rinforza, abbassa il colesterolo, previene la carie e i capelli bianchi; raccomandata in gravidanza.

SPIRULINA (*Arthrospira platensis*) - Origine: Messico, Cina, Africa centrale

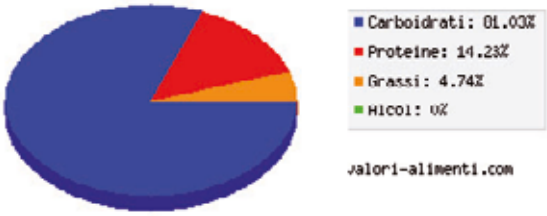
Effetti benefici: come l'agar-agar, stimola il senso di sazietà. Inoltre è un ottimo ricostituente che favorisce la depurazione e l'eliminazione delle tossine. Utile nell'attività sportiva (completa l'apporto nutritivo richiesto dal sovrautilizzo nutrizionale ed energetico, prevenendo perdite nella massa muscolare), nello *stress* psico-fisico o situazioni debilitanti, nelle alimentazioni vegetariane, ipocaloriche o squilibrate.

AGAR-AGAR (*Gracilaria, Gelidium, Pterocladia, Acanthopeltis*) - Origine: Giappone e altri paesi, compresa l'Italia

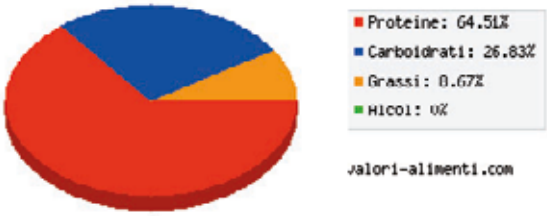
Effetti benefici: contiene parecchie **mucillagini** che gli conferiscono **proprietà addensanti, tali da farne il gelificante naturale per eccellenza; lassativo, depurativo nelle diete dimagranti**,

La composizione delle alghe commestibili varia da prodotto a prodotto, come dimostrano i grafici che prendono ad esempio due generi.

Il primo grafico mostra la composizione dell'alga *Wakame* su 100 grammi di alimento secco:



Il secondo grafico mostra la composizione dell'alga *Spirulina* su 100 grammi di alimento secco:



Nella seguente tabella è sintetizzata l'etichetta nutrizionale (in grammi % sul peso secco) delle alghe alimentari precedentemente citate:

ALGA	Calorie (Kcal)	Proteine grammi %	Carboidrati grammi %	Grassi grammi %	Fibra grammi %	Sodio mg %
wakame	43	14.23	81.03	4.74	0.5	233
kombu	43	7.1	10.0	1.6	58.7	1830
dulse	264	21.5	44.6	1.7	37.4	1740
nori	35	5.81	5.11	0.28	0.3	48
hijiki	279	10.6	56.2	1.3	0.04	1400
spirulina	290	64.51	26.83	8.67	3.6	900.5
agar	306	6.21	80.8	0.3	7.7	102

Quali sostanze apportano le alghe (Mac Artain e Coll., 2007)

Il rapporto tra i diversi nutrienti varia a seconda dei generi e delle specie, ma in generale le alghe sono notevoli per il loro contenuto di:

1. **Proteine:** hanno diversi nomi (ficobiline nelle alghe rosse e blu, ficocianine nelle blu, ficoeritrine nelle rosse) e sono in pratica delle biline unite con legami covalenti ad una catena proteica. Sono un punto di forza delle alghe, anche se variano continuamente nella concentrazione, che è più elevata in inverno/primavera. Generalmente stanno intorno al 5-15% del peso secco, ma possono arrivare al 26% in quelle verdi (*Ulva*) e addirittura al 35-47% nelle alghe rosse (*Palmaria*, *Porphyra*), che sono conosciute come alimento con i nomi di *Dulse* e *Nori*. La *Spirulina* (microalghe) ha un contenuto proteico maggiore di qualsiasi altro alimento naturale (±65%), superando di gran lunga la carne e il pesce (15-25%), la soia e il latte in polvere (35%).

2. **Carboidrati:** sono tanti e caratterizzati da un basso indice glicemico. Non vengono digeriti dalla flora intestinale dell'uomo e pertanto si comportano come fibra, preziosa per ridurre il colesterolo e la pressione sanguigna. Tra questi si ricordano i polisaccaridi seguenti: fucoidani (alghe brune), xilani (alghe rosse e verdi), ulvani (alghe verdi), amido (alghe rosse), agar-agar (alghe rosse).

Alga	Contenuto in **carboidrati** espresso in **grammi/100 g** di peso umido dell'alga o in peso dell'alimento intero preso a confronto			
	Alga	Riso	Carote	Banane
Laminaria digitata (Kombu)	10	81	8	23
Porphyra umbilicalis (Nori)	5			

3. **Acidi grassi (omega-3 e omega-6):** monoinsaturi e polinsaturi, il cui apporto risulta sempre carente nelle diete rispetto ad altri tipi di grassi. Sono presenti in tutte le alghe; ad esempio, *Nori* è particolarmente ricca di EPA (acido eicosapentaenoico) e DHA (acido docosaesaenoico), oltre che del prezioso GLA (acido gamma-linolenico).

Alga	Contenuto % di **acidi grassi** monoinsaturi e polinsaturi (PUFA) sul totale degli acidi grassi			
	monoinsaturi	PUFA	omega-3	omega-6
Laminaria digitata (Kombu)	19	47	25	21
Porphyra umbilicalis (Nori)	19	16	7	8

4. **Minerali:** sono presenti tutti quelli utili, con notevoli quantità di calcio (soprattutto in *Laminaria* a 1500-8000 ppm, potassio, magnesio (dell'ordine di qualche grammo per 100 g di alga) e di iodio (fino a 400 mg per 100 g nelle alghe marine). Il contenuto di sodio è tale da escludere sale alle preparazioni culinarie; i microelementi (zinco, rame, cromo, ferro, magnesio) sono presenti in tracce, ma sempre in forma facilmente assimilabile. Questi metalli sono comunque presenti in quantità inferiori ai limiti di tossicità fissati per tale categoria di prodotti (negli USA 40 mg/Kg di peso secco).

   **Nella tabella seguente il contenuto di minerali è riferito a 8 grammi di alga, la porzione tipica giornaliera della cucina asiatica. RNI è invece la quantità giornaliera standard di quella sostanza consigliata in una dieta bilanciata (dati validi in Inghilterra).*

Alga	Contenuto di **minerali** espresso in **grammi / 8 g** di peso umido dell'alga e corrispondente valore percentuale RNI (*Reference Nutrient Intake*) fra parentesi*			
	calcio	potassio	magnesio	sodio
Laminaria digitata (Kombu)	177 (26%)	976 (28%)	196 (65%)	303 (19%)
Porphyra umbilicalis (Nori)	74 (11%)	585 (17%)	49 (16%)	128 (8%)

5. **Vitamine:** la vitamina A (beta-carotene) e altri carotenoidi (fucoxantina, viola-xantina nelle alghe brune, alfa-carotene e i suoi derivati idrossilati zeaxantina e luteina nelle alghe rosse) sono presenti anche 20 volte di più che nella carota; il gruppo B è sempre ben rappresentato (B_1 o tiamina, B_2 o riboflavina, B_3 o niacina, B_5 o acido pantotenico, B_6 o piridossina, B_{12} specialmente in *Spirulina* e *Nori*) ; lo stesso vale per le vitamine C, D ed E o alfa-tocoferolo, K o fillochinone. J o colina.

Alcuni dati vengono mostrati in tabella, espressi in mg/Kg di peso secco delle alghe:

• Vitamina C	• Alghe verdi e brune • Alghe rosse	• 500-3000 • 100-800
• Vitamina E	• Alghe verdi e rosse	• 200-600

(da Arnoldi, 2014)

e, ancora, alcuni valori scelti fra quelli quantitativamente più significativi per *Kombu* e *Nori*:

Alga	Contenuto di alcune **vitamine** espresso in **mg / 8 g** di peso secco dell'alga			
	B_3	B_{12}	C	E
Laminaria digitata (Kombu)	4.9	0.5	2.8	0.3
Porphyra umbilicalis (Nori)	0.8	0.8	12.8	0.8

6. **Polifenoli:** derivano dagli acidi ellagico e gallico e si trovano particolarmente nelle alghe brune (5-15%) e in quelle rosse. Hanno forte potenzialità antiossidante.

   La funzione degli anti-ossidanti algali è stata oggetto di studi riassunti in una rassegna sintetica di Yong-Xin *e Coll*. (2011).
   In pratica, si sa che il deterioramento di alcuni alimenti è causato dall'ossidazione (o irrancidimento) dei grassi ad opera dell'ossigeno reattivo, presente nelle sue forme di anione superossido, radicali idrossilati e perossido d'idrogeno (H_2O_2). Da questi agenti nasce la produzione di radicali liberi, che attaccano le strutture proteiche o lipidiche delle cellule e il DNA stesso, turbando lo stato di salute dell'ospite e innescando malattie (cancro, diabete mellito, varie patologie neurodegenerative e infiammatorie).
   Per contrastare i radicali liberi, sono stati introdotti nei prodotti alimentari industriali degli anti-ossidanti di sintesi (idrossitoluene butilato, idrossi-anisolo butilato, *tert*-butil-idrochinone, propil-gallato), che tuttavia hanno delle limitazioni, essendo potenzialmente pericolosi.
   Dalle alghe (soprattutto da quelle brune) provengono invece tre categorie di efficaci anti-ossidanti naturali, innocui per la salute, che bloccano i radicali liberi:
   – florotannini (polifenoli floroglucinoli in *Ecklonia, Eisenia, Hizichia*);
   – polisaccaridi sulfonati (fucoidani e laminarani da alghe brune, carragenani da alghe rosse, ulvani da alghe verdi);
   – carotenoidi (fucoxantina, astaxantina) in *Sargassum*, efficaci contro l'apoptosi cellulare da H_2O_2;
   – fucosteroli (fitosteroli) in *Pelvetia*, che agiscono contro gli enzimi superossido-dismutasi, catalasi, glutatione-perossidasi. In aggiunta, il saringosterolo si è dimostrato efficace inibitore del *Mycobacterium tuberculosis*.

7. **Fibre:** le alghe hanno particolari polisaccaridi strutturati in fibre insolubili (indigeribili, come la cellulosa, che quindi oltrepassano rapidamente il tratto intestinale), in grado di assorbire grandi quantità di acqua. L'agar-agar (presente, ad esempio, in *Laminaria* e *Gelidium*) diminuisce il senso di fame e promuove la peristalsi, mentre le fibre solubili (pectine, carragenine e *guar*) riducono il colesterolo e controllano la glicemia. Spesso il contenuto di fibra supera quello dei vegetali più comunemente usati nella dieta.

Alga	Contenuto in fibra espresso in grammi/100 g di peso umido dell'alga o in peso dell'alimento intero preso a confronto			
	Alga	Riso	Carote	Banane
Laminaria digitata (Kombu)	6.2	3.6	3.6	3.1
Porphyra umbilicalis (Nori)	3.8			

8. **Acido alginico:** presente, ad esempio, in *Kombu*; ha la particolare proprietà di legare i metalli pesanti (inclusi mercurio, cadmio, piombo), favorendone l'eliminazione; è utile

anche in caso di reflusso gastro-esofageo, perché protegge le mucose e facilita il transito dei residui di cibo indigerito.

9. **Clorofilla:** favorisce il metabolismo del ferro e l'assorbimento del calcio. É epatoprotettiva e contrasta l'alitosi. Ha proprietà cicatrizzanti e favorenti la coagulazione del sangue nei soggetti emorragici o ulcerosi.

Grazie a questo corredo, le alghe commestibili possono compensare gli squilibri dell'alimentazione diffusi nei paesi industrializzati. In pratica: (1) l'eccessivo apporto calorico; (2) la scarsità di microelementi; (3) la vita sedentaria.

L'aggiunta di alghe a carni, latticini o pesce può garantire una valida integrazione nutrizionale, senza dover ricorrere a farmaci (FAO, 2014).

Estratti d'alga ingredienti alimentari

Oltre all'uso delle alghe quali alimenti consumabili direttamente nel piatto, spesso sotto forma di contorni, sono stati inventati degli estratti. Si tratta di additivi naturali divenuti quasi indispensabili nell'industria alimentare. *Alginati, carragenati, agar (agarosio, agaropectine)* sono sostanze gelificanti, viscosanti, stabilizzanti ed emulsionanti in soluzione acquosa. Essendo insapori, incolori e privi di tossicità, questi ingredienti hanno avuto un grande successo, entrando anche a far parte delle diete vegetariane.

Alginati (E-401 → E-405)

Sono composti da acidi urici (mannuronico e guluronico) con gruppi polari carbossilici che necessitano di ioni bivalenti (Ca) o trivalenti per gelificare (o aumentare la viscosità).

Si estraggono da grosse Feofite (alghe brune): *Laminaria, Ascophyllum, Macrocystis, Sargassum*, *Ecklonia, Durvillea*.

Vengono addizionati a vari alimenti ai quali si vuole conferire forma e consistenza (budini, gelati, verdure e carni in scatola, maionese, creme, formaggi molli ecc).

Carragenati (E-407)

Nome derivato da Carragheen (Irlanda), area dove proliferano, come in tutti i mari del Nord, le alghe rosse *Chondrus chrispus* e *Gigantina mamitiosa*. Hanno struttura simile all'*agar*, anche se ciascuna specie carragenofita (produttrice di carragenati) origina un tipo diverso per grado di solfatazione, gruppi anionici, polimerizzazione, ecc.). Chimicamente sono formati da una molecola lineare di galattano sulfonato che gelifica in presenza di Ca, K e proteine.

Si estraggono da determinate specie di alghe rosse (*Euchema, Kappaphycus, Hypnea*).

Vengono adoperati come gelificanti in paté, gelati. frappé e come chiarificanti in miele e birra.

Agar, Agarosio, Agaropectine (E-406)

Agarosio e agaropectina sono una frazione dell'*agar*, che chimicamente è una molecola complessa, formata da 3,6 anidro-L-galattosio e D-galattopiranoside, con legami glucosidici 1-4 e 1-3 ed un'ampia distribuzione di gruppi polari (solfati, piruvati) e funzionali (metilici).

L'agaropectina differisce dall'agarosio per la presenza di gruppi acidi (solfato e piruvato).

L'*agar* si estrae con acqua calda da Rodofite (*Gelidium, Gracilaria, Pterocladia*), che si trovano nei mari a svariate latitudini. *Gelidium* dà un agar di migliore qualità rispetto a *Gracilaria*. Nella produzione industriale vengono fatti trattamenti con carbone attivo, congelamenti e scongelamenti ripetuti per eliminare l'acqua e allontanare le impurità. Il prodotto finito (una polvere bianca, fine, igroscopica, solubile in acqua a caldo) corrisponde al 24-25% del peso secco dell'alga originale e si ottiene per essicamento.

Agar e agaropectina sono gli additivi addensanti più usati per marmellate, budini, carni in scatola, caramelle, gelatine di frutta ecc.

I tre ficocolloidi commercialmente più importanti derivati dalle alghe (Dhargalkar *e Coll.*, 2009)

• Produzione mondiale di alghe = 8,5 milioni di tonnellate di cui coltivate 7,5 milioni di tonnellate (89% del totale)
• **221** specie di alghe hanno **importanza commerciale** (32 Clorofite, 64 Feofite, 125 Rodofite)
• **145** specie di alghe (66% del totale commerciale) hanno **importanza come alimenti**

Prodotto	Valore (milioni di US $) di prodotto/anno	Maggiori paesi produttori	Raccolta naturale o coltivazione
Alginati	213	Scozia, Norvegia, Cina, Argentina, Australia, Canada, Cile, Messico, Irlanda, Giappone, USA	Raccolta. Coltivazione di *Laminaria japonica* solo in Cina
Carragenati	240	Danimarca, Irlanda, Nuova Zelanda, Nuova Scozia, Cina, Giappone, Mozambico	20% raccolta; 80% coltivazione in Filippine, Indonesia, Tanzania
Agar-agar	132	Cile, Spagna, Portogallo, Corea, Francia, Marocco, USA, Messico, Cile, Nuova Zelanda, Giappone	Raccolta sui litorali e coltivazione in bacini aperti

Raccolta delle alghe ad uso commestibile in Madagascar

Quali sono le proprietà comuni alle diverse specie di alghe

Tutte le alghe offrono i seguenti effetti benefici:

AZIONE SULL'ORGANISMO	MECCANISMO FUNZIONALE	RISULTATO ATTESO
Antinfiammatoria e antiossidante	Effetto combinato di acidi grassi polinsaturi omega-3, fibre, microelementi e polifenoli	Eliminare i radicali liberi e contro lo *stress* ossidativo
Dimagrante /disintossicante	Fibre (pectine, *guar*) e iodio, associati a dieta efficace accompagnata da esercizio fisico	Le fibre aiutano il transito intestinale e lo iodio accelera il metabolismo tiroideo
Antitrombotica e anticoagulante	Fucoidani	Mantenere un livello adeguato di viscosità del sangue
Integratore minerale e vitaminico	Calcio e Iodio	Particolarmente utili durante la crescita, in gravidanza e nella menopausa
Regolatrice del metabolismo glucidico e lipidico	**Polisaccaridi e acidi grassi polinsaturi**	Attenuare le variazioni glicemiche e l'eccesso di trigliceridi e colesterolo nel sangue
Rigenerante	Aminoacidi, vitamine e minerali	Favorire la rigenerazione dei tessuti

Inoltre le alghe sono da tempo riconosciute come fonti preziose di composti bioattivi strutturalmente diversi.

Attualmente diverse linee di studio hanno fornito informazioni sulle attività biologiche e gli effetti neuroprotettivi delle alghe marine, tra cui antiossidanti, anti-neuroinfiammatori, attività inibitoria della colinesterasi e inibizione dell' apoptosi neuronale (Pangestuti R. *et al*., 2011).

Quindi le alghe marine hanno un grande potenziale da sfruttare per la neuroprotezione e potrebbero essere introdotte nella preparazione di nuovi ingredienti funzionali in prodotti farmaceutici e alimenti funzionali, come un buon approccio per il trattamento e la prevenzione delle malattie neurodegenerative, in alternativa a componenti sintetici.

Ma la vasta gamma di attività biologiche dei composti naturali derivati da alghe marine (attività antivirale, anticoagulante, antineoplastica, protettiva dell'osso e della mucosa gastrica e ipolipemizzante; Wijesekaraa I. *et al.,* 2010), dovuta a composti come florotannini, alginati, fucoidan, carragenani e ulani, acido sargaquinoico, SP e carotenoidi aumenta la possibilità di ampliare gli effetti favorevoli ben oltre quelli neuroprotettivi, con una potenziale estensione nel settore farmaceutico dell'azione benefica delle alghe marine per la salute.

Fino ad ora, la maggior parte delle attività salutistiche biologiche e neuroprotettive delle alghe marine e dei loro composti naturali è stata osservata *in vitro* o in animali da esperimento come il topo.

Sono pertanto necessari ulteriori studi RCT su larga scala, al fine di approfondire le attività neuroprotettive delle alghe marine nell'uomo.

Quando è consigliabile l'utilizzo quotidiano delle alghe nell'alimentazione

Le alghe possono essere utilizzate, salvo poche controindicazioni*, da tutti gli individui con i seguenti obiettivi:

- Integrazione in caso d' alimentazione poco variata, con cibi elaborati o raffinati
- Complemento di terapie farmacologiche e antibiotiche
- Correttivo di diete vegetariane per sopperire alla carenza di proteine e vitamina B_{12}

* CONTROINDICAZIONI - Le alghe marine con elevato contenuto di iodio (ad esempio, *Kombu*) sono da evitare in soggetti affetti da ipertiroidismo.

ALGA	*Verso quali patologie è consigliabile utilizzare le alghe nell'alimentazione:*			
wakame	Gastrite, pirosi gastrica	Reflusso gastro-esofageo	Ulcera gastrica	Psoriasi
kombu	Cellulite	Ipotiroidismo	Ritenzione idrica	Obesità e sovrappeso *
dulse	Anemia			
nori	Anemia			
hijiki	Carie dentale	Osteoporosi		
spirulina	Obesità e sovrappeso *			
agar-agar	Obesità e sovrappeso *	Stipsi	Intossicazione da metalli pesanti	

* Dagli esperimenti di laboratorio condotti dal Professor Jeff Pearson, fisiopatologo dell'Università di Newcastle (Inghilterra), risulterebbe che, introducendo alghe *kelp* nella dieta, l'assorbimento dei grassi nel tratto digerente verrebbe tagliato del 75%, grazie all'effetto della fibra apportata dagli alginati.

L'assunzione delle alghe potrebbe essere facilitata mescolandole con pane, biscotti, formaggi, yogurt (Brown, 2010).

UTILIZZO DELLE ALGHE IN ZOOTECNIA[1]

Mangimi

L'impiego del materiale algale, quale mangime semplice o additivo per mangimi composti, ha preso piede su scala industriale negli anni '50, raggiungendo grandi sviluppi in Cina attorno al 1980.

Le alghe più sfruttate sono ovviamente quelle presenti in maggior quantità sulle coste.

Praticamente, si tratta di alghe brune dei generi *Ascophyllum, Laminaria* in Europa (Norvegia, Francia, Islanda e Inghilterra), mentre altrove (America, Giappone) prevalgono *Alaria*, *Fucus*, *Sargassum, Macrocystis*. Seguono per frequenza le alghe rosse *Gracilaria* e *Porphyra* (Australia, Nuova Zelanda) e quelle verdi come *Spirulina* e *Ulva* in Sud Africa.

Il prodotto, raccolto un tempo manualmente ed ora a macchina, viene trasformato ancora umido per evitare la formazione di muffe. La lavorazione prevede passaggi ripetuti in mulini a martelli con setacci progressivamente più stretti, seguiti da essiccamento in forni che portano la temperatura da 700-800° iniziali a meno di 70 °C finali.

La polvere fine che ne esce ha un'umidità attorno al 15%; viene confezionata in sacchi chiusi per evitare ulteriore assorbimento di umidità ed ha validità di circa un anno.

Il prodotto contiene 60 minerali, apprezzati elementi in tracce e almeno 12 vitamine, oltre ad acidi grassi insaturi.

Due esempi sulla composizione e le indicazioni di farine derivate dalle alghe sono riportati nei seguenti quadri:

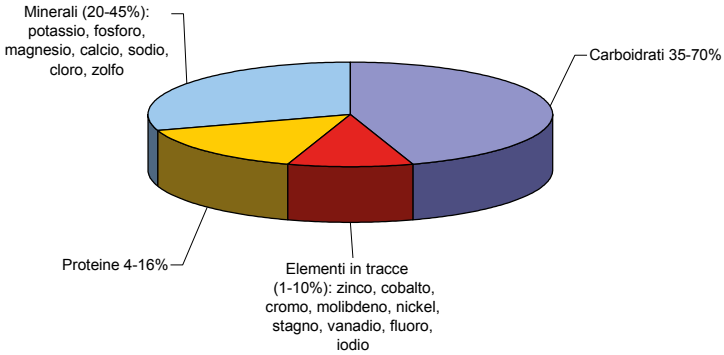
FARINA DI ASCOPHYLLUM NODOSUM

Analisi nutrizionale tipica (su 100 grammi di prodotto):

– Umidità: 10.00% - 20.00%
– Proteine: 5.00% - 10.00%
– Lipidi: 2.00% - 4.00%
– Carboidrati: 45.00% - 60.00%

(Italfeed, Milano)

Ascophyllum nodosum è una macroalga appartenente alle *Phaeophycaeae* e alla famiglia delle *Fucaceae*. L'appellativo *nodosum* è dovuto alle tipiche "camere d'aria", simili a uova, che si trovano su tutta la lunghezza delle fronde di colore marrone/verde-oliva, che possono raggiungere i due metri di lunghezza e sono saldamente attaccate alle rocce ed ai massi, tramite un apparato simile ad una radice. È una tipica abitante dei Mari del Nord, dove si sviluppa molto lentamente e può vivere per decenni. Cresce esclusivamente nei mari puliti ed essendo molto sensibile all'inquinamento può essere considerata un indicatore di purezza dell'acqua.
La farina che ne deriva si presenta come polvere di colore verde/marrone. È una ricca fonte di ***minerali*** (fosforo, magnesio, zinco, manganese, cobalto, calcio, selenio, rame, sodio e potassio) tra cui il ferro (in rilevanti quantità, fino a 20 volte più dello spinacio, che notoriamente è considerata la verdura più ricca di questo minerale) e di ***vitamine*** (vitamina B_1 o tiamina, acido folico, vitamina C, vitamina B_3 o niacina, vitamina B_2 o riboflavina). Contiene inoltre, fra i principi attivi, il beta-carotene (precursore vitaminico) e, fra gli zuccheri, l'inositolo.



Poiché carboidrati e proteine (contenenti una ventina di aminoacidi) non sono digeribili, il valore nutritivo delle alghe è valutato attorno al 30% rispetto a quello del grano. Per questo motivo la funzione delle alghe in mangimistica è prevalentemente di additivo nelle diete per bovini, ovi-caprini, polli, animali d'affezione e in acquacoltura.

Qui, oltre all'apporto proteico in questo caso ricercato, entra in gioco l'acido alginico, che ha funzioni primarie come legante nella formulazione di mangimi per molluschi (Abalone *o Haliotis*, nella foto) e crostacei allevati (gamberetti). Gli alginati agiscono infatti contro la disgregazione del *pellet* gettato nelle vasche.

C'è anche un effetto favorevole del mangime sullo sviluppo dei molluschi allevati in acque molto ricche di ammonio.

Il contributo delle alghe nei mangimi composti ha dimostrato di offrire vantaggi evidenti, tranne che nei suini, dove l'aggiunta del 3% di farina d'*Ascophyllum* non ha dato apprezzabili incrementi nell' indice di conversione.

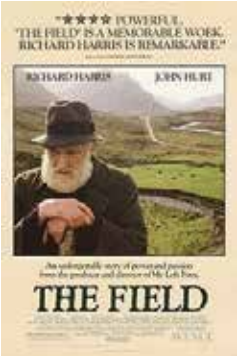
Nei bovini si è visto un aumento della produzione di latte del 6-7%, nelle pecore una resa superiore di lana e migliore resistenza nei mesi invernali, nei polli una maggior quantità di iodio nelle uova.

Nuove prospettive si sono aperte

nell'alimentazione dei cavalli da corsa, in quanto microelementi derivati dalle alghe (importanti iodio e ferro) e vitamine (tra cui B_1, B_2, B_{12}, carotene e tocoferolo) aumenterebbero le difese immunitarie contro malattie batteriche e virali, diminuendo al contempo l'irritabilità degli animali.

C'è chi si nutre direttamente di alghe: per esempio, i gabbiani, le oche, i cigni, i pesci erbivori (come la salpa); il fenicottero si nutre di molluschi, piccoli crostacei e di alghe, che filtra col becco provvisto di lamelle, utilizzando la lingua come una siringa per aspirare e poi spingere fuori l'acqua.

UTILIZZO DELLE ALGHE IN AGRICOLTURA[1]



Dal film " The Field" (Il Campo) di Jim Sheridan, Irlanda (1990): "Good made the world, and seaweed made that field" (Dio creò il mondo, ma sono le alghe ad aver creato quel campo).

Concimi e fertilizzanti

Non si conosce quando è iniziata la storia dei fertilizzanti a base di alghe. Probabilmente l'origine risale a parecchi secoli fa, in Vietnam, dove si trasformavano in concime le felci *Azolla*, seguendo un procedimento di preparazione che è rimasto segreto fino ai giorni nostri. Ed erano i Cianobatteri o alghe azzurre (*Anabaena azollae*), ospiti simbionti sulle foglie delle felci, a fornire la materia prima, cioè l'azoto prodotto per fotosintesi.

Nel XII secolo esistono testimonianze di concessioni a ordini monastici (*goemoniers*) per la raccolta delle alghe (*goemon*) lungo le coste bretoni.

Nel XVIII secolo lungo il Canale della Manica si produceva il "*maerl*", un correttore del suolo acido a base di Rodofite calcaree.

Tra il XIX e XX secolo in Irlanda e in Portogallo prende piede la coltivazione delle alghe marine ad uso fertilizzante, che diventa in breve un'attività agricola complementare.

Copertina della Domenica dell'Agricoltore datata 11/11/1928 "Le alghe come concime".

Le alghe brune raccolte lungo le coste sono state impiegate per molti anni come concime naturale, ad esempio, in Scozia, dove si mescolava *Ascophyllum nodosum* bagnato con sabbia, mentre nelle Filippine *Sargassum* veniva asciugato al sole prima dello spargimento sui campi. In Argentina, invece, le alghe verdi venivano ridotte a *compost* prima di finire come concime per le piante di pomodoro (Eyras *e Coll*., 1998).

Il primo concime prodotto industrialmente sarebbe il Maxicrop®, nato in Inghilterra negli anni '60, fatto con *Ascophyllum nodosum* (Reina, 2014).

Attualmente il materiale algale proveniente dai litorali marini, formato prevalentemente da *Ascophyllum* ed *Ecklonia*, viene lavato, tritato, essicato e ridotto in granulato con un contenuto d'acqua del 20-25%.

Sono state messe a punto anche tecniche di produzione che prevedono il congelamento a -50 °C delle alghe e la riduzione in pasta cremosa (Goemill®, da *Ascophyllum*) oppure la polverizzazione ad alta pressione (Kelpak® da *Ecklonia*).

Esistono in commercio numerosi prodotti solidi, liquidi e *spray*, ottenuti per idrolisi alcalina o acida.

Concimi e fertilizzanti - prodotti commerciali (farine, estratti liquidi e *compost*) fabbricati con alghe (Reina, 2014)

Specie e/o marca commerciale	Paese	Raccolta della biomassa	Metodo di estrazione
Ascophyllum nodosum	Islanda	meccanica	idrolisi
Alginex® - Thorverk	Norvegia	meccanica	idrolisi
Algifert® (miscela di alghe verdi)	Germania	meccanica	idrolisi
Bio-Algium® (*Fucus*, *Laminaria*)	Francia	meccanica	congelamento
Goemill® - Goemar (*Ascophyllum*)	Inghilterra	meccanica	idrolisi
Maxicrop® (*Ascophyllum*)	Inghilterra	meccanica	idrolisi
Seamac®	EC	meccanica	idrolisi
Sea Life® - Kelp Meal	EC	meccanica	idrolisi
Sea Life®	Inghilterra	meccanica	*compost*
Seanure®	Inghilterra	meccanica	*compost*
Cytex®	EC	meccanica	idrolisi
SM3®	Inghilterra	meccanica	idrolisi
Kelpack® (*Ecklonia maxima*)	Sudafrica	coltivazione	estratto
Seasol® (*Durvillea potatorum*)	Australia	meccanica	idrolisi
Algafer® (*Eucheuma sp.*)	Filippine	coltivazione	idrolisi
Spirulina	Spagna	coltivazione	congelamento

Le alghe servono come **fertilizzante** perché contengono azoto e potassio, anche se il contenuto di fosforo è più basso dello stallatico e dei concimi chimici.

Inoltre, servono da **condizionante** perché migliorano l'aereazione e la ritenzione di umidità del suolo, inquinando meno dei liquami animali. Alcuni tipi di alghe rosse litotrope (*Phimatolithon* e *Lithothamnion*), frequenti in Francia presso gli estuari dei fiumi, hanno proprietà neutralizzanti e stabilizzanti per i terreni acidi (*maerl*).

I vantaggi dei prodotti d'estrazione dalle alghe consistono: a) in un più elevato tasso di germinazione delle piante da frutto, da fiore o delle verdure; b) in una maggiore resistenza a malattie parassitarie (ragno rosso, *red spider*, afidi) e al freddo.

Queste proprietà deriverebbero dal contenuto algale in **microelementi** e da sostanze che agiscono da regolatori della crescita delle piante (citochinine, auxine, betaine), anche se i meccanismi che entrano in funzione in questi casi non sono del tutto noti.

Le principali attività dei concimi sul suolo e sulle colture vegetali sono elencate nella seguente tabella.

Effetti dei concimi / fertilizzanti derivati da alghe

Attività verso il suolo o le piante	Principio attivo	Alghe produttrici del principio attivo
- **IDRATANTE** (trattengono grandi quantità di acqua) - **ANTIEROSIVA e STRUTTURANTE** (formano un reticolo viscoso) - **CHELANTE e SCAMBIATRICE DI CATIONI** (liberano progressivamente microelementi con "effetto spugna")	Ficocolloidi: 1) alginati 2) *agar* 3) carragenati 4) ulvani * Polisaccaridi, polielettroliti anionici ad alta attività	(1) Feofite (*Kelp*): *Laminaria, Ascophyllum, Macrocystis, Sargassum, Ecklonia, Durvillea* (2) Rodofite: *Gracilaria, Gelidium, Pterocladia* (3) Rodofite: *Euchema, Kappaphycus, Hypnea* (4) Clorofite: *Ulva*
- **ATTIVAZIONE BIOLOGICA** (effetto fertilizzante sul suolo e biostimolante sulle piante)	Polisaccaridi di riserva (mannitolo, fucoidano, laminarano, amido) Macronutrienti (azoto, fosforo, potassio) Oligoelementi (Fe, Mn, Zn, Cu) Antiossidanti (polifenoli, xantofille, carotenoidi) Fitormoni (citochine, auxine, giberelline, betaine)	Rodofite, Feofite, Clorofite (*Laminaria, Ascophyllum*) Clorofite (*Ulva, Porphyra, Ascophyllum*), Cianobatteri (*Spirulina*) Varie (*Fucus, Ascophyllun, Ecklonia, Enteromorpha, Griffitsia*)
- **BIOCIDA e REPELLENTE** (effetto antiparassitario)	Polifenoli, acidi grassi polinsaturi, composti alogenati volatili	Rodofite: *Gracilaria*

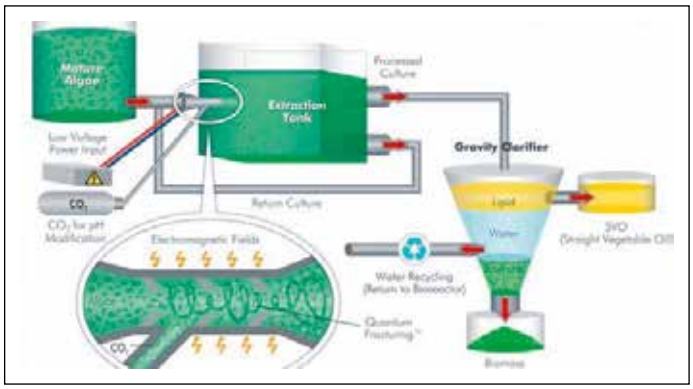
*** Ulvani** sono polisaccaridi composti da ramnosio, acido glucuronico e iduronico e xilosio sulfonato. Hanno un potere chelante superiore all'acido glucuronico, resistono alla biodegradazione e formano *gel* in presenza di cationi bivalenti o di boro. Si estraggono dall'alga verde *Ulva*, abbondante nella laguna di Venezia e nel mare Adriatico.

Principali tipologie di concimi / fertilizzanti derivati da alghe

Concime / fertilizzante	Area geografica d'origine	Alghe produttrici	Caratteristiche	Prodotto finito
Alga fresca tal quale	Norvegia, Islanda, Inghilterra, irlanda Francia	*Ascophyllum, Ficus, Laminaria Huma, Himantalia*	- Basso costo - Forte resa - Alto apporto di N - Solo 1/3 di sale rispetto ai fertilizzanti potassici	
"*Maerl*"	Francia (origine: Bretagna), Inghilterra, Irlanda	*Phymatolithon calcareum, Lithothamnion coralloides* Alghe rosse (vive) o grigio (morte)	Cellule impregnate di carbonato calcio-magnesiaco - ottimo correttore di terreni acidi - arricchito con sali inorganici	
Compost		*Ulva, Ascophyllum*	Formato da residui agro-forestali e da clorofite al 5-30%	
Concime in polvere		*Posidonia + Kelp = Ascophyllum, Macrocystis, Durvillea, Ecklonia, Fucus, Sargassum, Cytoseira, Laminaria*	Da usare in miscela con il terreno o in soluzione acquosa al 10-20% (p/v). Umidificante e nutriente per gli alginati (20-40%)	
Biostimolanti fogliari		*Ascophyllum, Ecklonia, Ascoplasma,* Cianobatteri	Prodotti per idrolisi acida o alcalina, frammentazione con alte pressioni, congelamento e scongelamento	

Esempio di biostimolante fogliare da alghe per garantire l'apporto di microelementi
Composizione (NEPTUN Alga, CIFO)**:**

Boro (B) solubile in acqua 0,5%; Rame (Cu) solubile in acqua 0,2%; Rame (Cu) chelato con EDTA 0,2%; Ferro (Fe) solubile in acqua 0,7%; Ferro (Fe) chelato con EDTA 0,7%; Manganese (Mn) solubile in acqua 0,4%; Manganese (Mn) chelato con EDTA 0,4%; Molibdeno (Mo) solubile in acqua 0,2%; Zinco (Zn) solubile in acqua 0,1%; Zinco (Zn) chelato con EDTA 0,1%. Agente chelante: EDTA.



Schema di produzione di biomassa da alghe per l'industria dei concimi e dei fertilizzanti.

Le proprietà neutralizzanti e stabilizzanti di alcuni concimi derivati da alghe rosse dell'Atlantico (*maerl*) vengono sfruttate per correggere l'acidità dei terreni e migliorare la ritenzione idrica dei medesimi, come avviene nel mantenimento dei campi da golf. Qui, oltre a migliorare la consistenza del suolo (*green*) attraverso il tessuto creato dalle alghe calcaree, è necessario ridurre la frequenza delle irrigazioni. Effetto che si ottiene grazie all'elevato contenuto in alginati delle alghe.

Golf Club Bogliaco – Lago di Garda (Brescia).

TRATTAMENTO DELLE ACQUE REFLUE (IN ALLEVAMENTI E INDUSTRIE)

L'acqua non depurata emessa dalle vasche degli allevamenti rischia di provocare grossi inquinamenti ambientali, essendo ricca di nutrienti, principalmente residui di mangime non utilizzato.

Per ovviare all'inconveniente, la scienza ha escogitato la cosiddetta "*acquacoltura integrata*", in cui i reflui vengono raccolti entro bacini artificialmente popolati da alghe selezionate (*Laminaria*, *Gracilaria*, *Ulva*). Queste metabolizzano gli scarti prodotti nelle vasche e,

a loro volta, costituiscono una fonte di mangime per pesci, crostacei e molluschi allevati. Si calcola che l'abbattimento dell'azoto ammoniacale prodotto dagli animali allevati sia del 90% e che la resa del pescato raggiunga livelli interessanti.

Impianti del genere hanno avuto successo in allevamenti di salmonidi (Canada, USA), di gamberi (Cile) e di ostriche (Francia).

Due problemi legati alle acque di scarico (in senso generale) possono trarre beneficio dalle alghe.

Nel primo caso si tratta di **ridurre l'azoto totale e i composti fosforati** che vengono eliminati con l'acqua dagli insediamenti urbani (e dagli allevamenti intensivi) prima che essi raggiungano fiumi, laghi e mari, favorendo l'eutrofizzazione, cioè la crescita esagerata di alghe blu-verdi, la cosiddetta "fioritura" (*bloom)*.

Alcune alghe verdi (*Enteromorpha* e *Monostroma*) catturano l'ammoniaca, adoperando l'azoto per la loro crescita e, al tempo stesso, assorbono più fosforo del necessario. Queste alghe resistono bene alle variazioni di salinità, un requisito fondamentale per poter sopravvivere e funzionare presso gli estuari dei fiumi, dove acque dolci e salmastre si mescolano in continuazione.

Nel secondo caso l'obiettivo è di **rimuovere metalli tossici** dalle acque di scarico delle industrie. Si è notato che alghe brune (*Sargassum*, *Laminaria*, *Ecklonia*) e verdi (*Ulva*, *Enteromorpha*), esaminate sotto il profilo della sicurezza alimentare, mostravano all'interno delle loro cellule forti quantità di metalli, come rame, zinco, piombo, nickel, cadmio. Dalle cellule di alghe brune (*Ecklonia*, *Lessonia*, *Laminaria*) è stata estratta una sostanza insolubile, simile alla cellulosa, capace di legare fortemente i metalli concentrandoli. Attualmente questa sostanza viene ricavata durante la produzione industriale di alginato. Le stesse proprietà assorbenti verso cadmio, rame, zinco sarebbero possedute dai fertilizzanti liquidi, derivati dalle alghe e adoperati in agricoltura.

UTILIZZO DELLE ALGHE IN FARMACOLOGIA E COSMESI[3]

Alghe Come Farmaci

Mari e oceani, laghi di acqua salmastra o di acqua dolce di natura vulcanica, contengono circa 500.000 specie viventi e circa 20.000 sono alghe: si tratta di un'immensa riserva di prodotti naturali da salvaguardare e le alghe, sia marine che di acqua dolce, rappresentano un interessante campo di ricerca per la farmacologia e la medicina. Il mare e i laghi costituiscono quindi importantissimi ambienti dai quali poter estrarre prodotti biologicamente attivi e potenzialmente utili, sia in medicina che nell'alimentazione.

La parola «alga» deriva dal latino *algae* (erba del mare); già nell'antica Cina, nella "Materia Medica", vengono descritte le alghe come piante officinali.

L'importanza delle alghe marine in medicina è dovuta alla presenza di sostanze uniche nel mondo vegetale:

ALGINATI, scoperti nel 1813, che si estraggono dalle **alghe brune**, utilizzati ampiamente in medicina ufficiale come *gastroprotettivi* nella terapia del *reflusso gastroesofageo*. Gli alginati derivano dalla parete cellulare delle alghe brune *Laminaria* e *Ascophillum* diffuse in Europa e negli Stati Uniti.

Se ne estrae l' ACIDO ALGINICO, polimero dell'acido D-mannuronico, che può essere convertito nel suo sale (alginato) di sodio o di calcio. Il primo, solubile in acqua, è usato come addensante e stabilizzante in industria alimentare e farmaceutica. Il secondo, insolubile, trova impiego in medicamenti ed in garze emostatiche. Derivati dell'acido alginico sono oggetto di studio per un loro uso nella prevenzione e nel trattamento delle conseguenze dell'azione dello stronzio radioattivo (Sr^{90}).

AGAR-AGAR che si estraggono dalle **alghe rosse** usati in batteriologia nella preparazione delle colture in laboratorio e farmacologicamente utilizzati come *gastroprotettivi*, indicati nei casi di *stipsi*. L'agar-agar non può essere digerito dagli enzimi presenti nella maggior parte degli organismi, batteri e miceti compresi, per questo motivo è utilizzato in microbiologia per solidificare i terreni di coltura per tali microorganismi.

CARRAGENINE La carragenina è costituita essenzialmente da sali di calcio, potassio, sodio, magnesio e da esteri solforici dei polisaccaridi che, per idrolisi, danno galattosio e 3,6-anidrogalattosio. La carragenina fu introdotta su scala industriale negli anni '30 del '900, ma fu usata già in Cina nel 600 a.C. e in Irlanda nel 400 d.C.. Oggi, il più grande produttore di Carragenina sono le Filippine, che coprono l'80% del consumo mondiale.

Esistono, nelle antiche farmacopee, usi dimenticati e superati. Esempio l'uso della *Corallina officinalis L.*, diffusa sulle coste del Mediterraneo e dell'Atlantico, usata in passato come antielmintico contro gli ascaridi e gli ossiuri.

Sul fronte farmaceutico potenziali nuovi approcci terapeutici sono oggetto di studi in tutto il mondo, dal Giappone agli Usa. In Italia gli studi sulle ***alghe azzurre*** all'Istituto Mario Negri sono ancora agli inizi ma, a partire da molecole sintetizzate dai cianobatteri, sono stati evidenziati ***potenziali candidati farmaci come anti-tumorali, anti-infiammatori, anti-virali***. In particolare nel campo degli ***anti-tumorali***, alcune molecole sono ***già*** state ***sperimentate in fase clinica***, mentre per quanto concerne anti-infiammatori e anti-virali gli studi sono molto più recenti e, quindi, al momento sono disponibili solo i dati pre-clinici, comunque molto significativi, che fanno ben sperare sulla possibilità di utilizzare queste molecole in campo terapeutico.

Polisaccaridi

Le Alghe come ***integratori*** in ***compresse*** o ***polvere*** hanno un elevato potere nutrizionale. Che l'importanza delle alghe, sotto il profilo economico, sia enorme è dimostrato fin dal Medioevo, e infatti le alghe furono usate, in periodo di carestia, in tutta Europa; è risaputo inoltre che l'***Alaria esculenta*** fu utilizzata come cibo nei paesi e nelle isole dell'Atlantico settentrionale.

Le alghe possono essere utilizzate in varie patologie e possono supportare o addirittura sostituire, in caso di intolleranza al farmaco, le terapie della medicina ufficiale.

Dal ***mare*** si raccolgono alghe ad alto contenuto di ***iodio***, le alghe ***KELP.*** Con il nome generico "***Kelp***" vengono commercializzate ***alghe brune***, appartenenti al genere *Laminaria*, il ***Fucus vesiculosus*** la cui parte edibile viene spesso chiamata "***Kombu***". Per questo motivo i due termini possono essere utilizzati come sinonimi.

Composizione e proprietà delle *Kelp*:

Iodio inorganico (0,05%) e proteico (0,07%). Mucopolisaccaridi (circa il 65%) tra cui alginati (12-45%), fucoidina e laminaria. Polifenoli. Fitosteroli (fucosterolo), Tetraterpeni; olio essenziale; sali minerali (15%) ed oligoelementi. Vitamine (A, B_1, B_2, C, D, E). Proteine (5%); Lipidi (1-2%). Carotenoidi.

Proprietà riconosciute delle alghe *Kelp* (uso interno):

Stimolanti "indirette" del metabolismo generale. Remineralizzanti. Iodofore. Ipolipemiche. Ipoglicemiche. Antiacide. Emollienti. Antinfiammatorie. Immunomodulanti. Assorbenti metalli pesanti ed altri elementi tossici. Anticoagulanti. Depurative ematiche. Lassative.

L'estratto di ***alga kelp***, proposto dall'inizio del secolo nella terapia del gozzo tiroideo e del cretinismo, ha prodotto dei risultati significativi, anche se spesso discordanti a causa della variabilità nel contenuto di iodio nei vari campioni nonché del diverso grado di assorbimento. Ora viene utilizzato un estratto secco titolato 0,1% di Iodio organico con dose giornaliera di 150 mg, pari a 150 mcg, ovvero il 100% del RDA. L'OMS aumenta la dose a 200 mcg/die durante la gravidanza e l'allattamento, nei neonati 50 mcg/die, nei bambini da 1 a 10 anni 90-120 mcg /die.

La carenza di Iodio nell'organismo può provocare problemi di eccesso di muco ai seni paranasali, palpitazioni, stanchezza, ipercolesterolemia, aumento ponderale.

Oggetto di studio è la **FUCOIDINA**, un polisaccaride solfatato che si lega e blocca la funzione di L- e P-selectine. Gli studi hanno valutato se un trattamento con fucoidina potrebbe impedire l'infiltrazione dei neutrofili e quindi invertire l'infiammazione sistemica. Altri studi

sono indirizzati a valutare la capacità di inibire la carcinogenesi; si ipotizza che possa essere considerato un alimento anticancro, in particolare per quello alla mammella.

Il ***Lithothamium calcareum*** appartiene alle alghe rosse fossili. Solo nel XIX secolo è stato riconosciuto come pianta. La piccola alga rosso-violetta cresce solo molto lentamente (un millimetro all'anno). Grazie alla sua capacità di concentrare le sostanze nutritive presenti nell'acqua marina, l'alga *Lithothamium* contiene più di 32 sostanze presenti in traccia (ad esempio, iodio, selenio, silicio, zinco, cobalto, ferro, rame e cromo), che sostengono la rimineralizzazione dell'organismo umano.

È inoltre ricco di vitamine e aminoacidi. Tra i minerali importante è il ferro, che è necessario per la formazione di emoglobina. L'alto contenuto di calcio agisce preventivamente contro la perdita di calcio ed è importante per il mantenimento della struttura delle ossa. Il magnesio, quale sua componente principale, regola le reazioni neuromuscolari, agisce preventivamente contro lo *stress* e ha un effetto equilibrante.

È inoltre una delle poche fonti naturali di silicio organico. Il silicio sostiene la sintesi del collagene e dell'elastina e la normale stimolazione delle cellule osteopoietiche.

È importante per la normale formazione delle ossa e dei denti, il mantenimento dell'elasticità della pelle e del connettivo, rinforza le unghie e dà tono ai capelli.

ALGA DULSE (*Palmaria palmata*)

Alga rossa che cresce spontanea nelle coste più fredde degli Oceani Pacifico e Atlantico. Si sviluppa a circa 20 metri di profondità, nella zona intermedia tra bassa ed alta marea. È molto apprezzata a scopo nutrizionale per la ricchezza di fibre e aminoacidi. Tra questi spicca la **lisina**, notoriamente famosa per la sua efficacia nel contrastare la replicazione del virus erpetico, mentre è assente l'arginina, che invece ne supporta la replicazione. Questa sua caratteristica fa intuire l'utilità di quest' alga nei confronti della prevenzione e del trattamento nutrizionale dell' *Herpes Simplex*. Completa l'azione il contenuto di vitamina C e di tutto il gruppo B.

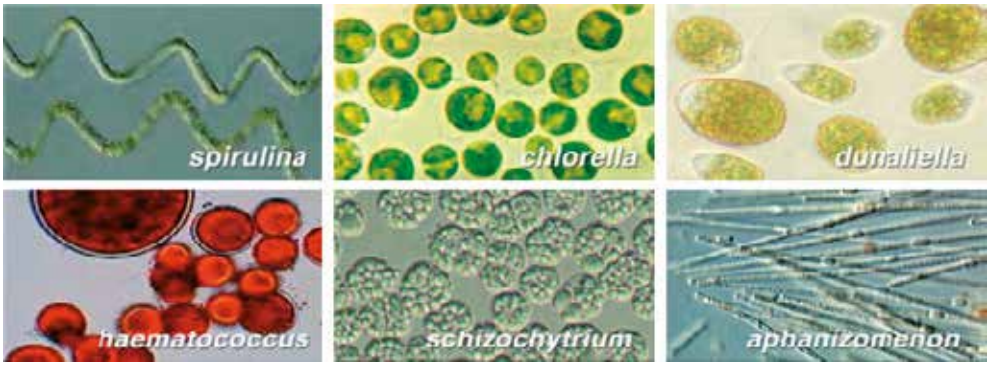
FUCOXANTINA

Carotenoide tipico delle alghe brune; le più generose fonti sono: *Undaria pinnatifida* (*Wakame*), *Laminaria japonica* (MA-Kombu), *Hijkia fusiformis* (Hijiki).

Viene utilizzata in integratori alimentari che contengono estratti di alga titolati al 10% in fucoxantina. In questi estratti è presente anche una non certo trascurabile quantità di Iodio. Il dosaggio giornaliero è di 200 mg /die.

Questa sostanza è tutt'ora oggetto di studio per le possibili applicazioni nella lotta contro il sovrappeso, da parte di ricercatori giapponesi. La sua capacità di ridurre il *grasso addominale* è da attribuire all'attivazione di una proteina, chiamata UCP1, che aumenta l'utilizzo dei grassi di deposito con effetto termogenico.

L'assunzione di Fucoxantina deve essere accompagnata da una fonte alimentare di grassi, olii vegetali o olii di pesce, che ne aumentano la biodisponibilità, come da studi effettuati. Essa stessa sembra stimolare la produzione di acido docosaesanoico (DHA).



Alga Klamath - Alga Spirulina - Alga Chlorella - Parti usate: tutta la pianta.

L'alga ***Klamath***, il cui nome scientifico è *Aphanizomenon Flos-Aquae* è utilizzata da più di 18 anni, in America e nel mondo. Questa è l'unica alga verde-azzurra di acqua dolce a crescere spontaneamente, e in maniera completamente naturale, in un lago incontaminato e ricchissimo di depositi vulcanici. Per questo, *l'Aphanizomenon Flos-Aquae* può essere considerata la regina delle microalghe verdi-azzurre. In quanto tale, essa genera in misura assai maggiore e con maggiore profondità quei benefici che sono tradizionalmente riconosciuti a tutte le microalghe verdi-azzurre. La superiorità qualitativa dell'alga *Klamath* è dovuta non solo alle diverse condizioni di crescita di cui essa gode, ma anche ad originali caratteristiche strutturali, che la rendono in assoluto il cibo più completo e assimilabile tra tutti quelli conosciuti.

Per riassumere le caratteristiche generali delle microalghe, vediamo cosa scrivono i testi cinesi:

Costituenti:

Proteine 50-71%, aminoacidi (fino a 20, di cui 8 essenziali), clorofilla fino al 6%, lipidi 5%, acidi nucleici RNA e DNA, minerali e minerali traccia 12-15% (tra i quali calcio, potassio, ferro, fosforo, iodio, magnesio, zinco, titanio, rame, cobalto, cloro, manganese), vitamine (betacarotene, C, B_1, B_2, B_6, B_{12}, niacina, colina, acido folico, biotina, acido pantotenico, inositolo, betatocoferolo E), phytol 1%, steroli 2%.

Qualità effettive:

Primaria: leggermente dolce e salata, neutra
Secondaria: nutritiva, ristorativa, dissolvente
Tropismo: tutti gli organi e tutti i dodici meridiani
Terreno: tutte le crasie, i biotipi e le costituzioni
Categoria: erba moderata senza alcuna tossicità cronica

Evidenze cliniche e ricerche scientifiche

Ben 61 lavori fra il 1968 ed il 2003 sono elencati su *Medline* circa le caratteristiche botaniche e le indicazioni cliniche relative alla *Aphanizomenon Flos-Acquae*. Gli studi più interessanti riguardano la normalizzazione della funzione micro-circolatoria, l'attivazione dei monociti, la stimolazione dell'attività immunostimolante, la riduzione dell'assorbimento degli acidi grassi. La componente polisaccaridica è responsabile della immuno-modulazione e dell'azione capillari-protettrice ed ipo-lipemizzante. In soggetti con fototipo chiaro o con fotodermatosi l'uso deve essere prudenziale nel periodo primaverile ed estivo.

Lago del cratere Klamath, Oregon (USA).

Spirulina

Le popolazioni del lago Ciad usavano, nella loro alimentazione, il *Dihè (Spirulina platensis*) e gli Aztechi, prima della conquista del Messico da parte degli Spagnoli, utilizzavano nell'alimentazione il *Tecuitlat* (*Spirulina maxima)*.

È un'alga planctonica blu-verde, ricca di proteine e aminoacidi, betacarotene, clorofilla, fonte naturale di vitamina B_{12} insieme ad un'ampia varietà di vitamine, minerali, oligoelementi e macro nutrienti. É una fonte proteica per vegani e vegetariani.

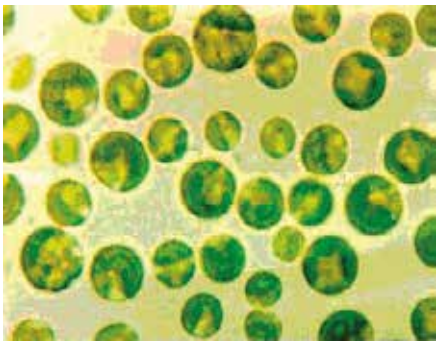
Esistono ampie differenze fra ***Klamath*** e ***Spirulina***. Lo spettro degli aminoacidi della *Spirulina* è inferiore, sia come numero di aminoacidi, sia come proporzione e assimilabilità. Inoltre la *Klamath* possiede molte più sostanze antiossidanti e una migliore sinergia, ha molti più acidi grassi essenziali, come omega-3 e omega-6, nella proporzione ottimale (2:1). La *Spirulina*, che cresce in acque calde tropicali, ha un contenuto minore di acidi grassi essenziali e mentre la *Klamath* contiene esclusivamente acidi grassi polinsaturi e monoinsaturi, la *Spirulina* ha una percentuale consistente di grassi saturi.

Lo spettro delle vitamine è assai più ampio nella *Klamath* che nella *Spirulina*. Ad esempio, la *Klamath* ha da 5 a 10 volte più vitamina C che la *Spirulina*, una maggiore quantità e migliore qualità di B_{12}, la colina, ingrediente fondamentale dei fosfolipidi del cervello, assente nella *Spirulina*. Il betacarotene della *Spirulina* manca del corredo degli altri 14 carotenoidi, presenti invece nella *Klamath*, il che rende il betacarotene della *Spirulina* molto meno assimilabile ed efficace. Infine, la ***Spirulina*** cresce in acque 100 volte più saline di quelle in cui cresce la *Klamath,* con un pH 10 contro un pH di 6.9-7.4 della *Klamath*, il che aumenta i quantitativi di iodio e sodio.

Chlorella

La *Chlorella* è un alga unicellulare eucariota, con un diametro compreso tra i 2 e gli 8 *micron*. Cresce in stagni ricchi di sali minerali ed è stata tra i primi esseri viventi apparsi sulla terra. In condizioni favorevoli, *Chlorella* si sviluppa velocemente, quadruplicandosi in meno

di 20 ore. Questo grazie al CGF, *Chlorella Growth Factor*, scoperto nel 1950 nel *Tokyo Science Institute*. È ben conosciuta per la sua azione purificatrice e curativa, grazie al suo alto livello di nutrienti e clorofilla. Nella *Chlorella* è possibile trovare una concentrazione di clorofilla estremamente elevata, da 10 a 100 volte di più di quella che generalmente si rinviene nelle verdure a foglia verde.



Studi in vivo hanno dimostrato la capacità detossificante della *Chlorella* da sostanze tossiche, quali cadmio, uranio, mercurio. Recentemente ricercatori hanno concluso che la somministrazione di questa alga può essere utile in presenza di diossine, per facilitarne l'eliminazione dai tessuti.

Dunaliella salina

È un'alga unicellulare, rossa, ricchissima di beta-carotene, alfa-carotene ed altri carotenoidi, criptoxantina, zeaxantina, luteina. Questa alga cresce prevalentemente nei laghi salati dell'Australia.

Il beta-carotene è un carotenoide ad azione antiossidante, utile come difesa naturale contro i processi di invecchiamento e nelle alterazioni cellulari indotte dai radicali liberi.

Precursore della vitamina A, consente all'organismo la sintesi della stessa senza preoccupazione di possibili effetti tossici.

Haematococcus pluvialis

È un'alga unicellulare d'acqua dolce della famiglia delle Cloroficee. La peculiarità dell'*Haematococcus pluvialis* consiste nella capacità di questo semplice organismo di sviluppare grandi quantitativi di *Astaxantina*, un potente antiossidante, per far fronte a situazioni di *stress* ambientale.

Risulta essere uno degli antiossidanti più attivi, ad azione antinfiammatoria e immunostimolante, antinvecchiamento, miglioratore delle *performance* sportive e della fecondità maschile.

Oltre all'azione antiossidante, antinfiammatoria e immunostimolante, l'astaxantina è risultata essere un eccezionale alimento per i mitocondri, aumentandone di molto la produzione di energia (ricordiamo che i mitocondri sono il motore che alimenta le cellule dal punto di vista energetico). Il meccanismo *radical-scavenger* (antiossidante) è ben documentato, ma esula da questa breve descrizione; tuttavia il suo effetto è piuttosto evidente in ambito clinico. Esistono vari metodi di analisi che possono misurare lo stato di *stress* ossidativo di un soggetto e in tutte le prove condotte l'astaxantina ha dimostrato di ridurre considerevolmente la quantità di radicali liberi.

La **potente attività antiossidante** riduce di fatto anche l'infiammazione e al contempo produce una **stimolazione integrata del sistema immunitario**. Anche a dosaggi inferiori a 40 mg al giorno, si è visto che questa molecola aumenta la produzione di linfociti B e T, nonché l'aumento dell'efficienza di questi nei confronti delle molecole estranee.

L'astaxantina riduce anche i valori di **trigliceridi** nel sangue, migliorando contemporaneamente il **rapporto HDL/LDL**, spostandolo a favore del primo (il cosiddetto colesterolo buono).

Schizochytrium

Da microalghe fermentate purissime ed incontaminate della specie *Schizochytrium*, originaria della fossa delle Marianne, si ottiene un integratore di acidi grassi omega-3, il DHA algale, ottenuto per estrazione.

La fonte naturale e vegetale di questo tipo di DHA garantisce un'elevata quantità costante di DHA, poiché non soggetta alle variazioni stagionali ed ambientali riscontrate nelle fonti derivate dal pesce.

Il DHA algale si caratterizza per l'assenza di metalli pesanti, iodio, diossine e per l'assenza di retrogusto del pesce.

La moderna tecnologia di produzione, utilizzata per l'estrazione dell'olio di algale, non impiega alcuna tecnica di genetica molecolare, né vengono effettuate tecniche di manipolazione, di ricombinazione o di frazionamento. L'**acido docosaesaenoico** (DHA) è un grasso omega-3 o PUFA n-3 (*Poliunsatured Fat Acid*). Nella struttura chimica, il DHA è un acido carbossilico con una catena di 22 atomi di carbonio e 6 doppi legami in posizione *cis*.

Il DHA è un componente fondamentale di tutte le membrane cellulari e svolge un ruolo determinante nello sviluppo della funzionalità degli organi, specialmente a livello dell'apparato cerebrale, dell'apparato riproduttivo e del tessuto retinico.

Numerosi studi clinici e scientifici a livello internazionale negli ultimi anni hanno evidenziano che il DHA gioca un ruolo fondamentale:

- nella prevenzione delle patologie cardiovascolari
- nello sviluppo del sistema nervoso, visivo e cognitivo del bambino
- nella prevenzione dell'invecchiamento neurologico e nella protezione dai processi neurodegenerativi
- nel prevenire i processi ossidativi degenerativi delle patologie oculari e della degenerazione maculare legate all'età.

I benefici legati all'integrazione di DHA sono:

- riduzione dei trigliceridi
- riduzione dell'aggregazione piastrinica e della viscosità sanguigna
- inibizione dello sviluppo di placche aterosclerotiche
- abbassamento della pressione sanguigna
- riduzione della fibrillazione ventricolare e delle aritmie.

LE ALGHE E LA BELLEZZA

Fanghi d'alghe

Sono un binomio ormai inscindibile, da secoli. Il mare dà una grande mano al nostro benessere e alla nostra bellezza. Ancora oggi le alghe sono tutto questo: **cibo, medicina naturale, cosmetici.** L'**Algoterapia** è una parte importante nella Talassoterapia, che è l'arte di guarire con tutto ciò che concerne il mare.

Fucus vesiculosus

Una delle alghe brune più efficaci contro la cellulite e più spesso impiegata nei fanghi d'alga. Grande alga atlantica, contiene una straordinariamente alta concentrazione di sali di potassio e iodio in grado di facilitare il drenaggio della ritenzione idrica legata alla cellulite. Raccolta lungo le coste del Nord Europa, in particolare in *G*ran Bretagna, sulle sponde del Canale della Manica e nel Nord della Francia.

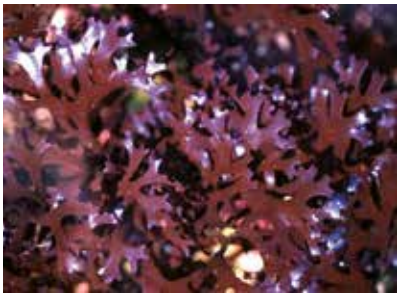
Laminaria digitata

Condivide con *Fucus* l'*habitat* e la spiccata azione anticellulite. Grande alga bruna caratterizzata da una struttura "a dita", da cui il nome, viene raccolta in grandi quantità lungo le coste britanniche. I suoi tessuti sono ricchi di sali minerali (specialmente di iodio, potassio e magnesio), vitamine e acido folico.

Undaria pinnatifida

Alga bruna del Pacifico, nota in Giappone come *wakame*, già piatto forte della cucina orientale, è ricca di alginati e soprattutto di acido folico. Forse è proprio grazie alla presenza di questa preziosa vitamina che gli impacchi per i capelli a base di *Undaria* risultano stimolanti per la ricrescita e fortificanti.

Chondrus crispus



Detto anche "catena muschio d'Irlanda", è un'alga rossa da cui si estraggono le carragenine, polisaccaridi lineari, mononeri di D-galattosio e gruppi solfato.

Le carragenine sono impiegate in campo cosmetico come viscosizzanti e stabilizzanti di emulsioni e sistemi tensioattivi. Si utilizzano in concentrazioni comprese tra lo 0,1 e il 2% a seconda del loro impiego come stabilizzanti o gelificanti della fase acquosa.

Carragenine ed oligoelementi sono contenuti nel ***Codium tomentosum***, piccola alga verde tipica dell'Atlantico Nord Orientale, specialmente delle Isole Britanniche.

Viene particolarmente impiegata in creme idratanti e nutrienti, perché regola l'umidità della pelle. Così pure la ***Hypnea musciformis***, filiforme alga rossa diffusa in tutto il mondo. Viene impiegata in trattamenti idratanti e rivitalizzanti. Ingrediente chiave per creme e bagni per pelli secche e disidratate.

Sargassum sp.

È un alga bruna, spesso di grandi dimensioni, il cui alto contenuto in fucoxantina (caratteristico carotenoide comune a tutte le alghe brune) viene particolarmente apprezzato in cosmetica, dove viene impiegato in creme rigeneranti.

Gelidium sesquipedale

È un'elegante alga rossa, diffusa nel Mediterraneo e nell'Atlantico (specialmente lungo le coste marocchine, dove dà vita a un'intensa attività di raccolta), ricca di oligoelementi e aminoacidi, viene spesso impiegata nell'industria cosmetica in creme rivitalizzanti.

Porphyra umbilicalis

Alga rossa diffusa in tutto il mondo e particolarmente impiegata in cucina, dalle Isole Britanniche al Giappone, dove viene chiamata *nori*. Il suo alto contenuto in acidi linolenico e linoleico rende *Porphyra* particolarmente indicata nel trattamento della pelle (che ne trae giovamento ritrovando la sua naturale elasticità). Indicata anche come cura dell'eczema. L'alga *nori* ha un alto contenuto di **provitamina A**, una delle migliori opzioni per coloro che desiderano rafforzare la salute delle unghie e dei capelli.

Lithothamnium calcareum

È particolarmente ricca di molecole biologicamente attive, tanto da contenere un completo corredo di vitamine, aminoacidi essenziali e minerali. Questo prezioso patrimonio rende *L. calcareum* un apprezzato integratore alimentare e un ingrediente prezioso di creme e altri preparati in grado di stimolare la produzione di elastina e collagene.

E queste sono soltanto alcune alghe. Molte altre vengono già impiegate nel campo della cosmetica naturale e di molte altre ancora la scienza scoprirà le straordinarie proprietà nei prossimi anni. Non ci resta che aspettare e avere fiducia nelle infinite risorse del mare.

UTILIZZO DELLE ALGHE NELLE ENERGIE ALTERNATIVE[1]

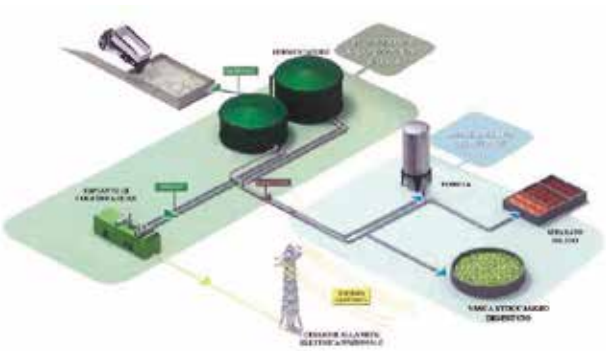
Gas Metano

I primi esperimenti degli anni '70 al largo delle coste della California con *Macrocystis pyrifera,* alga produttrice di biomasse lunghe fino a 20 metri, furono un fallimento.

In seguito, prove che sfruttavano altre specie diedero risultati più promettenti, pur sempre evitando la coltivazione in mare aperto per l'insidia delle tempeste.

Si è visto che in *Laminaria*, *Gracilaria*, *Macrocystis* e *Sargassum* avviene una bioconversione dai carboidrati (principalmente il mannitolo) e dall'alginato, con formazione di metano per fermentazione anaerobia.

I progetti per sviluppare questo settore di produzione energetica non mancano, ma finora non sembrano aver raggiunto grandi risultati.



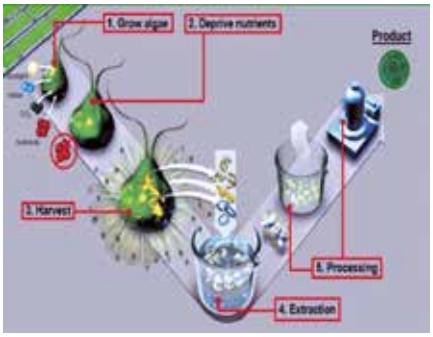
Biodiesel

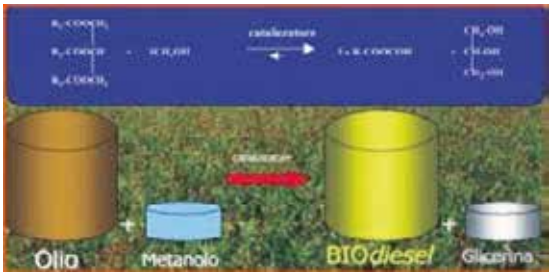
Il procedimento si basa sulla quantità di lipidi molto elevata (fino al 70% del peso secco) che si può ottenere con certe specie di alghe, in rapporto anche all' area coltivata. La biomassa, sviluppata in bacini artificiali o in fotobioreattori, supera di gran lunga la resa in oli ad alto contenuto di energia offerta dalla soia o dalla palma.

Il procedimento di produzione del carburante inizia con l'estrazione di trigliceridi mediante esano dalla biomassa essicata. I trigliceridi, messi a reagire con metanolo in raffineria secondo gli schemi *standard* di trans-esterificazione, danno luogo alla formazione di biodiesel.

Tecniche alternative di estrazione degli oli prevedono l'impiego di altissima temperatura e pressione sulla biomassa umida.

Fra le specie ad elevato contenuto lipidico, economicamente convenienti per la fabbricazione di biocarburanti, primeggia *Ulva*, una microalga a rapido sviluppo, che gode di un ciclo di raccolta molto breve (<10 giorni).





UTILIZZO DELLE ALGHE IN EDILIZIA. DAL MARE ALLE CASE[1]

La "BIQ House"

Questo è il primo edificio a bioenergia alimentato ad alghe, sorto presso Amburgo, in Germania, concepito da uno studio d'ingegneria (fondato da **Ove Arup)** in occasione della *International Building Exibition* (IBE) del 2013 e disegnato in collaborazione con gli architetti della *Splitterwerk* di Graz (Austria). È stato realizzato tra dicembre 2011 e marzo 2013 ed è costato 3,4 milioni di euro.

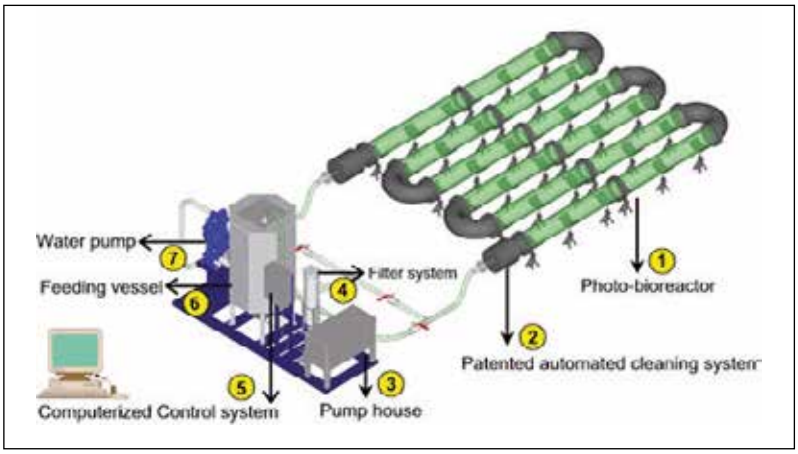
Si chiama *BIQ-House*, è il prototipo di "*bio-adaptive façade*", cioè una facciata alimentata a micro-alghe in grado di coprire il 100% del fabbisogno energetico dell'edificio.

Essa è composta da 129 **bioreattori (PBR)** contenenti le **micro-alghe,** che innescando il processo di **fotosintesi** producono la biomassa e quindi l'energia termica per alimentare l'edificio.

È un edificio residenziale di 1.600 mq che conta quindici unità abitative che variano dai 50 ai 120 metri quadrati. Grazie all'ombreggiamento dell'edificio, si riesce a mantenere una temperatura più bassa in estate, in modo «naturale», mentre il calore prodotto dalla biomassa delle alghe viene usato per riscaldare l'edificio nel periodo invernale e come fonte di energia elettrica. Dalla biomassa viene infatti estratto il metano in un vicino impianto di biogas; contemporaneamente viene prodotto calore, che viene immesso nuovamente nell'edificio. Ogni metro quadrato della superficie della facciata rende circa 15 grammi di biomassa al giorno, che a sua volta consente la produzione di circa 4.500 kWh/anno (una famiglia composta da quattro persone consuma circa 4 mila kWh).
L'innovativa facciata disegna il prospetto sud-ovest e sud-est, mentre sui prospetti opposti *slogan* a fumetti sintetizzano il significato energetico dei curiosi schermi solari verdi (*photosynthesis*). Fasce marcapiano simboleggiano e celano i tracciati impiantistici che collegano i fotobioreattori al locale tecnico.
I **pannelli PBR** svolgono una **tripla funzione energetica per l'edifico**: fungono da schermo solare orientabile, da produttori di biomassa (e di conseguenza biocombustibile) dalle microalghe in esso contenute e da collettori solari termici. Le alghe crescono all'interno dei bioreattori alimentate da un circuito chiuso che corre lungo la facciata e trasformano in ossigeno la CO_2 proveniente dai gas di combustione del generatore termico a gas.
Quando si accumula una sufficiente quantità di alghe, esse vengono raccolte e inviate al locale tecnico per la trasformazione in biocombustibile (biogas). I fotobioreattori vengono, inoltre, utilizzati come collettori solari recuperando il calore accumulato attraverso uno scambiatore termico. Questo calore può essere così accumulato per l'inverno attraverso sonde geotermiche a salamoia o utilizzato per alimentare direttamente la pompa di calore.
Un nucleo centrale nasconde i servizi igienici e l'angolo-cottura, mentre gli spazi attorno non hanno una funzione fissa: è l'utente, secondo le necessità, ad attribuire alla stanza una funzione piuttosto che un'altra. Gli arredi sono integrati e nascosti lungo le pareti perimetrali; in questo modo un locale soggiorno può diventare la zona letto e viceversa.

"To use bio-chemical processes for adaptive shading is a really innovative and sustainable solution so it is great to see it being tested in a real-life scenario. As well as generating renewable energy and providing shade to keep the inside of the building cooler on sunny days, it also creates a visually interesting look that architects and building owners will like."

Arup's Europe Research Leader, JAN WURM



Schema della struttura di un fotobioreattore orizzontale (tubular reactor).

FUNZIONAMENTO DI UN BIOREATTORE PER ALGHE

Nel caso più frequente si tratta di colture in *batch* (a sistema chiuso). Il volume di terreno liquido (vedi terreni di coltura, parte seconda) nel quale i microrganismi crescono è essenzialmente costante. Le microalghe, crescendo, aumentano la loro biomassa, riducono la quantità di nutrienti disponibile, producono metaboliti da eliminare. Le cellule raggiungono così un livello (detto stato stazionario) tale da impedire di aumentare ulteriormente il loro numero. Sono essenziali: l'illuminazione solare, integrata se necessario da quella artificiale, la termostatazione per il controllo costante della temperatura della soluzione salina di crescita delle alghe, l'ossigenazione garantita da uno *sparger* che immette aria in profondità.

Tre tipi di fotobioreattori - Da sinistra a destra: sistema a pannello (flat panels); a colonna, con immissione d'aria in profondità (bubble columns); cilindrico orizzontale a tubi (tubular).

La Modern Seaweed House

La "***Modern Seaweed House***" è un perfetto esempio di integrazione tra le esigenze del territorio locale e le potenzialità della bioarchitettura: costruita sull'isola svedese di Læsø dallo studio di ingegneria *Vandkunsten* di Copenhagen, sfruttando come **isolante naturale** le abbondanti alghe del genere *Posidonia* che quotidianamente si depositano sulla spiaggia.

Oltre ad essere utilizzati per la copertura, questi cuscinetti di alghe sono stati utilizzati anche per le pareti esterne, trasformandosi nel perfetto isolante naturale tra i pannelli di legno della struttura e l'esterno.

Altamente **isolanti, ignifughe, atossiche e con una vita media di più di 150 anni**, le alghe sono semplicemente raccolte sulla spiaggia, essiccate al sole ed utilizzate al pari di qualsiasi altro tipo di isolante.

La ***Modern Seaweed House*** combina la normale tecnica costruttiva di un edifico in legno con le ottime proprietà dell'isolante naturale a base di alghe.

I PANNELLI ISOLANTI*

In Europa si stima che gli edifici consumino il 40% dell'energia prodotta. Importantissimi, quindi, sono tutti i sistemi innovativi di risparmio energetico, dalla creazione di fonti alternative di riscaldamento all'isolamento termico dei tetti e delle pareti.

Al *Fraunhofer-Gesellschaft Institute* di Pfinztal, vicino a Monaco di Baviera, il più grande centro di ricerca applicata d'Europa, sono stati studiati nuovi materiali per l'isolamento termico, che prevedono

* Comunicazione messa a disposizione dalla Ditta ENZO OMODEI S.p.A. – Materiali Edili - di Brescia.

l'impiego **in edilizia** di **alghe, in particolare del genere *Posidonia*** specie ***oceanica.***

Le proprietà finora evidenziate sono vantaggiose: **isolante dal punto di vista termico ed acustico**, **ignifuga** grazie all'alto contenuto di silicio; è **resistente alle muffe** e in grado di **durare sino a 150 anni**.

Dal punto di vista dell'**isolamento termico,** i *test* evidenziano la capacità di trattenere sino a 2.502 joule per kilogrammo kelvin (J/kgK), il 20% in più rispetto al legno e ai suoi derivati.

Grazie alle sue caratteristiche naturali, la *Posidonia oceanica* può essere utilizzata **senza trattamenti chimici**, risultando così ecocompatibile e completamente rinnovabile.

Il *Fraunhofer-Gesellschaft Institute* ha messo a punto un sistema ottimale per preparare le alghe all'utilizzo in edilizia: i grumi che si formano spontaneamente in inverno-primavera sulle spiagge del Mediterraneo vengono raccolti, scossi e separati con cautela, in modo da formare **fibre lunghe sino a due centimetri** e prive di materiale estraneo o tossico, risultando così ipoallergeniche. Il problema principale nella lavorazione, l'allontanamento della sabbia trattenuta dall'alga, è stato superato con macchine create appositamente dalla Floc Dammtechnik Machinen GmbH e dalla RMC GmbH. Il procedimento non è particolarmente costoso dal punto di vista energetico.

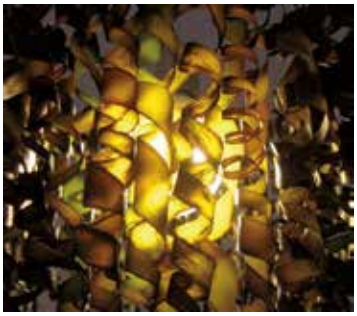
Ne è sorto un prodotto nuovo, presentato sia in sfere che in forma iniettabile nelle cavità murarie. Ultimi nati sono i **pannelli isolanti prefabbricati** da utilizzare per tetti e pareti. La ditta che ne detiene il brevetto è la NEPTUTHERM® di Karlsruhe (Germania).

La *Posidonia oceanica* (o erba di Nettuno) è un'alga molto **diffusa nei mari mediterranei**, che nelle località turistiche viene smaltita come rifiuto, in quanto le parti morte vengono portate a riva dalle maree e sporcano le spiagge. Raccolta a mano, viene trasportata in Germania via mare dalla Tunisia e via terra dall'Albania.

L'impiego delle alghe in edilizia non è una novità: da più di 700 anni la *Posidonia oceanica* viene impiegata in Europa per **ricoprire i tetti delle case**, in alternativa alla paglia, e più di recente come **materiale di riempimento nelle dighe olandesi**.

LE ALGHE NELL'ARREDAMENTO E NEL *DESIGN*

Il *designer* olandese **Mandy den Elzen** ha progettato delle lampade costituite interamente da alghe del tipo *Laminaria*, larghe circa 20 centimetri e lunghe 30. Per crearle l'alga viene bollita, modellata a seconda della forma desiderata e verniciata con un sottile strato di resina acrilica. Il materiale può essere usato come rivestimento o per la produzione di oggetti di *eco-design*, che sfruttano la trasparenza dell'alga per creare effetti di colore e luce.



Julia Lohmann, *designer* tedesca, costruisce lampade con alga *Kombu*. Ovviamente, ogni pezzo è una creazione unica irripetibile. L'ispirazione a progettare e realizzare queste lampade verosimilmente deriva dalla tradizione giapponese.

Sono ben note le lanterne del Sol Levante, costruite adoperando gli stessi materiali naturali (*Laminaria digitata*) provenienti dal mare e oggi ripresi.

Svariati impieghi sono stati descritti circa le tradizioni cinesi in un vecchio trattato di botanica pubblicato in America, in cui Turner (1836) cita le alghe *Laminaria saccharina* (e altre del genere *Fucus*) nella manifattura delle tradizionali lanterne e per conferire lucentezza ai tessuti. Ma forse l'applicazione più curiosa sta, secondo Neil, nella costruzione delle finestre dell'antica Cina, dalla struttura di bambù intrecciato, riempita nelle losanghe con materiale gommoso trasparente derivato dall'alga (*hai-tsai*) (da www.archive.org)

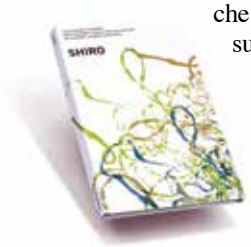
UTILIZZO DELLE ALGHE IN ALTRI USI

Alga - Carta

FAVINI S.p.A. di Rossano Veneto (Vicenza) ha brevettato il processo di produzione di ***Shiro Alga Carta***, una carta ecologica prodotta con alghe, combinate con fibra di cellulosa certificata FSC® (*Forest Stewardship Council*). Originariamente, questa carta fu ideata negli anni '90 per impiegare le alghe che proliferavano in maniera abnorme nella Laguna di Venezia, danneggiandone il fragile ecosistema. Ora questo concetto è stato esteso per proteggere altre aree marine, individuando ambienti lagunari colpiti dal fenome-

no dalla proliferazione abnorme delle alghe, in particolare nella Bretagna Francese. In questo modo viene riciclato materiale altrimenti inquinante e difficile da smaltire. Allo stesso tempo si ottiene un risparmio di cellulosa vergine di albero, in quanto parzialmente sostituita da alghe.

Le alghe in eccesso, combinate con cellulosa FSC®, hanno dato origine ad una carta speciale, che diventa più bianca col tempo, caratterizzata dalla presenza dei residui di alghe sulla superficie, con grammature variabili da 90 a 350 g/m²



Il risultato ottenuto è una carta di alta qualità dalle caratteristiche uniche, in quattro colori, ideale per valorizzare impieghi di forte orientamento ecologico.

Nel 1786 un farmacista di Ginevra, tale M. Colladon, aveva fabbricato della carta partendo da *Conferva rivularis*, sfruttando la proprietà di quest'alga verde del Mar Nero (denominata anche *Cladophora rivularis*) di moltiplicarsi e sedimentare spontaneamente in breve tempo, formando uno strato ricco di cellulosa di notevole spessore.

Les conferves se changent promptement en tourbe, et M. Van Warum a vu le *Conferva rivularis*, L., former 4 pieds épais de tourbe en 5 ans dans le bassin de son jardin, près Harlem (*Ann. du Muséum*, II, 91). M. Colladon, pharmacien de Genève, en a fabriqué du papier.

AGAR-AGAR "TECNICO" E "BATTERIOLOGICO"

Dai dolci di Frau Hesse ai terreni per batteriologia

Non c'è dubbio che il maggior consumatore di *agar-agar* (parola malese) sia l'industria alimentare, principalmente quella conserviera e dolciaria.

Ma l'impiego più interessante di questo idrocolloide ricco di polisaccaridi, estratto dalle alghe rosse, è in campo scientifico. Consiste nella preparazione dei terreni batteriologici solidi adoperati per coltivare i microrganismi *in vitro*.

La sua storia in laboratorio comincia nel 1881 in Germania, a Francoforte, quando Fannie Hesse suggerì di sostituire la gelatina con **agar**. Fanny, moglie americana di Walther Hesse, stava lavorando nel laboratorio di Koch come tecnica e aveva precedentemente usato *agar* per preparare gelatine di frutta, dopo aver sentito dalle amiche decantare le sue proprietà gelificanti.

Da allora gli ingredienti adottati nei laboratori per trasformare i terreni liquidi in solidi (amido di patata, gelatina, uovo coagulato) sono quasi completamente scomparsi. L' *agar-agar* ha reso i batteriologi indipendenti dalle temperature d'incubazione (la gelatina fondeva a +37 °C in termostato e fuori d' estate) ed ha permesso la formulazione di infiniti substrati in piastra o in provetta, idonei all'isolamento delle colonie microbiche in purezza. Oggi questo ingrediente entra nella composizione dei terreni solidi in proporzione dell'1,5% - 2,0% e semi-solidi dello 0.35%.

Chimicamente *l'agar-agar* è definito come un estere sulforico di una molecola lineare di galattano, insolubile in acqua fredda, ma in realtà esso è di composizione variabile, perché formato da **agarosio** (con basso contenuto di solfato e privo di acido piruvico) e da **agaropectina** (con alto contenuto di solfato e di ceneri).

Mentre l'*agar* ad uso alimentare (chiamato anche tecnico) contiene prevalentemente agaropectina, nell' *agar* batteriologico il rapporto è più spostato a favore dell'agarosio (75 : 25).

Altre differenze stanno nel fatto che l'*agar* alimentare può contenere alte concentrazioni di calcio e magnesio (per cui non è molto limpido), mentre quello batteriologico, essendo purificato, si presenta chiaro ed esente da pigmenti.

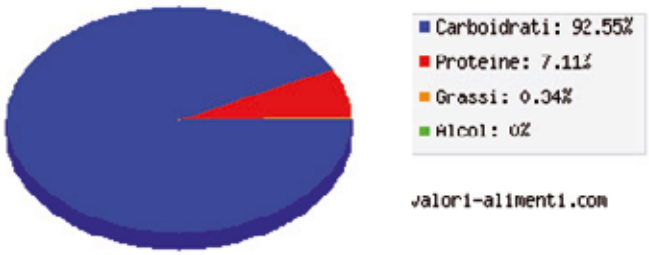
Inoltre quest'ultimo ha bassi livelli di ceneri e metalli ed è libero da composti azotati, zuccheri, sali minerali insolubili.

Unico difetto nell'*agar* batteriologico può essere la precipitazione dei fosfati dopo sterilizzazione in autoclave, causata dalla reazione con residui consistenti di cationi.

Le qualità di *agar* maggiormente purificate (Noble®, Agarose®) sono adatte anche per le analisi più delicate (in immunologia e nell'elettroforesi).

Un confronto delle caratteristiche fisico-chimiche fra *agar* batteriologico e *agar* tecnico (alimentare) è leggibile nella seguente tabella.

Caratteristiche fisico-chimiche	*Agar* batteriologico	*Agar* tecnico (alimentare)
Umidità %	7.0	12.0
Ceneri %	2.0	4.2
Solfati %	0.9	1.7
Calcio ppm	100	400
Magnesio ppm	40	100

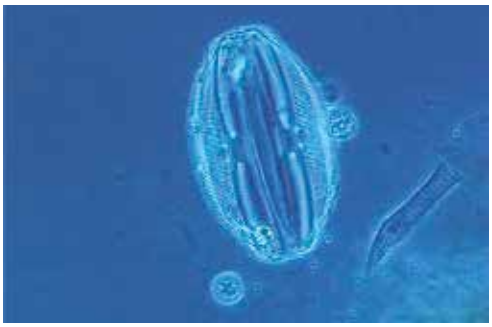


Caratteristiche generali *dell'agar-agar* sono:

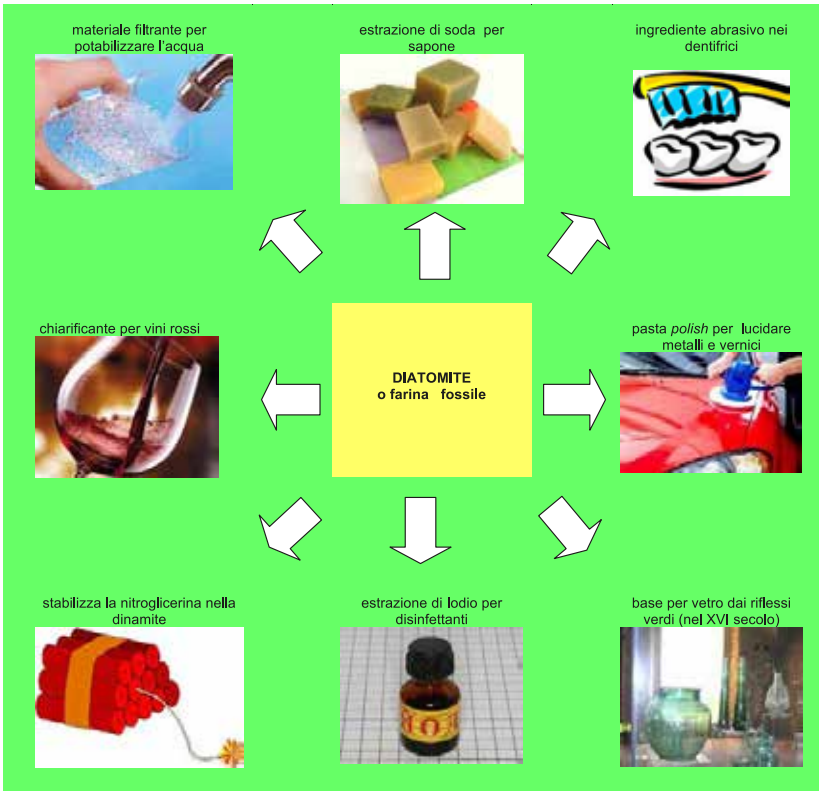
– elevata forza di *gel*, che può arrivare per soluzioni all'1,5% in acqua distillata fino a 1.200 ed anche a 1.500 g/cm^2;
– ampio intervallo tra temperatura di gelificazione (32-39 °C) e temperatura di fusione (non inferiore a 85 °C) del *gel* (isteresi) che quindi è di circa 50 °C;

– reversibilità dei suoi *gel*, che possono essere fusi per ebollizione in bagnomaria e rigelificati;
– basso contenuto di sostanze nutrienti che possono interferire nell'uso di laboratorio.

IL CASO DELLE ALGHE UTILI DA VIVE E DA MORTE: LE DIATOMEE



Gusci calcarei di Diatomee fossili, sedimentati in mari scomparsi, hanno creato rocce friabili riducibili in polvere bianca finissima, la **diatomite** (o farina fossile) dai molteplici usi passati e presenti:

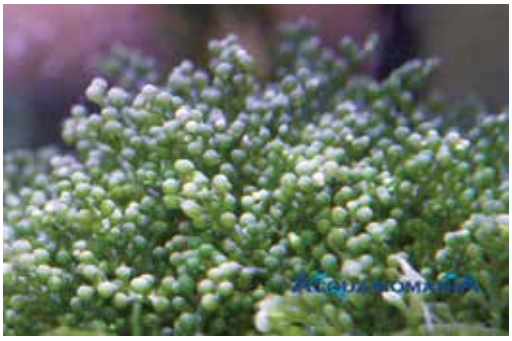


QUANDO LE ALGHE SONO MENO GRADITE

Non sempre le alghe sono apprezzate. Oltre alle "maree verdi o rosse" che danneggiano la fauna ittica, ponendo problemi all'alimentazione e alla balneazione, ci sono anche altre circostanze "sfavorevoli". Almeno due, per dovere di citazione, e si tratta sempre di casi di sovrapopolamento delle alghe stesse.

Le alghe negli acquari

Sono un elemento decorativo o una minaccia ? Non sempre infatti le alghe, che spesso sviluppano spontaneamente negli acquari, risultano ospiti graditi. Poche specie di pesci qui allevati si nutrono di alghe, per cui si assiste ad uno squilibrio di rapporti che può compromettere la vita dell'ecosistema, molto fragile, in quanto artificiale. Inoltre l'elemento vivente è spesso costituito da specie ittiche e da piante acquatiche esotiche decisamente delicate.



Caulerpa racemosa *introdotta in acquario*.

Si considerano generalmente innocue le alghe brune e le alghe verdi, indesiderabili (pericolose) quelle azzurre e quelle rosse.

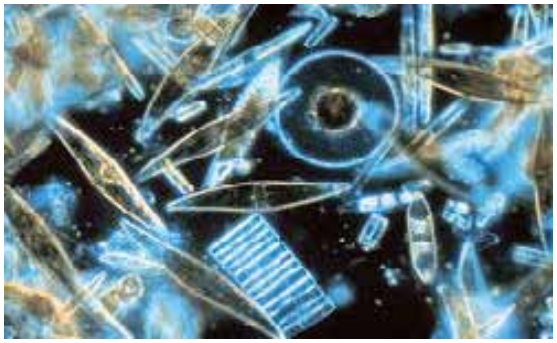
Le alghe azzurre (Cianobatteri) incrementano le quantità di nitrati e di fosfati (i cui valori normali in questi ecosistemi sono: $NO_3 < 30$ mg/l - $PO_4 < 0.25$ mg/l). Il loro controllo può essere esercitato solamente con cambi d'acqua frequenti. Le alghe rosse catturano la luce e quindi interferiscono negativamente sulla vita dei pesci e delle piante acquatiche introdotte.

In pratica le alghe rosse (sviluppano prevalentemente quelle del genere *Compsogon*) vengono combattute se messe in competizione con piante acquatiche a crescita veloce (sul tipo di *Elodea, Higrophila, Cabomba*, in modo da far prevalere queste ultime nell'utilizzo delle sostanze nutritive) e con la riduzione dell'illuminazione.

Le alghe e le imbarcazioni

Un fenomeno noto da sempre. Nessun materiale di costruzione delle barche (legno, ferro, alluminio, plastica) si salva dall'attacco delle alghe, tra cui primeggiano, assieme ai **Cianobatteri**, le **Diatomee**, che agiscono con strutture di adesione ricche di polisaccaridi, formando un *biofilm* (*microfouling*). Successivamente, a questo strato idrofobico, che avvolge la parte sottostante la linea di galleggiamento, si attaccano tenacemente individui di maggiori di-

mensioni, quali coralli, spugne, mitili, anemoni, idrozoi, **balani** (*macrofouling*).



Cianobatteri e Diatomee.

I rimedi sono affidati alla manutenzione della barca con interventi di pulizia e alla chimica con efficaci vernici protettive. L'industria ha generato prodotti appositi "anti-vegetativi" (*antifouling*) a base di biocidi organici e inorganici, ad esempio ossido di rame (Cu_2O) oppure siliconi arricchiti di sinergici a rilascio controllato (*fouling-release-coatings*). Tra queste sostanze di natura organica, antagoniste delle Diatomee, figurano i meroditerpeni estratti da *Cytoseira baccata* (un'alga bruna) e l'acido zosterico da *Zostera marina* (una fanerogama), entrambe presenti nel Mediterraneo (Molino *e Coll*., 2008).

Le incrostazioni, modificando il profilo della carena, aumentano l'attrito con l'acqua e possono rallentare la barca e/o incrementare il consumo di carburante. Inoltre, creando delle vie d'acqua nel rivestimento, possono danneggiare seriamente lo scafo, ad esempio attraverso fenomeni di corrosione su supporti metallici.

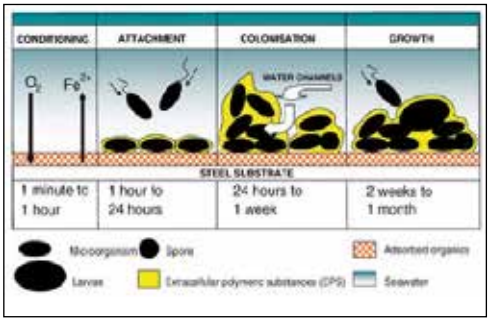
BIBLIOGRAFIA

1) Abdussalam S., Drugs from seaweeds, Medical Hypotheses 1990, *32*, 33-35.
2) Alga-carta - www.favini.com/graphicspecialities/it/shiro-prd-21.php
3) Alganovo – Current status of seaweed world market, www.alganovo.com, 2014-06-30.
4) Arnoldi A., Le alghe nella nutrizione umana, Puntoeffe 2010, 38-43.
5) ARUP Engineering – The BIQ House, www.arup.com, 2013.
6) Brown H., Seaweed: the new diet food ? , Food manufacture 2010, june, 15.
7) www.foodmanufacture.co.uk
8) CELTNET - Celtnet Recipes Main Sitemap, www.celtnet.org.uk, 2014.
9) Dhargalkar V.K. *e Coll*., Southern Ocean seaweeds: a resource for exploration in food and drugs, Aquaculture 2009, *287*, 229-242.
10) Eyras E.C. *e Coll*., Biological evaluation of seaweed composting, Compost Science and Utilisation 1998, *6*, 74-81.
11) FAO Corporate Document Reposition, A guide to seaweed industry, www.fao.org, 2014.
12) FAO - *Seaweeds* used as human food, www.fao.org/docrep, *2014*.
13) Greenbuilding – Dalle alghe l'isolante naturale per il tetto, www.rinnovabili.it, 03.07.2014.
14) Greenideas – Isolante termico dalle alghe: la Posidonia in edilizia, www.costruiregreen.it, 03.10. 2013.

15) Mac Artain P. *e Coll.*, Nutritional value of edible seaweeds, Nutrition Reviews 2007, *65*, 535-543.
16) Molino P.J. *e Coll.*, The biology of biofouling diatoms and their role in the development of microbial slimes, Biofouling 2008, *24*, 365-379.
17) Morgansub – Principali varietà europee di pesci e olluschi, www.morgansub.com.
18) Italfeed S.r.l. – Catalogo materie prime: mangimi ottenuti da alghe *Ascophyllum nodosum* e *Spirulina*, www.italfeed.com.
19) Pangestuti Ratih and Se-Kwon Kim, Neuroprotective Effects of Marine Algae**,** Mar. Drugs 2011, *9*, 803-818.
20) Reina G.G., Usos y aplicaciones de macroalgas, microalgas y cianobacteria en agricoltura ecologica, Universidad de Islas Baleares, UIB, www.fci.uib.es.
21) Turner & Neil (1836) citati in: The medicinal, poisonous and dietetic properties of the Cryptogamic plants, www.archive.com/stream.
22) Wijesekara Isuru, Ratih Pangestuti, Se-Kwon Kim, Carbohydrate Polymers 2011, *84*, 14–21.
23) Yong-Xin Li *e Coll.*, Utilization of seaweed derived ingredients as potential antioxidants and functional ingredients in the food industry: an overview, Food Sci. Biotechnol. 2011, *20*, 1461-1466.

Cytoseira baccata.

Zostera marina.



Si ringrazia BOERO Group S.p.A. di Genova per la consulenza tecnica sulle vernici antifouling.

PARTE SECONDA

Nella pagina precedente:

CA' ROMAN
(oasi del WWF), sull'isola di Pellestrina, nella Laguna di Venezia.
La zona, già importante per la pesca, è sede di numerosi impianti di molluschicoltura.

PREMESSA

Molti passi avanti sono stati compiuti negli ultimi decenni nella conoscenza di strutture, attività metaboliche e riproduttive delle alghe. Questi progressi della scienza hanno portato ad una miglior classificazione e collocazione filogenetica di una parte del loro vastissimo mondo.

Tuttavia i maggiori sforzi nelle ricerche sono stati spesi nello studio delle proprietà tossiche delle alghe. Esse possono diventare un serio motivo di rischio, sia dal punto di vista dell'inquinamento delle acque sia in campo alimentare, in quanto molluschi e pesci assumono e concentrano involontariamente le biotossine da esse prodotte.

Pertanto la sezione ANALISI DI LABORATORIO riporta:

A - metodiche sulla diagnosi delle biotossine di origine algale

B - metodiche sul controllo delle alghe nelle acque

Sottomarina (Chioggia, Venezia) installazioni fisse per la pesca in mare.

A - DIAGNOSI DELLE BIOTOSSINE DI ORIGINE ALGALE

MAURIZIO ZAVANELLA[1], ALESSANDRA MARINO[2]

NOTA

In conseguenza della diffusione mondiale delle tossine nelle acque (e quindi nei prodotti della pesca), numerosi *test* di laboratorio sono stati messi a punto e commercializzati in vari paesi. Dato il numero elevato di prodotti per analisi, è impossibile elencarli tutti. Pertanto vengono qui citati solo alcuni esempi, presi da pubblicazioni di organi di controllo, tra cui, in Inghilterra, *Food Standards Agency* (food.gov.uk) a cui si rimanda per ulteriori informazioni.

Metodi d'analisi di laboratorio per lo *screening* farmaco-tossicologico delle biotossine marine idrosolubili e liposolubili nei prodotti ittici

Divisione delle biotossine	Gruppo	Sigla	Metodo d'analisi
idrosolubili	PSP saxitossine	SXT	HPLC IMMUNO-*TEST*
liposolubili	DSP acido okadaico, dinofisitossine	OA, DTX 1, 2, 3	LC- MS/MS IMMUNO-*TEST*
	Pectenotossine	PTX 1 e 2	
	yessotossine	YTX, 45 OH YTX, homo YTX, 45 OH homo YTX	
	azaspiracidi	AZP 1, 2, 3	

HPLC = cromatografia liquida ad alte prestazioni
LC = cromatografia liquida
MS/MS = spettrometria di massa

A.1 - IMMUNO-*TEST*[(1)]

Test immunologici in ELISA

I metodi immunologici sono in generale rapidi, sensibili ed economici. Si tratta tuttavia di metodi semi-quantitativi, a differenza di quelli chimici, che sono tipicamente quantitativi e quindi più precisi.

Una limitazione dei *test* immunologici sta nella maggior sensibilità che essi dimostrano verso una determinata tossina, piuttosto che verso un'altra o tutte le tossine di quel gruppo. Ad esempio, viene rivelato meglio l'acido okadaico rispetto alle dinofisitossine.

Ciò dipende dall'elevata specializzazione degli anticorpi che entrano in reazione. Di conseguenza, con la prova immunologica può succedere che non viene rivelata l'intera tossicità del campione, ma solo quella parte che si lega all'anticorpo.

Alcuni *kit* diagnostici fra i più diffusi sono riportati nella seguente tabella, desunta da ***Food Standards Agency Buidheann Inbhe-Bidhe, Aberdeen, England,*** "End Product Testing for Shellfish Toxins, Information for Shellfish Harvesters, Growers and Processors", food.gov.uk, 2014, a cui si rimanda per ulteriori informazioni.

Tossine idrosolubili	Saxitossina	R-Biopharm RIDASCREEN®	ELISA
		Jellett ® PSP Rapid Test	Dip Stick Test (*test* collaterale)
Tossine liposolubili	DSP (acido okadaico) dinofisitossine (DTX 1, 2, 3) AZP tossine (azaspiracid 1, 2, 3) Pectenotossine (pectenotossina 1, 2) Yessotossine (45 OH yessotossina, *Homo* yessotossina)	DSP-Check® UBE Biosense Abraxis® Okadaic Acid Rougier Bio-Tech® Test	ELISA
		Jellett® Rapid Test	Dip Stick Test (*test* collaterale)
		Protein Phosphatase Inibition Assay (PP2A) Zeulab Immunotec Toxiline Sceti K.K. DSP Rapid Kit	*Test* funzionali

Pesca di crostacei a Chester Basin, Canada.

METODI IMMUNOLOGICI PER LA RICERCA DELLE TOSSINE IDROSOLUBILI (PSP) SAXITOSSINA E TOSSINE CORRELATE

1. Ridascreen®

La saxitossina è il maggior componente del gruppo di tossine che causano la *Paralytic Shellfish Poison* (PSP) o paralisi respiratoria. Questa tossina blocca i canali dello ione sodio nelle cellule del sistema nervoso e dei muscoli. La dose letale nell'uomo è fra 1 e 3 mg. I sintomi dell'intossicazione (perdita dei sensi, nausea, diarrea) compaiono dopo ingestione di 0,5 – 1 mcg di tossina.

In Europa sono stati posti limiti variabili fra 40 e 80 mcg di PSP per 100 g di alimento e il metodo biologico ne rivela solo 37. I metodi chimici (colorimetrico e HPLC) sono poco specifici. Da qui l'interesse per i metodi immunologici.

Il *test* preso ad esempio è un metodo immunoenzimatico di tipo competitivo. La base del *test* è una reazione antigene-anticorpo che si svolge nei pozzetti di una piastra *microtiter* rivestiti con anticorpi specifici contro la saxitossina.

Aggiungendo quantità note di saxitossina o il campione da analizzare e un enzima perossidasi marcato per la saxitossina (enzima coniugato), la tossina libera e quella marcata competono per legarsi agli anticorpi. L'enzima coniugato che non si lega agli anticorpi viene allontanato con un lavaggio. Dopo incubazione, nei pozzetti vengono introdotti un substrato (perossido d'urea) e un cromogeno (tetrametil-benzidina). Dopo incubazione, l'enzima coniugato che si è legato converte il cromogeno incolore in blu e l'aggiunta finale di un reagente-*stop* (acido solforico) blocca il processo, facendo virare il blu al giallo e questo colore può essere valutato allo spettrofotometro a 450 nm. L'assorbimento di colore è inversamente proporzionale alla concentrazione di tossina nel campione. La sensibilità del metodo citato è di 10 ng/l

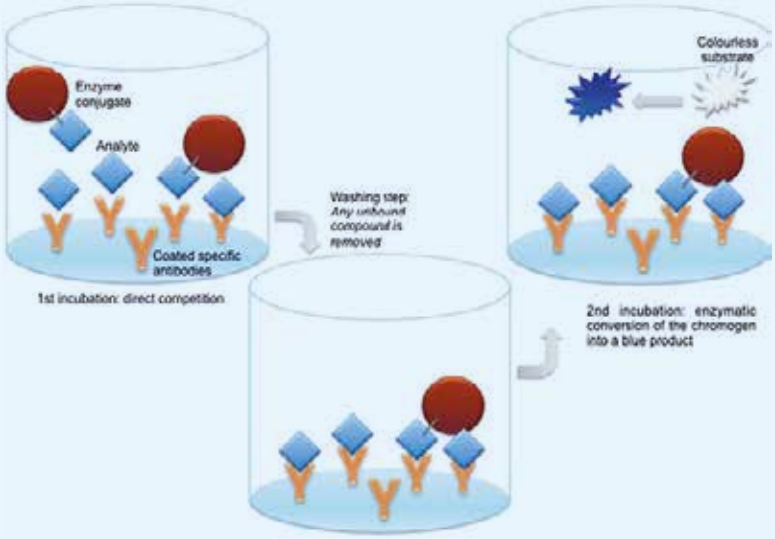
PREPARAZIONE DEL CAMPIONE

Lavare il corpo dei molluschi con acqua ed omogeneizzare. Mescolare 10 g di omogenato con 10 ml di HCl 0,1 N.

Bollire la sospensione per 5 minuti, mantenendola in agitazione.

Centrifugare a 3.000 rpm per 10 minuti.

Diluire 10 mcl del soprastante con 1 ml di tampone ed usare per il *test*.



ESECUZIONE DEL *TEST*

Portare tutti i reagenti a temperatura ambiente. Utilizzare nella piastra *microtiter* i pozzetti necessari alla prova (uno per il campione + sei per i controlli).

Introdurre in un pozzetto 50 mcl del campione e fare altrettanto per i controlli.

Aggiungere 50 mcl per pozzetto di enzima coniugato, mescolare e incubare 1 ora a temperatura ambiente.

Vuotare i pozzetti su carta assorbente e lavarli per 3 volte con 200 mcl di acqua distillata.

Aggiungere 50 mcl di substrato e 50 mcl di cromogeno per ciascun pozzetto e incubare per 30 minuti a temperatura ambiente.

Aggiungere 100 mcl di reagente-*stop*, mescolare a leggere allo spettrofotometro a 450 nm.

Calcolare la % di assorbanza del campione e dei controlli con la formula: *assorbanza del campione o dei controlli / assorbanza del controllo zero*.

Si allestisce un diagramma, in cui si pone in ascissa la concentrazione di saxitossina dei controlli (0 – 10 – 30 – 90 – 270 – 810 ppt) e in ordinata l' assorbanza % dei medesimi letta allo spettrofotometro.

La concentrazione di tossina del campione viene stimata confrontando l'assorbanza % del campione con la curva costruita partendo dai controlli.

Per esprimere la concentrazione di tossina del campione in ng/Kg, bisogna moltiplicare il valore stimato mediante il grafico per 200 (diluizione del campione nell'esecuzione del *test*).

Il regolamento europeo EU 853/2004 fissa i seguenti limiti di biotossine marine nei molluschi, riferiti alla parte edibile:

Paralytic Shellfish Poisoning (PSP)	800 mcg / Kg di saxitossina
Amnesic Shellfish Poisoning (ASP)	20 mg / Kg di acido domoico
Diarrheic Shellfish Poisoning (DSP) e pectenotossine (PTX)	160 mcg / Kg di acido okadaico
Yessotossine (YTX)	1 mg / Kg di yessotossina
Azaspiracid Shellfish Poisoning (AZP)	160 mcg / Kg di azaspiracido (AZP)

2. Jellet Rapid Test®

Il *test* JRT-PSP è del tipo positivo/negativo ed è adatto per rivelare le tossine del gruppo PSP nei molluschi bivalvi (come vongole, ostriche), nelle aragoste e nelle alghe.

Il metodo prevede il prelievo della parte edibile nei molluschi e nelle aragoste o la filtrazione dell'acqua per raccogliere le cellule algali.

Segue l'estrazione, che può essere di tre tipi:

1) *rapida* (se non occorre fare conferme con metodi chimici, tipo HPLC);
2) *acida* (simile al *test* su topo secondo AOAC), se occorre la conferma su HPLC o nel caso dell'esame su aragoste;
3) *Phyto* per l'analisi delle alghe.

L'estratto, diluito in soluzione tampone, viene poi sottoposto alla prova seguendo le istruzioni del *kit* rapido.

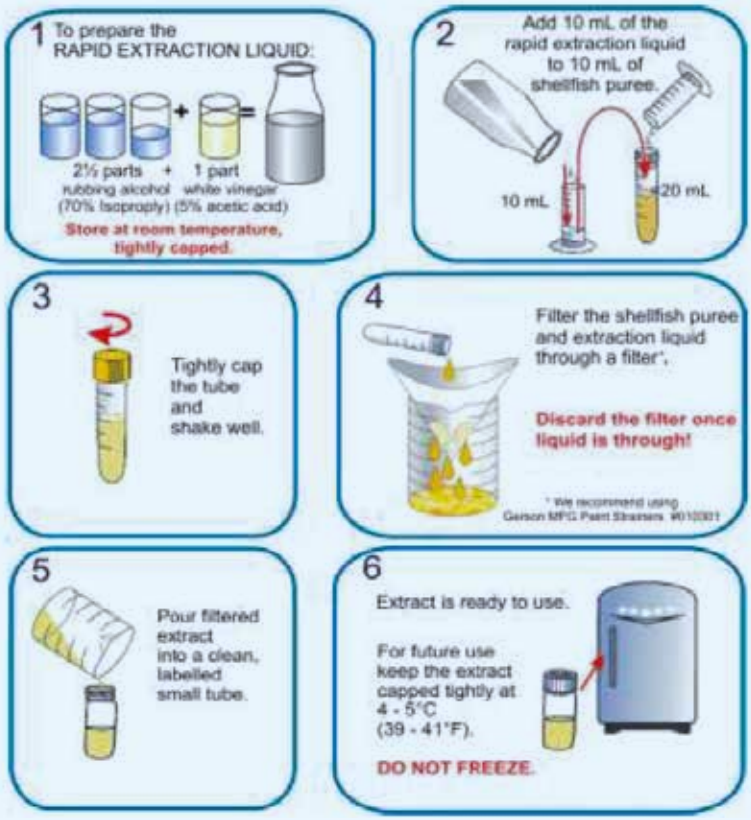
Jellet Rapid Testing Kit.

NOTA

METODO D'ESTRAZIONE 1

Questo metodo d'estrazione può essere usato con i Rapid Test® Jellet per PSP e ASP

RAPID EXTRACTION METHOD



METODO D'ESTRAZIONE 2

Il metodo di estrazione AOAC è stato semplificato da Jellet basandosi su un sotto-campione di 10 g ricavato da 100 g di tessuto del mollusco (*purée*) come illustrato nello schema seguente.

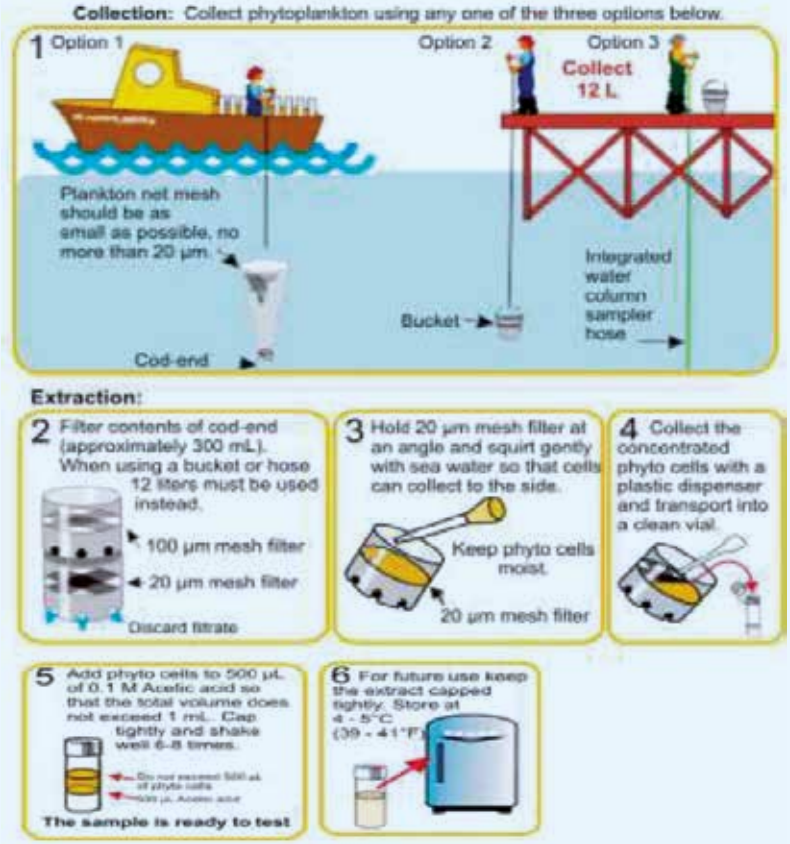
Questo tipo d'estrazione è identico per la ricerca delle tossine PSP e DSP se si usano i *kit* Jellet Rapid Test®

AOAC RAPID EXTRACTION METHOD

METODO D'ESTRAZIONE 3

Questo metodo d'estrazione può essere usato con i Rapid Test® Jellet per PSP e ASP

PHYTOPLANKTON COLLECTION AND EXTRACTION METHOD



3. Saxitest®

Si tratta di un *kit* in ELISA per la ricerca della tossina PSP (Saxitossina) nei molluschi. Consente 96 prove e si possono esaminare 40 campioni in circa un'ora. Riesce a quantificare la tossina fra 112,5 e 2700 mcg/kg, con un limite di sensibilità di 22,7 ng/g e un limite di quantificazione di 15 ng/g. Richiede uno spettrofotometro per la lettura delle piastre a 450 nm

METODI IMMUNOLOGICI PER LA RICERCA DELLE TOSSINE LIPOSOLUBILI (DSP) ACIDO OKADAICO E TOSSINE CORRELATE

1. DSP Check®

Il metodo descritto consiste in un *test* ELISA non competitivo, la cui sensibilità è pari a 20 ng/g di campione e supera quella della cromatografia liquida (LC).

Il *test* rivela bene l'acido okadaico (OA) e la dinofisitossina 1 (DTX1), mentre non reagirebbe altrettanto bene con le pectenotossine (PTXs) e le yessotossine (YTXs)

La procedura da seguire è in sintesi la seguente:

PREPARAZIONE DEL CAMPIONE

2 g di molluschi in esame (o del loro epato-pancreas) sospesi in 10 ml di metanolo vengono omogeneizzati per 1-2 minuti e filtrati su carta (o centrifugati a 3000 rpm per 20 minuti).

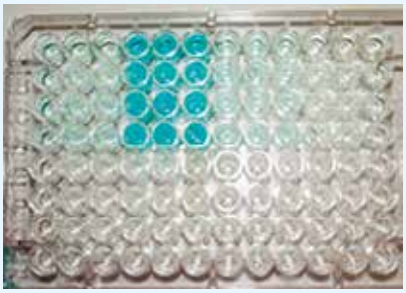
Il filtrato o il soprastante, raddoppiato con acqua distillata, costituisce l'estratto per fare il *test*.

PREPARAZIONE DEI REAGENTI

Gli *standard* di tossina da 10 e 100 ppb vengono ricostituiti con 5 ml di metanolo, mentre si uniscono fra loro il cromogeno ed il substrato e gli anticorpi coniugati vengono reidratati con il liquido che servirà per i lavaggi.

ESECUZIONE DELLA REAZIONE

1. In tre pozzetti di una piastra *microtiter* mettere rispettivamente, con una micro pipetta, 50 mcl di: *standard* a 10 ppb di tossina; 50 mcl di *standard* a 100 ppb di tossina; campione in esame.
2. Aggiungere a ciascun pozzetto una goccia di anticorpi coniugati, mescolare e lasciare 10 minuti a temperatura ambiente.
3. Vuotare i pozzetti su carta, lavare quattro volte con liquido di lavaggio.
4. Aggiungere nei pozzetti una goccia di cromogeno e lasciare 6 minuti la piastra al buio.
5. Aggiungere ai pozzetti una goccia di soluzione STOP, mescolare a aspettare 3 minuti.
6. Confrontare il colore del campione con quello (giallo) dei due *standard*, ricordando che il campione è stato diluito 10 volte di più. La lettura può essere letta allo spettrofotometro a 492 nm, prima di calcolare il contenuto in ppb di tossina nel campione.



dSP CHECK® UBE – Microtiter Plate.

CALCOLO DEL CONTENUTO DI TOSSINA NEL CAMPIONE

1. Riportare su foglio millimetrato le due letture degli *standard* (10 e 100 ppb).
2. Unire con una linea i due punti.
3. Inserire il valore del campione in esame e leggere la corrispondente concentrazione di tossina (in ng/ml).
4. Applicare la formula: lettura sul diagramma x 2 (diluizione eseguita nella preparazione del campione) x 10 (volume dell'estratto) / 2 (peso del mollusco prelevato)
5. Il risultato è in ppb di tossina DSP.

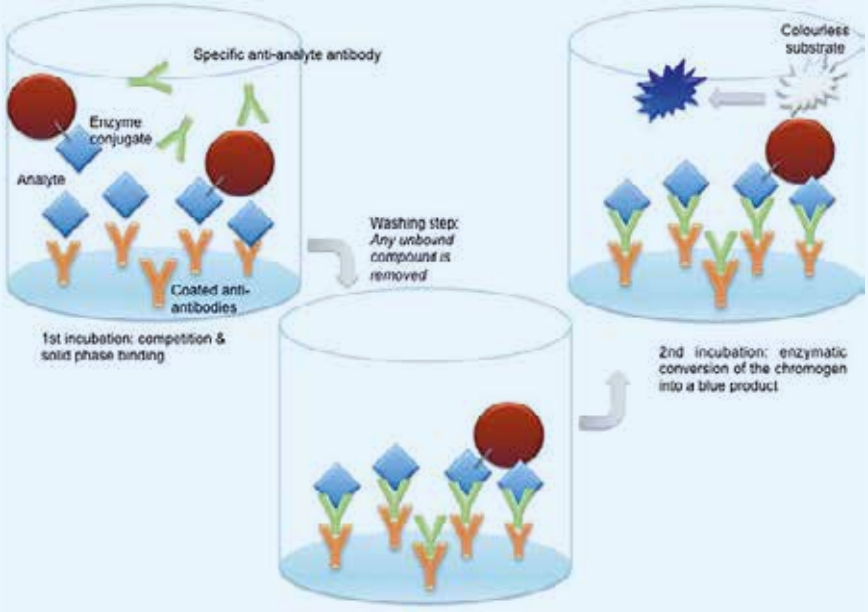
2. Anti-Okadaic Acid ELISA kit® Rougier

Si tratta di un *test* ELISA non competitivo che sfrutta anticorpi monoclonali ERFA come anticorpi di cattura e un antisiero anti-topo (coniugato con per ossidasi) come anticorpo rivelatore.

Il *kit* è composto da una piastra *microtiter* (96 pozzetti), pre-rivestiti con anticorpi di cattura, da un antisiero rivelatore coniugato con perossidasi e da tre *standard* di acido okadaico a differenti concentrazioni; vengono inoltre forniti i soliti reagenti per ELISA, cioè soluzione tampone di lavaggio e soluzione STOP. Per realizzare la prova occorrono 2,5 ore d'incubazione.

Il *test* è quantitativo per l'acido okadaico (OA) tra 9 e 81 ng/ml e dalla letteratura risulta sensibile, riproducibile, facile e stabile. Inoltre ha un'alta correlazione con HPLC.

È indicato per ricercare l'acido okadaico nei molluschi e nelle acque, mentre non va bene per la dimostrazione delle dinofisitossine DTX- 1 e DTX-3.



3. Jellet Rapid Test®

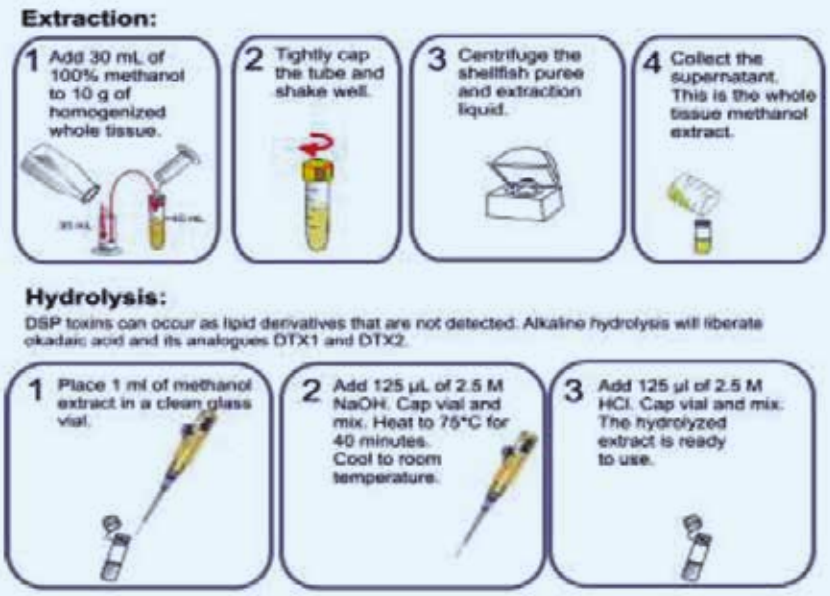
Il *test* JRT-DSP è del tipo positivo/negativo ed è adatto per rivelare le tossine del gruppo DSP nei molluschi bivalvi (come vongole, ostriche).

Il metodo prevede il prelievo della parte edibile nei molluschi e l'estrazione in solvente metanolo. L'estratto, diluito in soluzione tampone, viene poi sottoposto alla prova seguendo le istruzioni del *kit* rapido. La prova richiede 25 minuti.

La sensibilità del *test* è di 0,075 – 0,1 mcg/ml di acido okadaico

Jellet Rapid Test® Kit.

METHANOL EXTRACTION AND HYDROLYSIS METHOD



4. Okatest®

Si tratta di un *Kit* in ELISA per la ricerca del gruppo di tossine dell'acido okadaico (OA, DTX1, DTX2 e forme esterificate) nei molluschi. Consente 96 prove e si possono esaminare 43 campioni in circa due ore. Riesce a quantificare la tossina fra 63 e 352 mcg/kg, con un limite di sensibilità di 44 ng/g e un limite di quantificazione di 56 ng/g. Richiede uno spettrofotometro per la lettura delle piastre a 405 nm

METODI IMMUNOLOGICI PER LA RICERCA DELLE TOSSINE ASP

1. Jellet Rapid Test®

Il *test* JRT-ASP è del tipo positivo/negativo ed è adatto per rivelare le tossine del gruppo ASP nei molluschi bivalvi (come vongole, ostriche), nelle aragoste e nelle alghe.

Il metodo prevede il prelievo della parte edibile nei molluschi e nelle aragoste o la filtrazione dell'acqua per raccogliere le cellule algali.

Segue l'estrazione, che può essere di tre tipi:

- *rapida* (se non occorre fare conferme con metodi chimici);
- *acida* (come per il *test* su topo secondo AOAC) se occorre la conferma su HPLC o in metanolo (se occorre conferma con metodo chimico di cromatografia liquida / spettrometria di massa o LCMS);
- *Phyto*, per l'analisi delle alghe.

L'estratto, diluito in soluzione tampone, viene poi sottoposto alla prova seguendo le istruzioni del *kit* rapido.

2. Domotest®

Si tratta di un *Kit* in ELISA per la ricerca della tossina ASP (acido domoico) nei molluschi. Consente 96 prove e si possono esaminare 41 campioni in circa un'ora. Riesce a quantificare la tossina fra 2 e 80 mcg/kg, con un limite di sensibilità di 22,7 ng/g e un limite di quantificazione di 30 ng/g. Richiede uno spettrofotometro per la lettura delle piastre a 450 nm

A.2 TEST ENZIMATICI

1. Microcystest Kit®

È un *test* semplice e rapido per la ricerca di microcistine e nodularine in acque potabili e balneabili (attualmente si conoscono più di 80 differenti varietà di queste tossine).

La tossicità delle microcistine è associata con l'inibizione di due fosfatasi proteiche (1 e 2A, contraddistinte dalle sigle PP1 e PP2A), che possono provocare disfunzioni nelle cellule epatiche.

Il *test* utilizza questa reazione d'inibizione della fosfatasi PP2A per determinare la concentrazione di microcistine entro una piastra *microtiter* contenente un substrato colorimetrico.

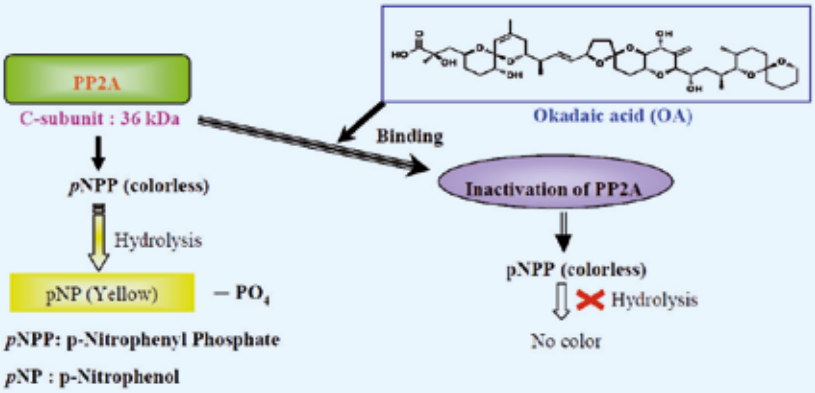
L'enzima idrolizza il substrato e il prodotto della reazione può essere valutato dalla misura dell'assorbanza a 405 nm. L'abilità delle PP a idrolizzare il substrato dipende dalla presen-

za di microcistine nel campione e la quantità di tossina può essere stimata per confronto con una curva *standard*.

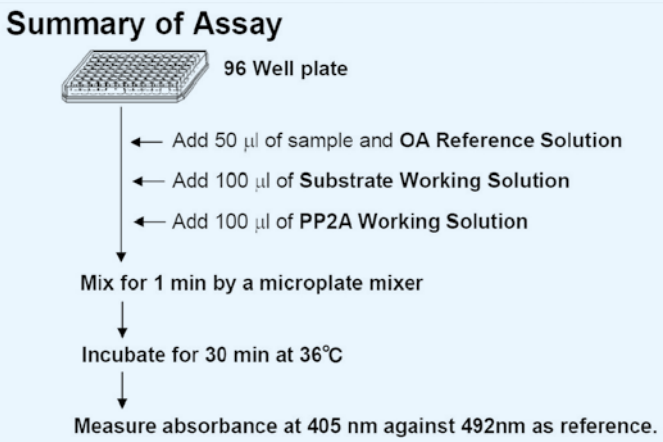
Il *kit* permette di fare 96 prove in un tempo di circa 30 minuti. Il campione d'acqua viene messo direttamente nella piastra e il *range* di quantificazione delle tossine è di 0,2 – 2,5 mcg/l con un limite di sensibilità di 0,2 mcg/l.

2. Sceti K.K. DSP Rapid Kit®

Il *test* è basato sull'inibizione della protein-fosfatasi PP2A da parte delle tossine del gruppo DSP (cioè OA, acido okadaico e DTXs, dinofisitossine), che idrolizzano un substrato artificiale incolore, il p-nitrofenil-fosfato (p-NPP), producendo un colore giallo (p-nitrofenolo, NP) in soluzione alcalina.



L'intensità del colore è proporzionale all'attività dell'enzima e l'assorbanza viene misurata a 405 nm.



La concentrazione delle tossine DSP nel campione viene calcolata per confronto con una curva *standard* preparata usando concentrazioni note di tossina OA.

Sceti K.K. DSP Rapid Kit (Okinawa, Japan).

A.3 METODI CHIMICI[2]

DETERMINAZIONE DELLE TOSSINE ALGALI

Le tossine algali sono un gruppo di sostanze chimiche che hanno la caratteristica di essere molto grandi, pertanto la tecnica analitica che ben si presta alla loro separazione e quantificazione è la cromatografia liquida. Una buona separazione cromatografica è fondamentale per la corretta identificazione delle diverse tossine e riduce la possibilità di errori dovuti alla presenza di molecole simili e di interferenti.

La tecnica analitica separativa sempre più utilizzata per la determinazione delle tossine algali è *High-Performance Liquid Chromatography* (HPLC).

Questa tecnica prevede la separazione delle tossine facendole passare attraverso una fase stazionaria, ovvero un particolare substrato che mostra particolari affinità per alcune molecole piuttosto che altre; le molecole vengono selettivamente trattenute e rilasciate in tempi successivi, quindi identificate.

Le sostanze da separare sono costrette attraverso una colonna, dal diametro relativamente piccolo (ad es. 3 mm) e di lunghezza ridotta (250 mm), riempita di fase stazionaria (diametro delle particelle 5 mm) e sono veicolate da una soluzione, l'eluente. Affinché il passaggio dell'eluente possa avvenire, esso deve avere una pressione piuttosto elevata, garantita dalla presenza di una pompa, parte integrante dell'HPLC.

All'uscita della colonna le molecole, per poter essere identificate dopo essere state separate, devono passare attraverso un rivelatore, ovvero un dispositivo in grado di rivelarne il loro passaggio. I rivelatori possono essere diversi a seconda del principio chimico/fisico su cui si basano e delle caratteristiche delle molecole che devono essere identificate; per tale motivo essi risultano spesso complementari.

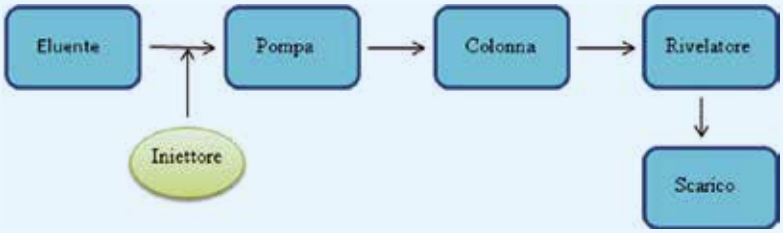


Figura 1 - Schema a blocchi di un sistema HPLC.

Rivelatori associati all'HPLC maggiormente utilizzati nell'identificazione e quantificazione delle tossine algali.

A) DAD (Dyode Array Detection)

Rivelatore a serie di diodi è un rivelatore che si basa su una tecnica spettroscopica, ovvero sullo scambio di energia che si verifica fra l'energia radiante e la materia. In particolare, la spettrofotometria di assorbimento è interessata ai fenomeni di assorbimento delle radiazioni luminose della regione dello spettro elettromagnetico appartenenti al campo del visibile (350-700 nm) e del vicino ultravioletto (200-350 nm).

Riportando i valori registrati in un grafico "lunghezza d'onda-assorbimento", si ottiene lo spettro di assorbimento della sostanza esaminata.

Per il fatto che ogni sostanza ha il suo spettro di assorbimento, l'esame di tali spettri permette di identificare una sostanza (per confronto diretto con campioni noti o tramite banche dati di spettri)

Il rivelatore è costituito da un *chip* con centinaia di fotodiodi allineati, ognuno dei quali misura la particolare banda di radiazione inviatagli dall'elemento disperdente.

Tali strumenti non hanno una risoluzione elevata, ma presentano però una caratteristica notevole: registrano simultaneamente (in 1/10 di secondo) tutto lo spettro (non ci sono parti in movimento che inviano le λ un po' per volta); grazie a questo sono adatti ad essere collegati all'uscita di strumenti di separazione di miscugli (tipo HPLC) in modo da registrare in tempo reale, secondo per secondo, l'intero spettro della miscela in uscita.

Le determinazioni quantitative sono basate sul fatto che, quando una radiazione attraversa una soluzione, viene assorbita più o meno intensamente a seconda della concentrazione: in altre parole l'assorbimento dipende dalla concentrazione.

Disponendo quindi di strumenti in grado di misurare l'assorbimento si risale facilmente alla concentrazione della soluzione.

B) Fluorimetro

La fluorescenza è la proprietà di alcune sostanze eccitate da una radiazione di una certa energia *n* (o l) di emettere radiazioni di energia *n* inferiore (cioè di l più elevata).

È un processo in cui un atomo o una molecola emettono radiazione luminosa nel corso di una transizione da un livello elettronico di maggiore energia ad uno minore. La transizione dal livello fondamentale ad un livello superiore è dovuta ad assorbimento di radiazioni luminose; la successiva emissione di luce per tornare al livello fondamentale è detta fotoluminescenza o fluorescenza.

I rivelatori a fluorescenza presentano il vantaggio di una maggiore sensibilità rispetto ai metodi ad assorbanza, di solito superiore a un ordine di grandezza. Hanno però lo svantaggio di un minore campo di applicabilità, dato che il numero delle specie assorbenti è notevolmente superiore rispetto a quelle fluorescenti. Si possono comunque usare rivelatori a fluorescenza anche per analiti non fluorescenti, se si riesce a trattarli con reagenti che diano prodotti fluorescenti (ad esempio ossidazioni alcaline…).

C) Spettrometro di massa (MS)

L'ostacolo principale da superare per accoppiare lo spettrometro di massa a un sistema di separazione, come un cromatografo liquido, è il mantenimento del vuoto nello spettrometro di massa mentre viene introdotto il flusso uscente dal cromatografo.

Il solvente che eluisce da un cromatografo liquido, una volta vaporizzato, costituisce un volume troppo elevato per poter entrare direttamente in massa. Sono state sviluppate interfacce che risolvono il problema di questo carico eccessivo di gas mediante combinazioni di riscal-

damento e di pompaggio, talvolta con l'assistenza di un gas che favorisca l'evaporazione del solvente. Le interfacce maggiormente impiegate oggigiorno sono la ionizzazione chimica a pressione atmosferica (*Atmospheric Pressure Chemical* I*onization*, APCI) e la ionizzazione per elettronebulizzazione (*Electrospray Ionization*, ESI), mentre in misura minore vengono ancora impiegate la termonebulizzazione (*Thermospray*, TS) e la formazione di *aerosol* con separazione inerziale (*Particle Beam*, PB).

La formazione di ioni di campione in fase gassosa è un pre-requisito essenziale per i processi di rivelazione tipici in uno spettrometro di massa.

In dipendenza del tipo di sistema di introduzione e della tecnica di ionizzazione utilizzata, il campione può già esistere in forma ionica in soluzione, oppure esso può essere ionizzato di concerto con la sua volatilizzazione o mediante altri metodi nella sorgente ionica. Gli ioni prodotti, che si trovano in fase gassosa, vengono separati nell'analizzatore sulla base del loro rapporto massa/carica (m/z), e vengono raccolti da un rivelatore. Nel rivelatore essi generano un segnale elettrico proporzionale al numero di ioni presenti. Il sistema di elaborazione dati registra questi segnali elettrici in funzione del rapporto m/z e li converte in uno spettro di massa. I processi che hanno luogo all'interno di uno spettrometro di massa sono:

1) produzione di ioni e frammentazione,
2) separazione degli ioni in base al rapporto m/z,
3) rivelazione.

1) produzione di ioni e frammentazione

Una delle tecniche più comunemente utilizzate per produrre ioni ed effettuare la frammentazione delle molecole è la ionizzazione elettronica, nota anche come impatto elettronico (EI). Le molecole arrivate in sorgente vengono bombardate da un flusso di elettroni ad alta energia (pari a 70 EV), energia molto superiore a quella dei legami che tengono insieme le molecole; pertanto producono una miscela di ioni positivi, ioni negativi e specie neutre.

2) separazione degli ioni in base al rapporto m/z

L'analizzatore utilizza metodi di dispersione o di filtro per separare gli ioni sulla base del rapporto massa/carica o di una proprietà ad esso correlata. Gli analizzatori più comunemente usati sono i settori magnetici ed elettrici, i quadrupoli, le trappole ioniche (*ion traps*), gli spettrometri basati sulla risonanza ionica ciclotronica in trasformata di Fourier (FT-ICR) e gli analizzatori a tempo di volo (*Time of Flight*, TOF).

I settori magnetici deviano le traiettorie degli ioni in percorsi circolari il cui raggio dipende dal rapporto momento/carica dello ione. Ioni con m/z più elevato seguono traiettorie di raggio più ampio rispetto a quelli con m/z più basso, così che ioni con differenti valori di m/z vengono dispersi nello spazio. Cambiando le traiettorie degli ioni mediante variazioni del campo magnetico, ioni di diverso rapporto m/z possono essere focalizzati sul rivelatore.

Un altro tipo di analizzatore, chiamato filtro di massa a quadrupolo, consiste di quattro poli o barre disposte parallelamente. In questo dispositivo l'analisi di massa dipende dal moto degli ioni risultante dall'applicazione di una combinazione di campi elettrici continui (DC) e alternati a radiofrequenza (RF). La scansione viene effettuata con la variazione sistematica della forza di questi campi e il conseguente cambiamento del valore di m/z, che viene trasmesso attraverso l'analizzatore. Gli spettrometri di massa a quadrupolo offrono una risoluzione inferiore, ma sono più facilmente collegabili a diversi sistemi di introduzione del campione e hanno un costo inferiore.

Lo spettrometro di massa a trappola ionica (*Ion Trap*) opera su un principio simile a quello del quadrupolo. Tuttavia la trappola ionica non agisce da filtro e anziché per-

mettere agli ioni di attraversare il campo quadrupolare, essa può trattenere tutti gli ioni al suo interno per successivi esperimenti. Lo strumento usa campi generati da RF (e, a seconda dei casi, anche da DC) applicati agli elettrodi disposti in una geometria a "*sandwich*", con un elettrodo anulare nel centro e due "coperchi" sopra e sotto di esso.
Gli analizzatori a tempo di volo separano gli ioni in virtù del tempo da essi impiegato per percorrere una certa distanza nota.
Un "pacchetto" di ioni viene emesso da una sorgente in un tempo molto breve; gli ioni vengono accelerati ad un' energia cinetica costante e focalizzati verso un "tubo di volo" (*Fly Tube*). Dato che l'energia cinetica è data da $mv^2/2$, dove m è la massa dello ione e v la sua velocità, minore sarà la massa dello ione, maggiore sarà la sua velocità. Il tempo impiegato per percorrere il tubo di volo viene misurato in microsecondi e questo tempo viene trasformato nel valore di massa dello ione sulla base della relazione appena descritta.
Dato che per ogni "pacchetto" vengono rivelati tutti gli ioni che lo compongono, gli spettrometri di massa TOF offrono elevata sensibilità, come anche elevata velocità di analisi. Essi sono in grado inoltre di fornire dati per biomolecole dalla massa molto elevata.

3) Rivelazione
Gli ioni vengono rivelati, dopo la loro separazione, trasformando l'energia prodotta dalla collisione degli ioni sulla superficie del rivelatore, in modo da provocare l'emissione da parte di essa di altri ioni, elettroni o fotoni che vengono poi misurati mediante opportuni rivelatori di luce o di carica.
A causa della grande quantità di informazioni che vengono generate e dell'elevato numero di parametri che devono essere variati in tempi estremamente brevi, un calcolatore è praticamente indispensabile per il controllo dello spettrometro di massa e per l'acquisizione, la memorizzazione e la presentazione degli spettri di massa.
I sistemi di elaborazione dati basati su calcolatori (*Data systems*) generalmente includono anche i programmi necessari per l'analisi quantitativa, l'interpretazione degli spettri e l'identificazione di composti mediante ricerca in banche dati di spettri ("librerie" o, meglio, "biblioteche").

Figura 2 - Sistema HPLC massa.

Le concentrazioni di tossine presenti nel campione tal quale sono molto basse; pertanto per poter essere rilevate e quantificate è necessario sottoporre la matrice da esaminare ad un trattamento preliminare.
Per procedere all'analisi in fase disciolta (extracellulare) è necessario concentrare la soluzione; per far questo la tecnica maggiormente utilizzata è la SPE (*Solid-Phase Extraction*). Essa si basa sull'utilizzo di cartucce contenenti una fase adsorbente su cui viene fatta passare la fase acquosa da concentrare; le molecole di interesse vengono trattenute

dalla fase adsorbente (scelta opportunamente) e successivamente eluite con la minima quantità di solvente idoneo.
Per la determinazione delle tossine all'interno delle cellule algali (fase endocellulare) sarà necessario procedere ad un' estrazione mediante lisi cellulare (ad esempio, mediante procedura di congelamento/scongelamento) con successiva estrazione con solvente.
Al termine della fase preparativa si procede all'analisi degli estratti mediante HPLC-DAD, HPLC-FL o HPLC-MS.
È necessario comunque avere sempre soluzioni *standard* di riferimento delle tossine in esame per potere eseguire una corretta analisi quali-quantitativa.

BIBLIOGRAFIA

1) "What is MASS SPECTROMETRY", ASMS (American Society for Mass Spectrometry) Traduzione a cura del Dr. Andrea Raffaelli.
2) CNR-IRSA Notiziario dei metodi analitici n.1(2010) pag.17-31.

A.4 METODI BIOLOGICI[1]

RICERCA DELLE TOSSINE IDROSOLUBILI E LIPOSOLUBILI

I metodi biologici (*biotest* su topo) di rilevazione delle biotossine "non sono più considerati uno strumento di controllo adeguato a causa della variabilità dei risultati, della loro insufficiente capacità di rilevazione e della loro limitata specificità" (Regolamento UE numero 15/2011 che modifica il regolamento CE n. 2074 / 2005 per quanto riguarda i metodi di analisi riconosciuti per la rilevazione delle biotossine marine nei molluschi bivalvi vivi). Pertanto vengono di seguito riportati unicamente per il loro valore storico.

NOTA - I metodi biologici sono stati sostituiti da metodi chimici (cromatografia liquida LC e spettrometria di massa MS, cromatografia liquida ad alte prestazioni HPLC) o da metodi immunologici (ELISA).

METODO BIOLOGICO PER LA RICERCA DELLE TOSSINE IDROSOLUBILI (*PARALYTIC SHELLFISH POISONING* – PSP) NEI PRODOTTI ITTICI
(secondo Istituto Superiore di Sanità - Roma)

1 – Preparazione del campione

I molluschi da analizzare vengono puliti esternamente lavandoli con acqua. Si aprono tagliando i muscoli adduttori, si risciacqua internamente con acqua per rimuovere la sabbia o altri materiali estranei. Infine si rimuove la carne del mollusco dalla conchiglia, separando i muscoli adduttori ed il tessuto connettivo dal cardine. Per l'apertura dei molluschi non si deve ricorrere né al calore né all'uso di anestetici ed occorre evitare di tagliare o danneggiare il corpo dei molluschi stessi.

100 – 150 grammi vengono trasferiti su una retina di plastica e qui lasciati scolare per 5 minuti. La parte edibile viene quindi finemente omogeneizzata in *Stomacher* ®.

2 – Estrazione

2.1 Pesare 100 grammi di omogeneizzato in un *becker* tarato.
2.2 Aggiungere ml 100 di HCl 0,1 N, agitare e verificare il pH (deve essere inferiore a 4.0 e preferibilmente intorno a 3.0). Se necessario, si aggiusta il pH come sotto indicato.
2.3 Riscaldare quindi la miscela e lasciarla bollire lentamente per 5 minuti.
2.4 Raffreddare fino a temperatura ambiente e misurare di nuovo il pH, che deve essere compreso fra 2.0 e 4.0 e che non deve mai superare 4.5.
Per abbassare il pH: aggiungere HCl 5 N a gocce, agitando fino ad ottenere il valore di pH desiderato.
Per alzare il pH: aggiungere NaOH 0.1 N a gocce, agitando costantemente per prevenire una alcalinizzazione locale e conseguente distruzione delle tossine.
2.5 Trasferire in cilindro graduato da 200 ml e portare a volume con acqua distillata.
2.6 Centrifugare a 3.000 rpm per 5 minuti.
2.7 Trasferire il soprastante in una beuta e controllare di nuovo il pH. L'estratto a questo punto è pronto per essere iniettato.

3 – Test su topo

Vengono usati topi albini di razza *Swiss* di peso compreso fra 19 e 21 grammi. Se il peso è maggiore di 21 o minore di 19, si applica il fattore di correzione del peso (vedi tabella 2).
Non si possono utilizzare topi di peso superiore a 23 grammi e topi già usati.
3.1 Inoculare in peritoneo due topi, ciascuno con ml 1 di estratto.
3.2 Tenere in osservazione i topi per un'ora e annotare i tempi in cui eventualmente i topi muoiono, calcolandone la media.
3.3 Se il tempo medio di morte è superiore a 5 minuti, fare una diluizione dell'inoculo, per ottenere un tempo di morte compreso fra 5 e 7 minuti. Per diluire, usare acqua distillata e portare il pH fra 2.0 e 4.0 (mai sopra 4.5) con HCl 0,1 (o 0,01 N).
Nel caso di mortalità dei topi oltre i 7 minuti, ripetere l'inoculazione del campione su 3 topi per stabilire la tossicità del campione.

Coltivazione di Laminaria japonica, *a scopo alimentare, in Cina.*

4 – Calcolo della tossicità

4.1 Partendo dal tempo mediano di morte dei topi, calcolare tramite la tabella 1 i corrispondenti valori di unità-topo (U.T.).

Tabella 1 - Determinazione delle tossine idrosolubili (P.S.P.) – Conversione del tempo di morte dei topi in unità-topo (U.T.)

Tempo di morte (minuti)	Unità-topo (U.T.)	Tempo di morte (minuti)	Unità-topo (U.T.)
1	100	11	1,075
1:30	16,5	11:30	1,06
2	7,67	12	1,05
2:30	5,00	13	1,03
3	3,70	14	1,015
3:30	2,98	15	1,00
4	2,50	16	0,99
4:30	2,16	17	0,98
5	1,92	18	0,972
5:30	1,74	19	0,965
6	1,60	20	0,96
6:30	1,48	21	0,954
7	1,39	22	0,948
7:30	1,31	23	0,942
8	1,25	24	0,937
8:30	1,20	25	0,934
9	1,16	30	0,917
9:30	1,13	40	0,898
10	1,11	60	0,875
10,30	1,09		

NOTA 1 - Considerare il tempo di morte dei topi sopravvissuti come > 60 minuti o equivalente a 0,875 U.T.
NOTA 2 – Se il peso degli animali è < 19 g oppure > 2 log si opera una correzione per ciascun topo, moltiplicando le unità-topo già calcolate per il fattore di correzione riportato nella tabella 2. Infine si sceglie il valore mediano delle unità-topo (corrette) per gruppo di topi.

Tabella 2 - Determinazione delle tossine idrosolubili (P.S.P.) – Fattore di correzione del peso dei topi inoculati per soggetti tra 17 e 23 grammi di peso corporeo

Peso del topo in grammi	Unità-topo corrispondenti (U.T.)
17	0,88
18	0,93
19	0,97
20	1,00
21	1,03
22	1,05
23	1,07

4.2 Per convertire le unità-topo (U.T.) in microgrammi di tossina per ml (µg/ml) si deve effettuare la standardizzazione del metodo biologico, al fine di stabilire il fattore di conversione CF.

Coltivazione di Porphyra*, a scopo alimentare, in Giappone*.

5. Standardizzazione del metodo biologico

5.1 Diluire 1:100 con acqua distillata lo *standard* di tossina PSP, in modo da ottenere una soluzione di lavoro che conterrà 1 µg/ml di tossina.
5.2 Preparare cinque aliquote da 10 ml ciascuna di soluzione di lavoro e addizionarle, rispettivamente, con 10 – 15 – 20 – 25 – 30 ml di acqua distillata.
5.3 Controllare il pH delle diluizioni, che deve essere compreso fra 2.0 e 4.0 (mai sopra 4.5).
5.4 Inoculare a 1 ml in peritoneo 10 topi con ciascuna diluizione.
5.5 Scegliere la diluizione che uccide i topi in 5 – 7 minuti e calcolare il tempo mediano di morte del gruppo.
5.6 Determinare le unità-topo per ml (U.T./ml) del gruppo di topi usando la tabella 1.
5.7 Il fattore di conversione CF fra unità-topo per ml e µg di tossina per ml si ricava dalla formula seguente:

$$\frac{\text{µg di tossina / ml presenti nella diluizione scelta per i calcoli}}{\text{U.T./ml del gruppo di topi inoculati con quella diluizione}}$$

METODO BIOLOGICO PER LA RICERCA DELLE TOSSINE LIPOSOLUBILI (*NEUROLYTIC SHELLFISH POISONING* - NSP) NEI PRODOTTI ITTICI (secondo Mc Farren)

L'analisi si basa sulla dose che provoca un determinato tempo letale nel topo a cui viene iniettato intraperitonealmente un residuo (crudo tossico) estratto dai mitili con etere etilico.

Poiché i due componenti tossici del residuo non sono stati isolati come composti puri, la relativa tossicità è espressa in termini di unità-topo.

Una unità-topo è quella quantità di residuo crudo tossico che in media uccide il 50% degli animali-*test* (20 grammi) in 930 minuti.

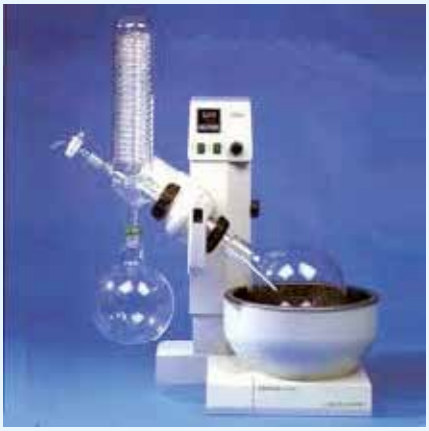
1) Animali-test

Utilizzare topi sani di peso da 20 ± 1 grammi prelevati da una colonia-*stock* per le prove di *routine*. Non usare topi di peso inferiore a 10 grammi o superiore a 25 grammi. Non usare topi precedentemente utilizzati.

2) Preparazione del campione

Pulire esteriormente i molluschi, drenare il liquido interno, quindi omogeneizzare le parti molli totali.

3) Estrazione



Versare 100 grammi di omogenato in un *becker* tarato da 400 ml. Aggiungere 1 ml di HCl concentrato e 5 grammi di NaCl.

Riscaldare fino a bollitura e lasciare bollire per 5 minuti, quindi raffreddare a temperatura ambiente.

Trasferire l'omogenato bollito in una provetta da centrifuga da 250 ml.

Aggiungere 100 ml di etere etilico, tappare e agitare vigorosamente per 5 minuti (sfiatare frequentemente).

Centrifugare a 2000 rpm per 10 -15 minuti e trasferire l'estratto etereo (sopranatante) in un imbuto separatore da 1000 ml.

Estrarre l'omogenato di mollusco 3 volte con 100 ml di etere etilico e trasferire ciascuno strato etereo, dopo centrifugazione, nell' imbuto separatore.

Drenare qualsiasi emulsione dell'estratto etereo eventualmente formatosi nell'imbuto separatore.

Trasferire quindi l'estratto etereo in un *becker* da 400 ml.

Effettuare una prima evaporazione dell'etere in un bagno di vapore sotto cappa.

Trasferire il rimanente estratto etereo in un palloncino da 100 ml già tarato.

Evaporare completamente l'etere rimasto in un essiccatore a vuoto rotante (*Rotavapor®*) con temperatura del bagno fra 85 e 95 gradi centigradi.

N.B. Assicurarsi che non rimanga etere dopo la finale evaporazione.

Analisi sul topo

Si pesa accuratamente il residuo oleoso.

Supponendo che la densità del residuo sia la stessa dell'olio di cotone (0,917 grammi circa per 1 ml), si porta con l'olio il residuo a 9,17 grammi (equivalente a 10 ml).

Poiché la risultante soluzione della tossina in olio di cotone può ora essere facilmente manipolata, tutte le seguenti diluizioni possono essere fatte volumetricamente.

(N.B. Mescolare bene dopo ogni diluizione prima di iniettare).

Si inietta 1 ml della miscela del residuo in olio di cotone nel peritoneo di ciascuno dei due topi di peso approssimativo di 20 grammi. Si segna il tempo di iniezione e si osserva il topo per 24 ore. A ciascun topo che sopravvive ad un dato periodo d'osservazione (15,5 ore) viene assegnato un tempo di morte di 930 minuti.

Se i primi due topi non muoiono entro i 360 minuti, si iniettano altri 3 o più topi e si osservano i 5 topi per 24 ore.

Se i due topi muoiono in meno di 110 minuti si fa una diluizione dell'estratto e si iniettano altri 2 topi (per esempio, una diluizione 1:1.25, aggiungendo 2 ml di olio di cotone al residuo di 8 ml).

Quando si trova una diluizione che causa la morte dei topi in un tempo compreso fra i 110 e i 360 minuti dopo l'iniezione, altri 3 o più topi sono ancora iniettati e osservati per 24 ore.

10 U.T./ 100 grammi di parte edibile di mollusco è la minima quantità di tossina che usualmente può essere quantificata usando topi di peso di 20 grammi e per un tempo di continua osservazione di 15,5 ore (930 minuti).

Nel caso di analisi di *routine*, tale limite di sensibilità sarà di 20 U.T.. corrispondente ad un tempo di continua osservazione di 360 minuti.

4) Calcolo della tossicità

A) Si determina il numero di U.T. per ml corrispondente al tempo di morte dei cinque topi iniettati (tabella 3).

Tabella 3 - Determinazione delle tossine liposolubili (N.S.P.) – Relazione fra tempo di morte dei topi inoculati e le unità-topo (U.T.)

Tempo di morte (minuti)	Unità-topo (U.T.)	Tempo di morte (minuti)	Unità-topo (U.T.)
8	10	105	3
10	9	140	2,8
12	8	180	2,6
14	7	234	2,4
16	6	300	2,3
18	5	360	2

Tempo di morte (minuti)	Unità-topo (U.T.)
20	4,5
30	4
38	3,8
45	3,6
60	3,4
83	3,2

Tempo di morte (minuti)	Unità-topo (U.T.)
435	1,8
540	1,6
645	1,4
780	1,2
930	1

B) Si correggono le U.T. per il fattore di correzione del peso di quel topo (tabella 4).

Tabella 4 – Determinazione delle tossine liposolubili (N.S.P.) – Fattore di correzione del peso dei topi inoculati per soggetti tra 17 e 23 grammi di peso corporeo

Peso del topo in grammi	Unità-topo corrispondenti (U.T.)
17	0,81
18	0,87
19	0,94
20	1,00
21	1,06
22	1,12
23	1,18

C) - Se viene rilevato il 100% di mortalità e vengono determinati i tempi di morte, si calcola il numero mediano delle U.T. / ml;
- Se viene rilevato meno del 100% di mortalità, si calcola il numero mediano delle U.T./ ml; in questo caso bisogna includere nel calcolo anche i sopravvissuti.

D) Si calcola il numero totale di U.T. / 100 g di carne di mollusco nel modo seguente:
- si moltiplica la media o il numero mediano di U.T. per ml iniettato per il fattore di diluizione (se applicato) e per 10 (residuo originale portato fino a 10 ml con olio di cotone).

U.T. per 100 g di carne edibile di mollusco = U.T. /ml x fattore di diluizione x 10

Quando la relativa tossicità è stata determinata, si indica il numero di U.T./ 100 g di parte edibile di mollusco.
Quando la relativa tossicità è indeterminata (esempio: < 10 U.T. / 100 g di carne di mollusco, indicare:

1. numero di topi morti entro le 24 ore: tossicità rilevabile < 10 U.T. / 100 g di carne di mollusco;
2. se i topi non muoiono nelle 24 ore: tossina non rilevabile (< 10 U.T. / 100 g di carne di mollusco).

Pescherecci nel porto-canale a Chioggia (Venezia).

METODO BIOLOGICO PER LA RICERCA DELLA TOSSINA LIPOSOLUBILE DSP (*DIARRHEIC SHELLFISH POISONING*) NEI MOLLUSCHI
(secondo Yasumoto)

Il metodo si basa sull'inoculazione intraperitoneale di mitili in topini adulti. La presenza di tossina DSP provoca negli animali malessere generale e morte. I sintomi possono comparire da 30 minuti a diverse ore dopo l'inoculazione; la morte può sopraggiungere da 1 a 48 ore dopo l'inoculazione, a seconda della dose di tossina presente.

NOTA
(Istituto Superiore di Sanità – Roma, 8 agosto 1989)

Il metodo di Mc Farren, utilizzato specificatamente per la ricerca della tossina N.S.P., risulta poco sensibile per la ricerca della D.S.P., per cui è opportuno operare una maggiore concentrazione del campione nella fase finale dell'analisi. Tale metodo, comunque, risulta piuttosto lungo e prevede un'attrezzatura ed una manualità non sempre disponibile nei laboratori di biologia. Il metodo di Yasumoto, di più semplice esecuzione, può presentare qualche difficoltà per il prelievo dell'epato-pancreas, specialmente ove si tratti di mitili di piccole dimensioni.
Una volta estratto il corpo del mitile dalle valve, l'epato-pancreas è facilmente individuabile, poiché appare come un sacchetto bruno-scuro (composto da due metà simmetriche) presso il muscolo adduttore anteriore e può essere prelevato mediante l'uso di pinze e forbici. Se vengono asportate piccole porzioni di tessuti circostanti, ciò non pregiudica l'esito dell' analisi.

MODO DI OPERARE

1. Prelevare g 20 di epato-pancreas dai molluschi.
2. Estrarre in omogeneizzatore con ml 100 di acetone e mantenere per due minuti a temperatura ambiente.
3. Filtrare per carta e per garza a più strati.

4. Riprendere il residuo rimasto sul filtro e ripetere le operazioni descritte nei punti 2) e 3) per altre due volte, estraendo con ml 50 di acetone ogni volta.
5. Evaporare in Rotavapor® a 30-40 °C
6. Ridisciogliere il residuo in ml 10 \ 15 di acqua distillata.
7. Estrarre la sospensione acquosa con ml 50 di etere etilico.
   Ripetere l'operazione del punto 7) per due volte, lavando con piccole quantità di acqua e lasciare evaporare.

8. Ridisciogliere il residuo in ml 4 di Tween 60 all'1%
9. Inoculare intraperitoneo 3 topini bianchi di razza *Swiss* del peso di 18 g ± 2 g con ml 1 dell'estratto ciascuno.
   Parallelamente inoculare altri 3 topini con ml 1 del campione di controllo costituito da residui dei solventi evaporati ripresi con ml 4 di Tween 60 all'1%
10. Tenere gli animali in osservazione per 24 ore.

INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

1. Se i tre topini muoiono entro le 24 ore, si calcola la media dei tempi di morte e si possono avere i seguenti due casi:
   a) se il tempo medio risulta inferiore alle 5 ore, indica positività del *test*;
   b) se il tempo medio risulta superiore alle 5 ore, indica che la tossina è presente nel campione in esame, ma non in quantità tale da rappresentare un rischio per il consumatore; il *test* si ritiene quindi negativo. Nel caso però che uno dei topini sia morto tra la quarta e la quinta ora, si ritiene necessario ripetere il *test*.
2. Se due topini muoiono entro le 24 ore ed uno sopravvive oltre tale tempo, si calcola il tempo medio di morte dei primi due topini senza considerare il terzo. L'interpretazione di tale tempo medio di morte è identica a quella del punto precedente.
3. Se un solo topino muore entro le 24 ore e gli altri due sopravvivono, il *test* è da considerarsi negativo.

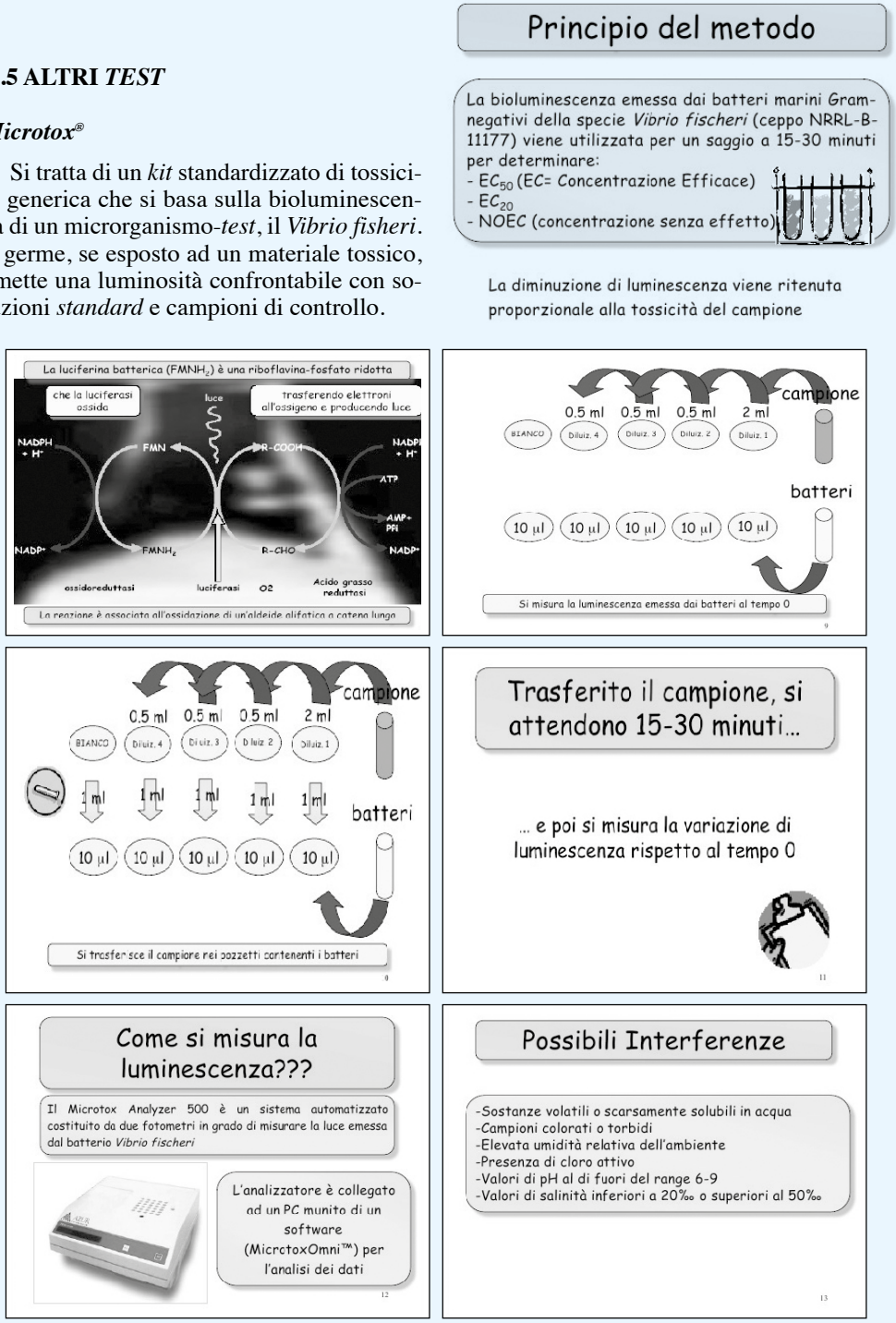
Fasi di raccolta dei mitili, Isola di Pellestrina (Venezia).

Infine, nei casi dubbi, allo scopo di accertarsi che la morte dei topini non sia avvenuta per altre cause, come ad esempio un'inoculazione male eseguita, è consigliabile effettuare un esame necroscopico.

A.5 ALTRI *TEST*

Microtox®

Si tratta di un *kit* standardizzato di tossicità generica che si basa sulla bioluminescenza di un microrganismo-*test*, il *Vibrio fisheri*. Il germe, se esposto ad un materiale tossico, emette una luminosità confrontabile con soluzioni *standard* e campioni di controllo.



L'impiego più frequente sta nell'esame di effluenti e sedimenti di acque, ma viene usato anche per rilevare l'eventuale tossicità di pesce, crostacei ed alghe ed è riconosciuto come *test* ufficiale in molti paesi (negli USA dal 1980).

B - CONTROLLO DELLE ALGHE NELLE ACQUE

DARIA BARBERIS

METODI DI DETERMINAZIONE DELLE ALGHE NELLA ACQUE DESTINATE AL CONSUMO UMANO E ALLA BALNEAZIONE

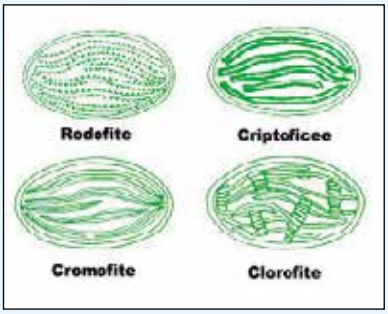
Un' elevata concentrazione di microalghe (*fitoplancton*) nelle acque può dare luogo alla formazione di tossine pericolose. Pertanto sono stati studiati metodi di conteggio delle cellule algali al microscopio e sono stati proposti dei limiti di accettabilità del *fitoplancton*.

RAPPORTO ISTISAN 07/5

Generalità e definizioni

Gli aspetti di sintesi di seguito presentati si riferiscono al parametro Alghe rilevato con il metodo ISS A 007A rev. 00.

Le alghe **fitoplanctoniche**, **visibili solo al microscopio ottico**, sono le alghe che rivestono maggiore interesse per la valutazione della qualità delle acque destinate alla produzione di acqua potabile. Sono organismi vegetali fotoautotrofi e comprendono specie unicellulari, pluricellulari e coloniali.



Possiedono plastidi, organuli discoidali che, a seconda delle specie, possono essere, non solo in numero vario, ma presentarsi disposti in modo diverso a pile o nastriformi, oppure trovarsi singolarmente nella matrice cellulare se le dimensioni sono piuttosto grandi. I plastidi contengono clorofilla e altri pigmenti fotosintetici e sono di fondamentale importanza per lo studio tassonomico.

Particolare rilievo assume la determinazione numerica e tassonomica delle alghe appartenenti a specie potenzialmente tossiche e a specie capaci di produrre sostanze odorigene, nonché la sorveglianza sulla periodicità dei fenomeni di fioritura (*blooms*). Infatti, con adeguate condizioni ambientali, le alghe possono produrre spessi strati di cellule nei corpi idrici superficiali

Le fioriture sono comunemente costituite da Cianobatteri, molte specie dei quali sono in grado di produrre diverse categorie di tossine. Oltre alle tossine, i Cianobatteri possono essere produttori di una grande varietà di sostanze, molte delle quali sono dotate di proprietà odorose acute e persistenti che possono rendere l'acqua potabilizzata inaccettabile per gli utenti. Altri *taxa* producono sostanze che conferiscono odori o sapori particolari all'acqua: Crisoficee,

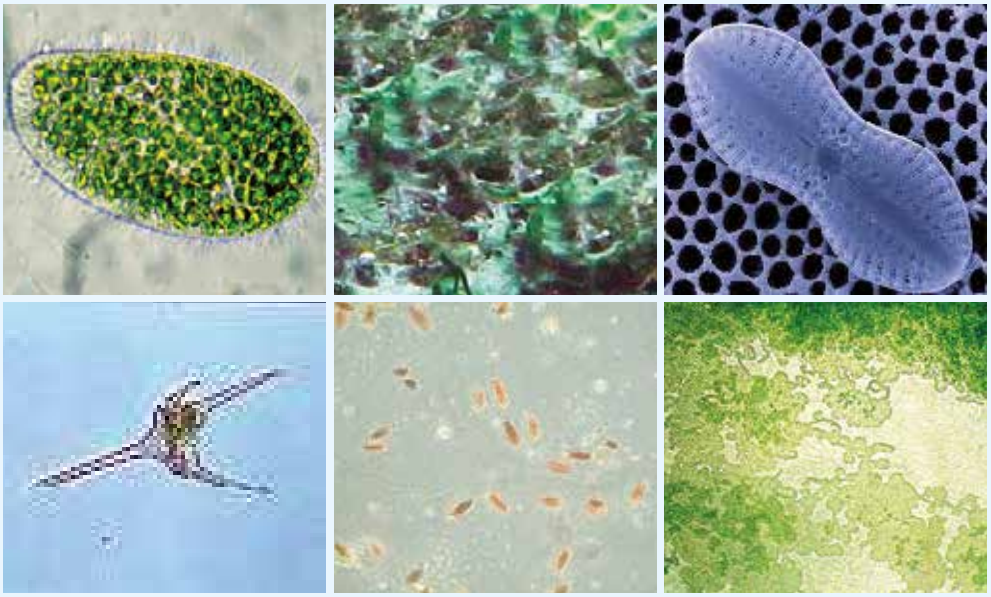
Criptoficee, alcune specie di Dinoficee pigmentate, di Cloroficee e di Diatomee.

È stato più volte evidenziato che i trattamenti convenzionali di potabilizzazione delle acque (coagulazione/filtrazione, filtrazione su sabbia, clorazione) sono in grado di rimuovere soltanto basse percentuali di tossine algali disciolte.

L'ozono e il carbone attivo granulare sembrano invece avere una elevata efficacia nella rimozione di cianotossine. Per acque sottoposte a trattamento di potabilizzazione è altresì importante rilevare la presenza di alghe con tendenza alla flottazione, particolarmente difficili da rimuovere nel processo di chiariflocculazione.

Il metodo riportato permette di stabilire il numero delle unità algali e non delle cellule algali, intendendo, come unità algale, la singola cellula nelle forme unicellulari e l'intera colonia nelle forme coloniali (*Volvox*, *Pediastrum* vengono, in questo caso, considerate unità algale), e come cellule algali, una unità costituita dalla singola cellula anche se appartenente ad una colonia (ad esempio, nelle forme coloniali, come *Volvox* o *Pediastrum*, vengono enumerate le singole cellule).

Nel D.L.vo n. 31 del 2001 e successive modifiche e integrazioni, al paragrafo "Avvertenza dell'Allegato I", è prevista la determinazione qualitativa del parametro con riferimento ad un litro di campione di acqua, equivalente al volume minimo da analizzare, così come stabilito dal D.L.vo n. 27 del 2002. Tuttavia, il metodo di seguito riportato fornisce la possibilità di ottenere risultati quantitativi. Ai sensi dell'attuale normativa, le alghe nelle acque destinate al consumo umano sono da considerare come un indice di qualità; pertanto la loro presenza è ammessa, anche se ne è auspicabile l'assenza.



Da sinistra a destra e dall'alto in basso: Crisoficee, Cloroficee, Diatomee, Dinoficee, Criptoficee, Cianobatteri.

1. Campo di applicazione

La procedura analitica indicata in ISS A 007A rev. 00, e qui di seguito riportata, viene utilizzata per la determinazione delle alghe nelle acque dolci. Per le acque destinate al consumo umano e per la balneazione, i metodi di riconoscimento e conta di cianobatteri tossici

sono descritti nelle linee guida riportate nei Rapporti ISTISAN 11/35 pt. 1 e 2 e Rapporti ISTISAN 15/XX (in pubblicazione nel 2015).

CIANOBATTERI IN ACQUE DESTINATE AL CONSUMO UMANO

STATO DELLE CONOSCENZE PER LA VALUTAZIONE DEL RISCHIO - A cura di Luca Lucentini e Massimo Ottaviani - Per il " Gruppo nazionale per la gestione del rischio ciano batteri in acque destinate al consumo umano" - 2011, xxi, 165 p. RAPPORTI ISTISAN 11/35 pt. 1 e 2

LINEE GUIDA PER LA GESTIONE DELLE FIORITURE DEI CIANOBATTERI NELLE ACQUE DI BALNEAZIONE - A cura di Enzo Funari, Maura Manganelli, Emanuela Testai - 2015, XXX p. Rapporti ISTISAN 15/XX

2. Principio del metodo

Nonostante la normativa richieda soltanto una determinazione qualitativa della presenza di alghe (Avvertenza, Allegato I), con il metodo di seguito riportato viene data la possibilità di quantificare il numero degli elementi algali eventualmente presenti. Il metodo descritto prevede l'osservazione diretta al microscopio ottico invertito dopo sedimentazione del campione in apposite camere di vetro con fondo quadrettato. In questo modo viene assicurata l'osservazione di un campione inalterato, poiché il materiale particolato in esso contenuto viene osservato direttamente dopo un solo passaggio di sedimentazione spontanea; viene contestualmente consentita la valutazione microscopica e macroscopica delle caratteristiche morfologiche degli individui presenti e la qualità complessiva del preparato e tutto viene registrato nel referto analitico. Il principio è derivato dal metodo di Utermöhl; inoltre è possibile distinguere e contare alghe pigmentate (individui vivi) e alghe non pigmentate (individui morti).

La manipolazione di campioni per analisi biologiche, in generale, può esporre l'operatore al rischio di contatto con organismi patogeni; quindi si raccomanda di seguire le norme di sicurezza previste dal D.L.vo 626/1994; prima e dopo l'esecuzione dell'osservazione microscopica, procedere alla disinfezione degli oculari del microscopio con disinfettante diluito in acqua.

3. Strumentazione e vetreria

Oltre alla normale attrezzatura di laboratorio è necessario avere a disposizione:

– Pipette *Pasteur* in vetro
– *Parafilm®*
– Microscopio ottico invertito corredato di obiettivi 4x, 10x, 20x, 40x, 60x;
– Micrometro oculare
– Camere di sedimentazione

Indicativamente, si possono utilizzare camere di sedimentazione in vetro della capacità di 500 ml, di forma cilindrica e altezza di 95 mm, con base quadrettata per fotoincisione (dimensione quadretti 1 mm x 1 mm, area osservabile 0,9216 mm^2 per ciascun quadrato escludendo le aree coperte dai bordi dei quadretti) di diametro 95 mm e area di base totale osservabile di 7084,625 mm^2.

Durante il periodo di sedimentazione, le camere possono essere coperte con capsule di Petri adatte alla camera utilizzata.

La scelta della capacità maggiore o minore delle camere è dettata, rispettivamente, dalla maggiore o minore presunta presenza numerica di alghe nel campione esaminato.

3.1. Pulizia delle camere di sedimentazione

Per maggiore precisione e orientativamente, si descrive l'operazione di pulizia delle camere di sedimentazione. Riempire la camera di una soluzione acquosa di disinfettante (4.2.) e lasciarla in contatto con il disinfettante per alcune ore, preferibilmente 3÷4 ore; quindi lavare accuratamente la superficie della camera, particolarmente il fondo e la porzione interna che è stata a contatto con il campione di acqua, con detergente cremoso non abrasivo, spugnetta non abrasiva e acqua di rubinetto. Sciacquare con acqua di rubinetto, risciacquare con acqua distillata e mettere ad asciugare in stufa a 55÷60 °C per alcune ore. In alternativa, è possibile, dopo il risciacquo con acqua distillata, asciugare la camera con carta assorbente e metterla in stufa a 55÷60 °C fino a completa asciugatura; si tenga presente che eventuali microrganismi particolarmente affini alla superficie interna della camera di sedimentazione, come ad esempio le microamebe, non vengono rimossi con quest'ultimo metodo e di ciò si dovrà tener conto nella lettura del campione successivo. Prima di utilizzare la camera per un nuovo campione, è bene verificare al microscopio invertito che il fondo sia perfettamente pulito, prima con l'obiettivo 4x, poi, se necessario, con gli obiettivi a maggiore ingrandimento. Nel caso che la camera sia stata asciugata con carta assorbente, saranno visibili sul fondo alcuni filamenti di carta dall'aspetto caratteristico, che, tuttavia, non interferiranno con la lettura del campione.

4. Reagenti e prodotti di consumo

Reattivo di Lugol
Composizione
– Iodio 5 g
– Ioduro di potassio 10 g
– Acido acetico glaciale 10 mL
– Acqua distillata 100 mL
Da usare, con le dovute precauzioni, sotto cappa chimica.

4.2. Soluzione disinfettante

Possono essere utilizzati agenti disinfettanti tipo Desogen® o Citrosil® al 3% in acqua per la disinfezione degli oculari del microscopio e delle camere di sedimentazione.

4.3. Detergente e accessori

Detergente cremoso non abrasivo e spugnetta non abrasiva per la pulizia delle camere di sedimentazione; usare carta assorbente per asciugare la camera.

5. Procedura

5.1. Volume da analizzare

Il volume di campione da analizzare, generalmente pari a 1 litro, può anche essere esaminato in due aliquote da 500 mL ciascuna per campioni di acque a basso grado di contaminazione (acque finali, distribuite, fasi intermedie del trattamento di potabilizzazione).

Il campione deve essere raccolto in bottiglie di vetro pulite, ma non necessariamente sterili; in ogni caso è necessario evitare di raccogliere il campione in bottiglie contenenti tiosolfato di sodio.

5.2. Campionamento

Prelevare, in maniera idonea, almeno 1 litro di acqua in una bottiglia di vetro pulita e asciutta, scegliendo, in funzione della qualità dell'acqua, il volume più idoneo di campione.

5.3. Preparazione del campione a fresco

Agitare accuratamente il campione e versare, preferibilmente dividendo in due aliquote separate da 500 mL ciascuna, in camere di sedimentazione. Fare sedimentare per un periodo minimo di 4 ore e, di norma, non superiore alle 24 ore; in questo modo tutto il materiale eventualmente presente nel campione risulterà inalterato e chiaramente visibile sul fondo.

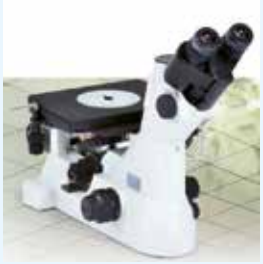
Nel caso di acque grezze e con elevato contenuto di alghe, mettere a sedimentare un volume non inferiore ai 5 mL, utilizzando camere più piccole e lasciando sedimentare per un periodo minimo di 1 ora e non superiore alle 24 ore.

5.4. Preparazione del campione fissato

Nel caso si renda necessario, soprattutto quando il conteggio viene eseguito oltre le 24 ore dall'inizio dell'analisi, è possibile fissare il campione aggiungendo reattivo di Lugol (4.1.) a goccia a goccia, fino a che l'acqua non assumerà una colorazione "*cognac*"; la fissazione del campione può essere effettuata sia nella bottiglia di prelievo sia nella camera di sedimentazione. Dopo l'aggiunta del Lugol, per la volatilità dei componenti, è necessario coprire i contenitori (bottiglia di prelievo o camera di sedimentazione) e sigillare bene con il *Parafilm*® o, in alternativa, conservare sotto cappa chimica accesa.

La fissazione con il reattivo di Lugol può comportare l'alterazione dei Nematodi e di altri organismi sensibili e, in ogni caso, impedisce la distinzione tra elementi vivi e morti.

5.5. Centratura del microscopio



Per maggiore precisione, si descrive la procedura corretta per la centratura del microscopio.

L'operazione consiste nel mettere a fuoco e centrare il condensatore, in modo che la luce che lo attraversa formi l'immagine nella giusta posizione sopra il preparato; in questo modo si ottengono le migliori condizioni di risoluzione e di contrasto. In teoria l'operazione sarebbe da ripetere ad ogni cambio di obiettivo e/o di oculare, ma in pratica è consigliabile eseguirla periodicamente, per mantenere nel tempo le stesse condizioni di lavoro. La procedura prevede le seguenti fasi:

- mettere a fuoco il preparato con l'obiettivo 10x;
- chiudere completamente il diaframma di campo e aprire il diaframma di apertura; nel campo ottico sarà visibile il campo luminoso nella minima estensione consentita;
- alzare al massimo il condensatore e, agendo sulle apposite manopole, regolarne la posizione in modo da centrare il campo luminoso del diaframma al centro del campo ottico; quindi regolare in altezza il condensatore finché i bordi dell'immagine del diaframma di campo non diventano nitidi;
- riaprire parzialmente il diaframma di campo in modo da ottenere un campo luminoso di diametro leggermente inferiore al campo ottico;
- regolare, infine, il diaframma di apertura, prima chiudendolo lentamente fino a percepire nell'immagine una variazione di contrasto, quindi riaprendolo leggermente.

Prima e dopo l'esecuzione dell'osservazione microscopica, procedere alla disinfezione degli oculari con un agente disinfettante al 3% in acqua (4.2.) per evitare la trasmissione di eventuali infezioni oculari da un operatore all'altro.

5.6. Screening del campione

Volendo eseguire uno *screening* del campione prima del conteggio degli organismi, si consiglia di applicare la procedura di seguito descritta.

Lo *screening* è utile per la valutazione dell'omogenea distribuzione del materiale sedimentato, al fine di scegliere i campi su cui effettuare la conta mediante l'ausilio di obiettivi a maggiore risoluzione.

Per la fase di *screening* utilizzare l'obiettivo 4x e osservare tutto il fondo della camera di sedimentazione; questo ingrandimento consente di osservare ogni volta un campo microscopico di 16 riquadri (4 x 4).

Mettere a fuoco i campi per verificare che la sedimentazione sia completata e per rilevare l'eventuale presenza di alghe flottanti, annotando l'osservazione nel responso analitico.

Annotare la presenza nel campione di materiale inerte (ad esempio, sabbia, carbone ecc.) o di residui vegetali osservabili nel campo microscopico inquadrato valutandoli come:

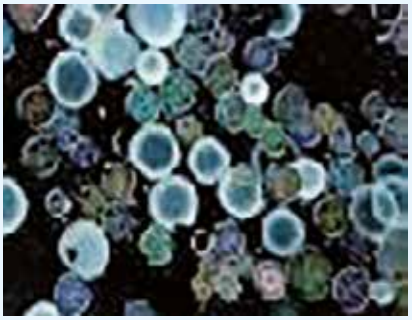
1. assenti
2. rari (1 - 2)
3. alcuni (2 - 10)
4. numerosi (10 - 20)
5. abbondanti (30 - 100)
6. eccessivi (maggiori di 100)

Annotare sul referto la valutazione complessiva della qualità del campione.

Durante l'esecuzione di questa procedura è possibile enumerare, oltre alle alghe, anche Nematodi, nonché tutte le altre forme di Metazoi piuttosto comuni nelle acque superficiali, come Rotiferi, Gastrotrichi, Tardigradi, Briozoi e alcune classi di Crostacei (Fillopodi, Ostracodi e Copepodi) e Protozoi. Possono essere osservati anche altri reperti, come uova, larve di insetti, semi, pollini e varie strutture circolari difficilmente riconducibili ad organismi definiti.

È possibile discriminare la presenza di materiali inerti o detriti, di strutture vegetali e/o animali (frammenti e filamenti) dagli organismi strutturati, viventi e non viventi e valutare complessivamente la qualità del campione in quanto ad elementi figurati.

5.7. Esame microscopico



L'osservazione del campione in giornata è sempre da preferire; è comunque accettabile l'osservazione effettuata nel giorno successivo perché potrebbe essere trascurabile il grado di alterazione del campione se non sono presenti protozoi vivi, predatori di elementi algali.

L'osservazione effettuata sul campione a fresco (non fissato) nei 3÷4 giorni successivi al prelievo può essere comunque attendibile, fatto salvo che va comunque considerata qualitativa, giacché potrebbero essere intervenuti fenomeni di alterazione del campione e processi riproduttivi.

La camera di sedimentazione dovrà preferibilmente essere tenuta vicino al microscopio per ridurre al minimo il rischio di agitazione del campione.

5.8. Conteggio delle unità algali

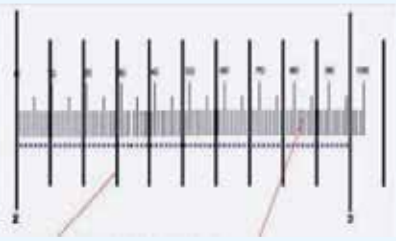
Il conteggio viene effettuato con obiettivi 10x o 20x; per l'identificazione può essere necessario l'ausilio di obiettivi a risoluzione maggiore.

Si consiglia di procedere come di seguito descritto. Scegliere 3 quadrati grandi, di lato 1 cm, non adiacenti, marcati da una linea più spessa (costituiti ognuno da 10 x 10 quadretti) identificati con A B C ed effettuare la conta di tutte le unità algali depositate nell'area di lettura individuata. La scelta dei campi microscopici può essere effettuata con l'ausilio della tabella dei numeri randomizzati e la verifica della casualità della distribuzione delle particelle algali nei campi considerati mediante una serie di 5 conteggi replicati e l'applicazione del *test* del X^2.

Per ogni campo scelto discriminare numericamente i gruppi algali (ad esempio, Cianobatteri, Crisofite, Diatomee, Flagellate, Coniugate, Dinoflagellati, Clorofite). Segnalare se un gruppo od una singola specie (ove è possibile effettuare la speciazione) è prevalente sugli altri.

Si considera sufficiente l'identificazione a livello del genere. Per l'identificazione può essere utile avvalersi della misura delle dimensioni delle singole alghe presenti, da effettuarsi con l'uso del micrometro oculare e dell'ausilio dei manuali per l'identificazione indicati in bibliografia.

Conteggiare il numero di unità algali/mL presenti nel campione, utilizzando un foglio di calcolo predisposto od applicando la formula descritta in 5.9.



5.8.1. Misurazione con il micrometro oculare del materiale osservato

Volendo determinare le dimensioni (in µm) degli elementi algali individuati, procedere moltiplicando il numero delle tacche misurate col micrometro oculare per i coefficienti micrometrici (i coefficienti micrometrici si ottengono dal rapporto fra il micrometro-oculare e il micrometro-oggetto), considerando che ad ogni obiettivo corrisponde un coefficiente micrometrico.

5.9. Calcolo delle Unità Algali

Calcolare il numero medio di unità algali presenti in un quadrato di lato 1 mm come risultato della media dei valori letti su tre quadrati di lato 1 cm (A, B e C); quindi calcolare il numero di unità algali (N.) per mL applicando la seguente formula e riportando il numero a 1000 mL di campione:

$$N./mL = Ni \times A/a \times 1/Ni \times 1/V$$

dove:

– *Ni* numero totale di unità algali contate nelle aree considerate
– *A* area totale della camera di sedimentazione in mm^2
– *a* area del campo microscopico in mm^2
– *Ni* numero di campi contati
– *V* volume del campione sedimentato in mL

6. Interferenze

Possono essere causa di interferenza nella lettura dei risultati la presenza di cristalli e altri materiali, artefatti dovuti alla fissazione od alla raccolta del campione in bottiglie contenenti tiosolfato di sodio; presenza di graffi e di bolle di aria sul fondo della camera di sedimentazione spesso sono dovuti ad errata pulizia della camera.

7. Espressione dei risultati

Riportare il risultato ottenuto come numero di individui/1L.

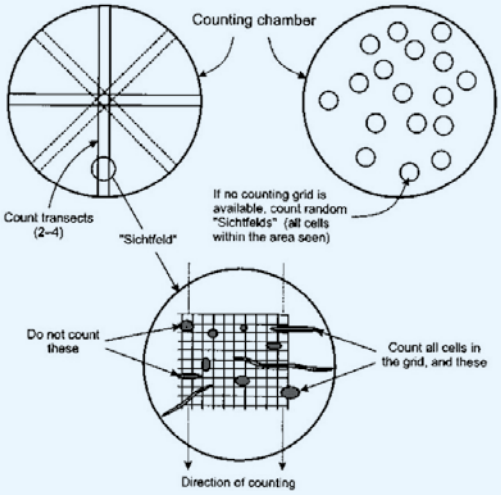
Bibliografia

1) American Public Health Association. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater,* 21th, ed .Washington, DC: APHA; 2005.
2) Bourrelly P (Ed.). *Les algues d'eau douce*. Parigi: N Boubee & C; 1972.
3) Prescott G.W. *How to know the Freshwater algae*. Iowa: W. C. Brown Company Publishers Dubuque; 2000.
4) Streble H, Krauter D. *Atlante dei microrganismi acquatici*. Padova: Franco Muzzio & C;1984.
5) Utermöhl, H. Zur Vervollkommnung der quantitativen Phytoplankton-Methodik. Mitt. Int. Ver. Theor. Angew. *Limnol*. 1958;9:1-38.

SCHEMA DA UNI EN 15204 (DICEMBRE 2006)

Norma guida per la conta di fitoplancton utilizzando la microscopia inversa (tecnica di Utermhöl)

Fase	**Operazione**
Campionatura	Campione di acqua da 100 – 200 ml in bottiglia non riempita oltre 80%
Conservazione del campione	Con aggiunta 0,5% soluzione di Lugol acida o 4% formaldeide
Stoccaggio del campione	In frigorifero a +4 °C Senza conservante = max 36 ore Con conservante = max 12 mesi
Acclimatazione del campione	12 ore a temperatura ambiente
Omogeneizzazione del campione	Su *shaker* in movimento tridimensionale
Riempimento della camera di sedimentazione (dopo eventuale diluizione del campione)	Introduzione da 2 a100 ml con copri-oggetto per chiusura
Sedimentazione	12 ore per 25 ml, 24 ore per 50 ml, 48 ore per 100 ml
Conteggio al microscopio (invertito, con oculare 10x, obiettivo 40x e condensatore di apertura numerica ≥ 0,5)	1) su due transetti perpendicolari fra loro; 2) su un numero di campi scelti a *random* (usando un oculare con reticolo di area pre-determinata mediante vetrino millimetrato); 3) sull'intera camera (vedi esempi nella figura riportata di seguito)
Calcolo della concentrazione di *fitoplancton* (nel caso del conteggio di campi scelti a *random*) $N = X \frac{A\,d}{a\,v}$	N = numero alghe per unità di volume X = media alghe contate per campo A = area totale della camera d = eventuale diluizione del campione a = area reticolo nell'oculare v = volume acqua nella camera



Nella figura sono visibili le tre possibilità di conteggio delle alghe al microscopio prospettate dalla normativa UNI EN 15204:

- a sinistra, (1) la conta su due transetti perpendicolari fra loro, sommando tutte le cellule all'interno dei due transetti stessi;
- a destra, (2) la conta su un numero di campi scelti a *random*;
- in basso, (3) la conta sull'intera area della camera.

DECRETO 30 marzo 2010 "Definizione dei criteri per determinare il divieto di balneazione, nonché modalità tecniche 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"

(G.U. n. 119 del 24-5-2010 , suppl. ordinario n.97)

<table>
<tr><td>Trasparenza < 1 m
Fosforo totale > 20 mcg/l
Clorofilla > 20 mcg/l</td><td>Ispezione visiva: fioriture, schiuma, variazione colore</td><td>SCHIUMA →</td><td rowspan="5">Divieto di balneazione
- informazione al pubblico
- osservazione dell'evoluzione della schiuma</td></tr>
<tr><td colspan="2">↓</td></tr>
<tr><td colspan="2">Dominanza di Cianobatteri:
- Conta
- Identificazione del genere e possibilmente della specie</td><td>SCHIUMA →</td></tr>
<tr><td colspan="3">↓</td></tr>
<tr><td>>20.000 cell/ml
**Osservazione possibilmente giornaliera
- Conte settimanali</td><td>20.000 – 100.000 cell/ml
**Osservazione giornaliera
- Conte almeno settimanali
- Informazione al pubblico</td><td>>100.000 cell/ml
Divieto di balneazione
- Informazione al pubblico
- Conte almeno settimanali</td></tr>
<tr><td rowspan="2"></td><td colspan="3">↓</td></tr>
<tr><td colspan="3">Analisi delle microcistine:
concentrazione >25 mcg/l = divieto di balneazione</td></tr>
</table>

** Nel caso siano presenti Cianobatteri produttori di cianotossine diverse dalle microcistine è necessario condurre una valutazione del rischio caso per caso, consultando, se lo si ritiene opportuno, l'Istituto Superiore di Sanità.

C - LE ALGHE IN LABORATORIO

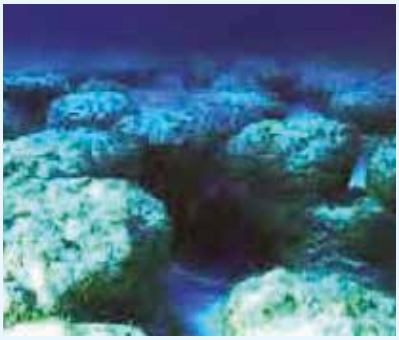
MAURIZIO ZAVANELLA

COLTURA E OSSERVAZIONE DELLE MICROALGHE

Preparazione delle microalghe per le colture

Al ricevimento del campione di alghe, è consigliabile allentare il coperchio del recipiente o della provetta per consentire il passaggio dell'aria e conservare il materiale a temperatura di +15 / 20 °C in ambiente con luce moderata.

Le alghe infatti sono fotosintetiche e necessitano per la crescita di anidride carbonica e di una fonte d'illuminazione.



Da evitare la luce diretta, che fa aumentare la temperatura nel recipiente, provocando un piccolo "effetto serra", dannoso per la coltura. Può essere sufficiente la luce di una finestra esposta a nord. Sono da evitare anche le temperature sopra i +30 °C, mal tollerate dalle cellule algali.

In queste condizioni le alghe si manterranno bene per alcuni giorni e dovranno essere trapiantate solo se sono passati almeno cinque giorni.

***Tecnica di coltura* in vitro**

PREMESSA Si usa solo vetreria di laboratorio accuratamente lavata in acqua calda, risciacquata ripetutamente con acqua distillata o deionizzata e fatta asciugare prima della sterilizzazione in autoclave. I terreni di coltura vanno sterilizzati in autoclave a +121 °C per 15 – 20 minuti. Alcuni terreni per alghe marine non necessitano di sterilizzazione in autoclave, in quanto sono ad alta concentrazione di sale e vanno solamente pastorizzati a +73 °C per 15 minuti, ripetendo la procedura per tre volte in giorni consecutivi. Se si usano matracci da 250 ml, essi vanno riempiti con terreno liquido per non più di 150 ml.

Semine

I campioni di alghe prelevabili nell'ambiente possono contenere frammenti di roccia, gusci di molluschi, quantità di materiale sabbioso e interstiziale presente sui litorali.

Per la raccolta si usano vari tipi di recipienti, tra i quali è da preferire la vetreria di laboratorio (matracci, bottiglie, provette, piastre di Petri) sterilizzati in autoclave.

Le semine vanno eseguite trasferendo in terreni liquidi (brodi) piccole quantità di alga, pari cioè a 5 – 10 ml di materiale, ben sviluppata e controllata preventivamente al microscopio per la sua purezza.

Sarebbero da allestire sempre sub-colture multiple, per assicurarsi di averne almeno una in condizioni di purezza (detta coltura "*axenica*", cioè non contaminata da altre specie di microrganismi).

Per la semina su terreni agarizzati (resi solidi mediante aggiunta di agar-agar all'1,2 – 1,5%) si usano dei tamponi di cotone sterili e si trasferisce un po' di materiale algale di partenza, strisciandolo sull'intera superficie del terreno fresco. Questa tecnica è preferibile con le *Pleurocapsales*, che non si lasciano isolare in terreno liquido.

I tappi dei recipienti (bottiglie e provette) vanno lasciati semi-svitati per consentire il passaggio dell'aria.

Le piastre di Petri sono già provviste allo scopo di distanziatori nel coperchio.

NOTA Alcune specie di alghe possono resistere su terreno solido anche per un anno, ma rischiano di dar luogo alla produzione di individui con variazioni morfologiche. Per riportarle alla normale morfologia, è sufficiente trasferirle in terreno liquido, rimuovendole dalla superficie dell'agar con un tampone sterile di cotone. Se le alghe si presentano secche, è necessario aggiungere una piccola quantità di acqua distillata sterile alle provette, per far riprendere alle stesse la loro normale forma.

Incubazione

Di solito le colture devono essere fatte crescere con periodi alternati di luce (per 16 ore) e di buio (per 8 ore). Idealmente andrebbero illuminate con una lampada fluorescente a luce fredda bianca da 40 W, collegata ad un *timer*.

Se tenuta alla distanza di circa 15 cm, la lampada darà un'illuminazione intorno a 500 candele (lux), che si ridurrà a circa 200 candele se la distanza aumenta a 50 cm.

Un misuratore dell'intensità luminosa con scala espressa in candele (lux) può essere utile in laboratorio.

Le alghe provenienti da acque dolci gradiscono un' intensità luminosa di 400 - 500 candele e crescono in 7 – 14 giorni, secondo la specie e le condizioni dell'inoculo iniziale. In seguito l'intensità luminosa può essere ridotta a 50 – 100 candele. Non tutte le specie sopportano una forte intensità luminosa, peraltro inesistente nell'acqua del mare o dei laghi (vedi grafico sui livelli di luce).

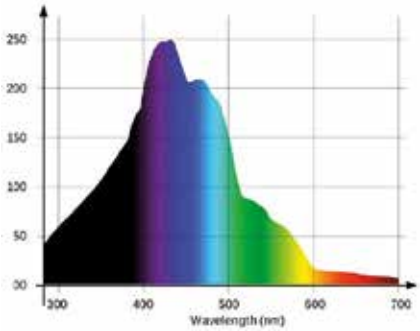
Le alghe marine crescono bene con quantità di luce inferiore rispetto alle alghe provenienti da acque interne, cioè con 200 – 300 candele, ma i cicli di luce-buio ed i tempi di sviluppo sono gli stessi.

La temperatura d'incubazione varia da specie a specie, in quanto le alghe in natura sviluppano grossolanamente fra +5 e +35 °C (fino a +37°C le specie delle fonti termali).

Nella maggior parte dei casi è indicata la temperatura ambiente (intesa intorno a +20 °C), mentre per i Cianobatteri è da preferire l'incubazione in termostato tra +25 e +28 °C.

Penetrazione della luce in acqua marina in funzione della lunghezza d'onda

L'asse orizzontale rappresenta la lunghezza d'onda della luce, in nanometri, e l'asse verticale rappresenta la profondità, in metri, a cui l'intensità di quella lunghezza d'onda è uguale all'1% dell' intensità sulla superficie. Da questo grafico si vede che le parti viola e blu dello spettro luminoso penetrano di più nell'acqua di mare, mentre non raggiungono grandi profondità, nell'ordine, la luce verde, quella giallo-arancio. La luce rossa (che ha lunghezze d'onda superiori a 600 nm) è in grado di penetrare in acque molto basse.



Periodicità dei trapianti

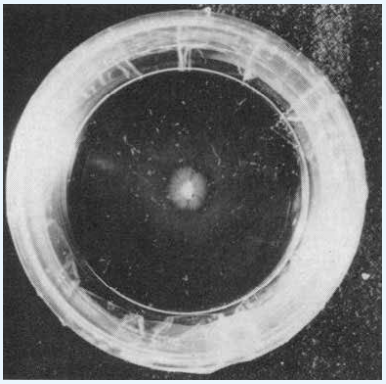
La necessità di fare delle sub-colture dipende dalla specie di alga coltivata. Tuttavia, dopo un certo periodo d' incubazione con illuminazione nelle condizioni di cui sopra, le colture possono stare a temperatura ambiente (e con luce ridotta) per 1 – 6 mesi, prima che sia necessario provvedere ad un nuovo trapianto.

Solamente alcune specie (tra cui *Spirogyra* e *Volvox*) esigono un'illuminazione continua.

Sono da realizzare sub-colture esclusivamente da quelle fatte di recente. I Flagellati richiedono trapianti ogni 1 – 3 mesi, le alghe filamentose e quelle unicellulari immobili vanno trapiantate ogni 3 – 6 mesi, le *Volvocales* ogni 7 – 10 giorni, le alghe marine ogni 1 – 3 mesi (Ward's, 2002).

Waterbury *e Coll*. (1978), per ovviare all'inconveniente dei periodi relativamente lunghi d'incubazione necessari allo sviluppo delle alghe (valutati in alcune settimane) e per ridurre il numero di trapianti, hanno proposto una tecnica particolare.

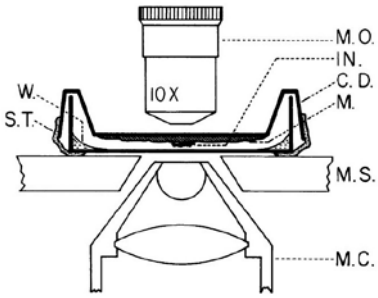
Il terreno di coltura contenente agar viene pipettato allo stato fuso a 8 ml nel fondo di una piastra di Cooper (Falcon®) per colture di tessuti, riempiendo completamente lo spazio sottostante il coperchio, e lasciato solidificare. Dopo la semina in superficie del campione di alghe, il coperchio della piastra viene posizionato nuovamente a contatto con il terreno. La piastra soggiorna in termostato chiusa in un sacchetto di plastica trasparente contenente, come antimuffa, carta da filtro imbevuta con solfato di rame in soluzione.



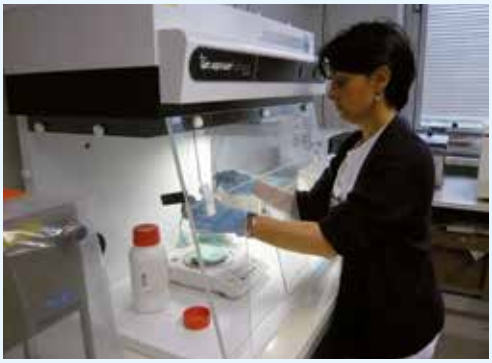
Piastra di Cooper Falcon®.

Con questo sistema risultano facilitate le letture dirette delle piastre al microscopio per seguire l'evoluzione della crescita. Applicando una sorgente luminosa laterale (50 – 200 lux) rispetto alle piastre di Cooper, questi Autori hanno potuto saggiare contemporaneamente anche la mobilità dei ceppi, sfruttando la *risposta fototattica* delle alghe alla luce. In pratica, rilevando al microscopio gli spostamenti delle colonie verso la luce sulla superficie del terreno rispetto alla posizione iniziale della cellula-madre.

M.O. = obiettivo del microscopio
IN. = campione seminato
C,D, = coperchio della piastra
W. = spazio tra fondo e coperchio
S.T. = tavolino del microscopio
M. = terreno colturale



Terreni colturali



Preparazione in laboratorio dei terreni di coltura per microalghe.

Dato il numero considerevole di formulazioni messe a punto da vari Autori nel corso degli anni (e quindi nell'impossibilità di elencarle tutte senza omissioni), viene presentata come esempio una lista di terreni disponibili in commercio, fornita dall'Università di Austin, Texas, USA).

UTEX The Culture Collection of Algae
Media List

- 1% F/2
- 1/2 CHEV Diatom Medium
- 1/2 Enriched Seawater
- 1/2 Erdschreiber Medium
- 1/2 Soil+Seawater Medium
- 1/3 CHEV Diatom Medium
- 1/3 Soil+Seawater Medium
- 1/4 ERD
- 1/4 Soil+Seawater Medium
- 1/5 CHEV Diatom Medium
- 1/5 Soil+Seawater Medium
- 1:1 DYIII/PEA + Gr+
- 2/3 CHEV Diatom Medium
- 2/3 Enriched Sewater Medium
- 20% Allen + 80 % ERD
- 2X CHEV Diatom Medium
- 2X Erdschreiber's Medium
- 2X Soil+Seawater Medium
- 5% F/2 Medium
- 5/3 Soil+Seawater Agar
- A+ Medium
- Ag Diatom Medium
- Allen Medium
- Artificial Seawater Medium
- BG-11 + 1% NaCl Medium
- Cyanidium Medium

- Cyanophycean Medium
- Dasycladales Seawater
- Desmid Medium
- DYIII Medium
- Enriched Seawater Medium
- Erdschreiber's Medium
- ES/10 Enriched Seawater
- ES/2 Enriched Seawater
- ES/4 Enriched Seawater
- Euglena Medium
- F/2 Medium
- F/2+NH4
- HEPES Medium
- J Medium
- LDM Medium
- Malt Medium
- MES-volvox Medium
- Modified 2 X CHEV
- Modified 2 X CHEV + Soil
- Modified Artificial Seawater
- Modified Bold 3N Medium
- Modified CHEV
- Modified COMBO Medium
- Modified Desmidiacean Medium
- N/20 Medium
- Ochromonas Medium
- P49 Medium
- Polytomella Medium
- Porphridium Medium
- Proteose Medium
- Snow Algae Media
- Soil Extract
- Soil Extract + Sodium Metasilicate
- Soil+Seawater Medium
- Soilwater: BAR Medium
- Soilwater: GR- Medium
- Soilwater: GR-/NH4 Medium
- Soilwater: GR+ Medium
- Soilwater: GR+/NH4 Medium
- Soilwater: PEA Medium
- Soilwater: Peat Medium
- Soilwater: VT Medium
- Spirulina Medium
- SS Diatom Medium
- Tap Medium
- Trebouxia Medium
- Volvocacean Medium
- Volvocacean-3N Medium
- Volvox Medium
- Volvox-Dextrose Medium
- Waris Medium
- Waris+Soil Extract Medium
- WC Medium

Incubazione di colture di microalghe in laboratorio. Il termostato ha un'illuminazione interna fornita da una lampada a luce fredda bianca fluorescente da 13 W.

Un certo numero di Ricercatori ha avanzato delle riserve sulla fertilità e sulla selettività dei comuni terreni batteriologici usati per l'isolamento dei Cianobatteri. Essi hanno osservato: 1) che l'agar può contenere delle impurità che agiscono da sostanze inibenti la crescita; 2) che i germi contaminanti le alghe riescono a sopravvivere nonostante la scarsità di nutrienti.

Sono state pertanto proposte delle varianti alla composizione di alcuni terreni solidi, ad esempio trattando l'agar o sostituendolo con agarosio e introducendo sostanze ad azione selettiva, come fenolo, sodio ipoclorito, sodio solfito, detergenti e antibiotici.

Nella sua esperienza, Ferris *e Coll*. (1991) hanno sostituito nelle piastre di Petri lo strato di terreno agarizzato con 5 filtri di fibra di vetro sovrapposti, sterilizzati e impregnati con 20 ml di un terreno liquido (BG-12 oppure BG-13, simili a BG-11 Broth), resi selettivi dall'aggiunta di antibiotici alla concentrazione di 100 mcg/ml. Dopo varie prove con cefoxitin, ampicillina, penicillina G e cicloeximide, è stato scelto l'imipenem, un antibiotico beta-lattamico ad ampio spettro.

Le piastre seminate venivano incubate a +25 °C per 14 giorni in termostato con il 5% di CO_2 e illuminazione mediante lampada fluorescente a luce fredda bianca da 300-500 lux.

I risultati sono stati superiori al previsto per il fatto che le alghe, in presenza di imipenem, crescevano anche senza illuminazione.

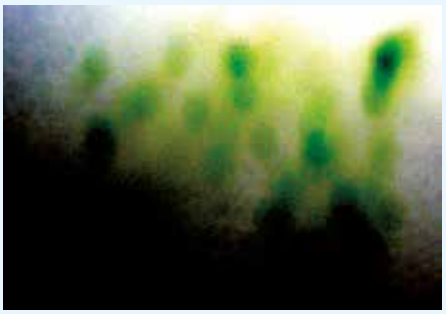
Identificazione

Schema di classificazione delle alghe (Lee, 1989)
Limitatamente a quelle di uso alimentare o industriale (vedi Capitolo 1)

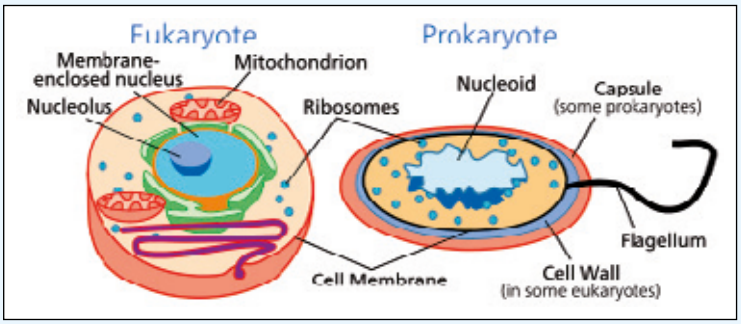
ALGHE (Macroalghe o alghe pluricellulari)	Alghe brune	*Phaeophyceae*
	Alghe rosse	*Rhodophyta*
	Alghe verdi	*Chlorophyta PLURICELLULARI*
MICROALGHE (alghe unicellulari)	Alghe giallo-brune	*Chrysophyta*
	Alghe dinoflagellate	*Dinophyta*
	Alghe diatomee	*Bacillariophyceae*
	Alghe verdi	*Chlorophyta UNICELLULARI*
	Alghe azzurre	*Cyanophyta*

Uno studio qualitativo preliminare viene raccomandato dalla norma europea UNI EN 15204 (2006), in quanto le alghe vive possono fornire già alcune indicazioni utili all'identificazione non più reperibili nei campioni conservati.

Ad esempio, l'auto-fluorescenza dovuta alla clorofilla-a consente una distinzione fra i piccoli Cianobatteri e gli Eubatteri.



		Green Algae		*Chlamydomonas*	Water
Photosynthesis	Hydrogenase	Cyanobacteria	Heterocyst	*Chlorella*	"
				Anabaena	"
			Non-Heterocyst	*Oscillatoria*	"
	Nitrogenase	Photosynthetic Bacteria	Non-sulfur Bacteria	*Rhodopseudomonas*	Organic Matters (Organic Acids)
				Rhodobacter	"
				Rhodospirillum	"
			Sulfur Bacteria	*Chromatium*	Sulfates
				Thiocapsa	"
Non-Photosynthesis	Hydrogenase	Obligate Anaerobes		*Clostridium*	Organic Matters (Sugers)
				Methanobacterium	"
		Facultative Anaerobes		*Escherichia*	"
	Nitrogenase	Nitrogen Fixing Bacteria	Facultative Aerobes	*Azotobacter*	"
				Clostridium	"
			Facultative Anaerobes	*Klebsiella*	"

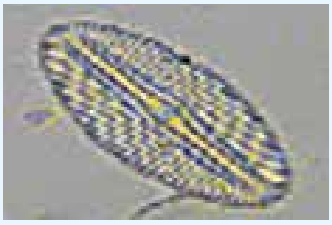


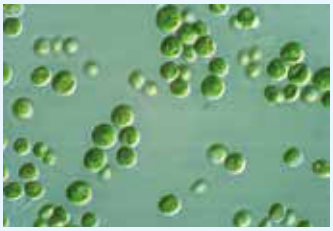
Dal materiale originale raccolto o dalle colture ottenute in laboratorio si possono allestire estemporaneamente preparati microscopici a fresco. È sufficiente realizzare una sospensione di piccole quantità di materiale in una goccia di soluzione fisiologica, da posizionare su un vetrino porta-oggetti con adeguato copri-oggetti. L'osservazione al microscopio a luce trasmessa o in contrasto di fase, con ingrandimenti a 200x oppure a 400x nel caso di microalghe, può orientare nell'identificazione se si dispone di un atlante fotografico o di tavole diagnostiche.

Macroalghe di uso alimentare o industriale (vedi Capitolo 1)

Tipi		Caratteri essenziali
Alghe brune (Feofite)		Marine, multicellulari a struttura complessa con filamenti. Formano masse abbondanti (sargassi) che si attaccano a substrati. Contengono clorofilla a/c, c-carotene, fucoxantine di colore bruno scuro o verde oliva. Utili per acido alginico, fertilizzanti e alimenti.
Alghe rosse (Rodofite)		Mari tropicali e sub-tropicali. Hanno plastidi rossi (rodoplasti), sono senza flagelli e cilia. Riproduzione sessuata. Alcune calcificate (*Corallina*). Raramente con singole cellule (*Porphyridium*).
Alghe verdi (Clorofite)		Suolo e acque dolci o salate. Simili alle piante con riproduzione da asessuata a isogamica, eterogamica, oogamica. Cellule con cellulosa e pectina. Hanno cloroplasti come le piante superiori e contengono amido oltre a clorofilla, carotene e xantine.

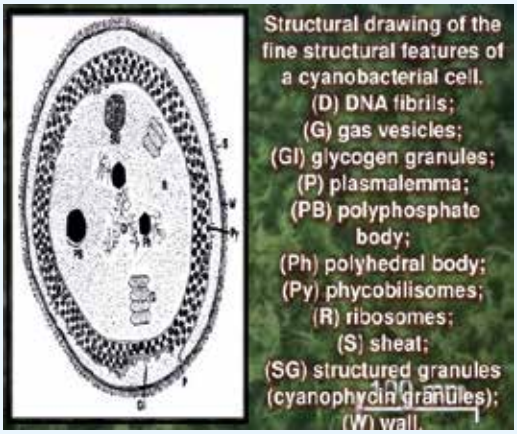
Microalghe di uso alimentare o industriale (vedi Capitolo 1)

Tipi		Caratteri essenziali
Alghe giallo-brune (o dorate) (Crisofite)		Prevalgono il acque dolci di laghi e stagni, hanno plastidi contenenti pigmenti giallo-oro. Facilmente riconoscibili per il colore dorato.
Dinoflagellate		Marine (prevalenza nel *fitoplancton)*. Libere, filamentose, unicellulari o colonie. Movimenti rotatori con flagelli. Amido, oli, clorofilla a/c, xantofille di colore bruno. Tossiche per pesci e uomo. Marea rossa nella fioritura. *Noctiluca* bioluminescente di notte in mare.
Diatomee		*Habitat* terrestre, acque salate e dolci. Cellule singole con doppia membrana, anche in colonie. Forme “centriche” a simmetria radiata con plasmidi e “pennate” a simmetria bilaterale senza plasmidi. Gocce di crisolaminarina da fotosintesi e pigmenti vari (clorofilla a/b, alfa/beta carotene, xantofille).

Clorofite (unicellulari)		Vedi caratteristiche nelle clorofite come macroalghe pluricellulari. *Haematococcus* produce il colorante xantina; *Botriococcus braunii* accumula idrocarburi; *Dunaliella* forma beta-carotene; *Chlorella* contiene sostanze simili ai pollini delle piante da fiore.
Alghe blu-verdi (Cianofite)		Ubiquitarie. Veri e unici procarioti. Struttura da unicellulare a filamentosa a colonia, senza flagelli o cilia, ma si muovono. Pigmentazione da clorofilla-a, beta-carotene e xantofille. Le ficobilinproteine danno il colore blu-verde. Accumulano glicogeno.

Altri *phyla* di microalghe frequentemente diagnosticabili

Euglenoidi		Acque dolci, unicellulari con flagelli, verdi, al buio diventano incolori. Fotosintetiche e anche eterotrofe. Pellicola proteica sotto il plasmalemma. Plastidi con clorofilla a/b, beta-carotene, xantofille.
Alghe giallo-verdi (Xantofite)		Terrestri, acque dolci o salate. Hanno pareti con pectina e cellulosa. Accumulano oli, pigmenti nei plastidi (xantoplasti) come clorofilla a/c, xantine, beta-carotene. Tipico il genere *Vaucheria*.

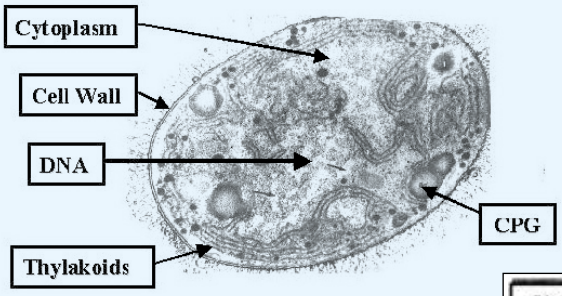


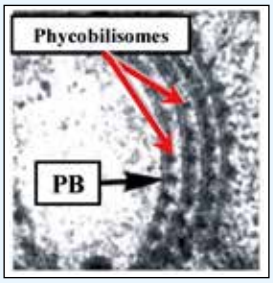
I metodi basati sulla genetica molecolare hanno aperto nuove prospettive nel riconoscimento di specie non identificabili con i metodi tradizionali.

Lo studio di frammenti di DNA del gene 16S rRNA, comune alla maggior parte dei batteri, ha consentito, ad esempio, di riconoscere e differenziare Cianobatteri difficilmente coltivabili in laboratorio.

Santegoeds *e Coll*. (1998) hanno descritto le loro esperienze su microalghe che colonizzano fonti termali, dove vivono a +50 ed anche a +70 °C, scoprendo con una metodica PCR ben 14 specie di alghe contro le 3 specie (diverse dalle prime) rilevate mediante coltura su terreno di Castenholz (TYD).

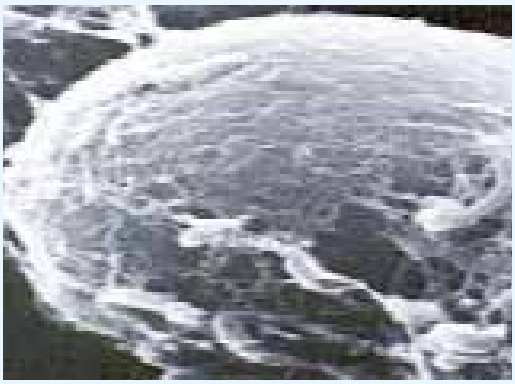
Alcuni aspetti ultrastrutturali delle alghe visti al microscopio elettronico

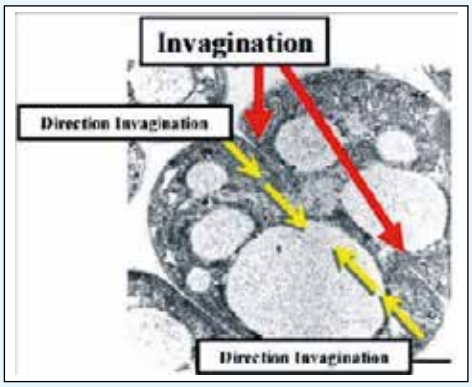




Tilacoidi: sacculi immersi in un liquido nei cloroplasti delle cellule vegetative delle alghe fotosintetiche, con la funzione di raccogliere e immagazzinare la luce.

Ficobilisomi: pile di proteine ancorate alle membrane dei tilacoidi. Ogni proteina ha un assorbimento specifico per una lunghezza d'onda della luce e un massimo di fluorescenza nel visibile. Trasformano l'energia luminosa in clorofilla fra 500 e 650 nm.

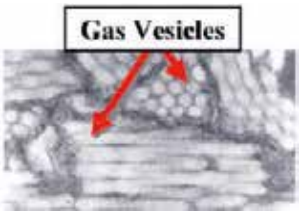




A sinistra: superficie di una cellula algale con adesi alcuni batteri; a destra, un esempio di divisione delle cellule algali in fase di riproduzione.

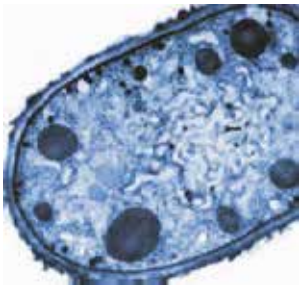
Eterocisti

Cellule disposte ad intervalli lungo i filamenti algali. Hanno parete più spessa, ma contenuto meno denso delle altre cellule. Servono per la fissazione dell'azoto.



Acineti

Cellule di resistenza prodotte in situazioni di *stress*, come mancanza di nutrimento o di luce. Hanno pareti spesse e contengono sostanze di riserva.



Microplasmodesmata

Pori di minime dimensioni sui setti di separazione fra cellule di procarioti (come Actinomiceti e Cianobatteri) con funzione di scambio di metaboliti.

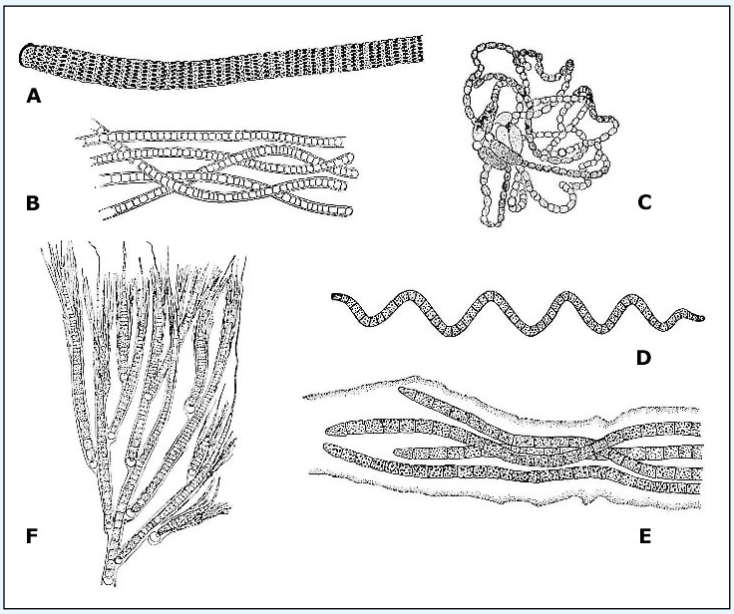
D - I CIANOBATTERI, AI CONFINI DELLA MICROBIOLOGIA

MAURIZIO ZAVANELLA

MORFOLOGIA DEI CIANOBATTERI*

I Cianobatteri, come tutti i procarioti, sono organismi unicellulari, sferici o di forma allungata.

Possono vivere isolati o, più frequentemente, riunirsi in colonie avvolte da una guaina mucillaginosa che mantiene unite le cellule di una colonia o di più colonie insieme (**figura E**).



In una colonia ciascun individuo continua a vivere una vita indipendente.

Le colonie sono planctoniche, cioè liberamente natanti o bentoniche, cioè aderenti ad un substrato.

Esistono colonie filamentose semplici, di forma lineare (*Oscillatoria*, **figura A**), elicoidale (*Spirulina*, **figura D**), o variamente attorcigliata (*Nostoc*, **figura C**) oppure ramificate (*Rivularia*, **figura F**).

Le colonie possono presentarsi anche come agglomerati più o meno voluminosi di cellule immerse in un'abbondante massa gelatinosa (*Gleocapsa*).

Nelle colonie è possibile osservare cellule differenziate rispetto agli altri organismi e specializzate a svolgere particolari funzioni nell'ambito della colonia:

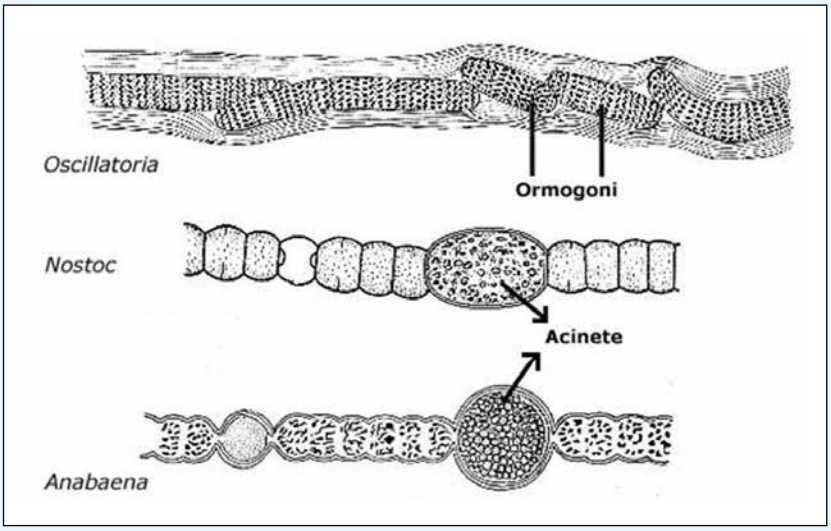
– le *eterocisti* per la fissazione dell'azoto;
– gli *acineti* e i *necridi* per la riproduzione agamica.

* Da http://www.dipbot.unict.it/botanica-web/cianobatteri/riproduzione.htm

RIPRODUZIONE DEI CIANOBATTERI

I Cianobatteri, come il resto dei procarioti, hanno solo una riproduzione vegetativa che avviene di norma per scissione binaria, una divisione cellulare amitotica, con separazione delle due parti per invaginazione della membrana plasmatica previa duplicazione del filamento di DNA.

Le forme coloniali possono moltiplicarsi per **frammentazione**, cioè direttamente per separazione di gruppi cellulari dalla colonia madre, o per **sporulazione**, cioè per formazione di spore durevoli.



La **frammentazione**, soprattutto nelle colonie filamentose, porta al distacco di gruppi cellulari detti ormogoni, inizialmente immersi nella medesima guaina gelatinosa. Separandosi, essi riproducono ciascuno una nuova colonia autonoma, assolutamente identica, strutturalmente e geneticamente, alla colonia madre. La separazione degli ormogoni può avvenire per rottura dei filamenti in punti qualsiasi o, più spesso, in corrispondenza di particolari cellule morte, dette **necridi** o dischi di separazione.

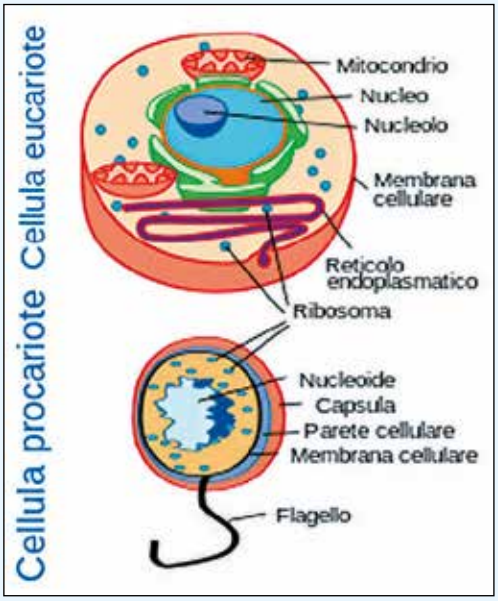
La **sporulazione** avviene per trasformazione di cellule della colonia in strutture durevoli in grado di divenire quiescenti e resistere alle condizioni avverse, come la siccità. Si tratta di spore, dette **acineti**, voluminose, con parete fortemente ispessita e pluristratificata, in grado di sopravvivere in vita latente anche per moltissimi anni e di germinare, in condizioni idonee, riproducendo una nuova colonia.

NOTA ESPLICATIVA *- DIFFERENZE TRA PROCARIOTI ED EUCARIOTI*

Il primo livello di identificazione di qualsiasi tipo cellulare si basa sulla distinzione tra cellula procariotica e cellula eucariotica. Diverse caratteristiche distinguono i due tipi cellulari:

1. La prima differenza viene evidenziata già dal nome: *eucarion* deriva dal greco, e significa "vero nucleo"; viceversa *procarion* significa "prima del nucleo". Le cellule eucariotiche possiedono un involucro nucleare che separa il DNA dal resto della cellula, al contrario le cellule procariotiche hanno il DNA libero nel citoplasma in una regione definita nucleoide.

2. La molecola di DNA contenuta nelle cellule procariotiche è solitamente di forma circolare e di dimensioni molto ridotte rispetto agli eucarioti. Le cellule eucariotiche presentano più molecole di DNA non circolare, organizzate in cromosomi. La quantità di DNA nelle cellule eucariotiche infatti è superiore di diversi ordini di grandezza.
3. La cellula eucariotica ha normalmente dimensioni dell'ordine di decine di micrometri, mentre una cellula procariotica ha dimensioni che variano nell'ordine di pochi micrometri.
4. Differente è anche la struttura che delimita la cellula. Sia la cellula eucariotica che quella procariotica sono delimitate da una membrana costituita principalmente da fosfolipidi, che si dispongono a formare un doppio strato; la cellula procariotica però è anche dotata di una parete cellulare, esterna alla membrana, costituita per la maggior parte da peptidoglicani (molecole formate da zuccheri e peptidi) che conferisce alla cellula forma e rigidità. Inoltre, alcune cellule procariotiche hanno un'altra membrana esterna costituita da lipopolisaccaridi e proteine.



5. L'interno della cellula eucariotica è caratterizzato dalla presenza di organelli intracellulari rivestiti da membrana, assenti nella cellula procariotica. Al contrario, il citoplasma delle cellule procariotiche è privo di strutture membranose, se si eccettuano i mesosomi, che derivano dal ripiegamento della membrana plasmatica.
6. Le cellule eucariotiche si dividono per mitosi, un processo che coinvolge la condensazione del DNA duplicato in cromosomi e la loro separazione mediante un processo elaborato e strettamente regolato. I procarioti si dividono per scissione binaria: le cellule dopo aver duplicato il proprio DNA ed essersi allungate fino quasi al doppio della loro lunghezza media si dividono in due cellule figlie a seguito della formazione di un setto divisorio e una molecola di DNA rimane in ognuna delle due cellule.
   Sebbene esistano molte differenze tra cellule eucariotiche e procariotiche, esistono anche molte similitudini legate al fatto che le cellule eucariotiche si sono evolute da antenati procariotici. Entrambi i tipi cellulari, per esempio, hanno un linguaggio genetico identico, vie metaboliche comuni ed alcune caratteristiche strutturali comuni.

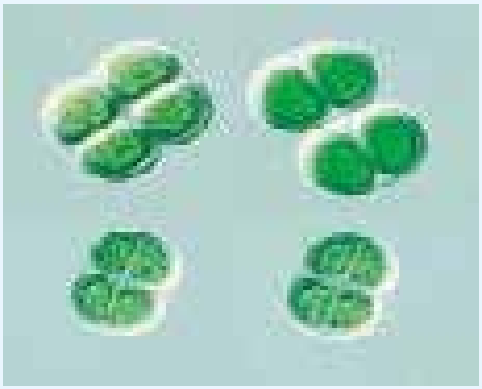
(da www.unisr.it/biotechbook/view.asp?id=175)

La classificazione dei Cianobatteri è molto complessa e tutt'altro che definitiva. Difatti le proposte in letteratura sono numerose e spesso contrastanti nella denominazione della stessa specie.

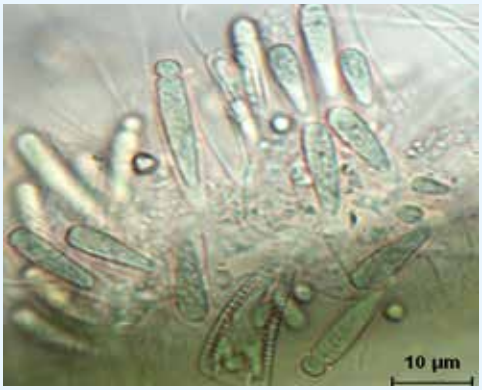
Classificazione del gruppo *Cyanobacteria*
(da Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 9th ed., 1993)

Sottogruppo (= Ordine)	**Genere**
Chroococcales	*Chamaesiphon* *Cyanothece* *Gloeobacter* *Gloeocapsa* *Gloeothece* *Microcystis* *Myxobactron* *Synechoccus* *Synechocystis*
Pleurocapsales	*Chroococcidiopsis* *Dermocarpa* *Dermocarpella* *Myxosarcina* *Pleurocapsa* *Xenococcus*
Oscillatoriales	*Arthrospira* *Lyngbya* *Microcoleus* *Oscillatoria* *Pseudanabaena* *Spirulina* *Starria* *Trichodesmium*
Nostocales	*Anabaena* *Aphanizomenon* *Cylindrospermum* *Nodularia* *Nostoc* *Rivularia (Calothrix)* *Scytonema*
Stigonematales	*Chlorogloeopsis* *Fischerella* *Stigonema*

Cyanothece (Aphanothece).



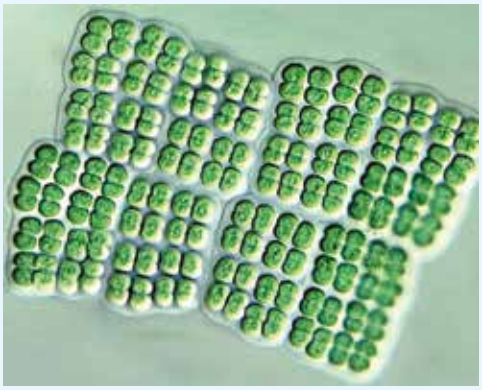
Gloeocapsa (Chroococcus).



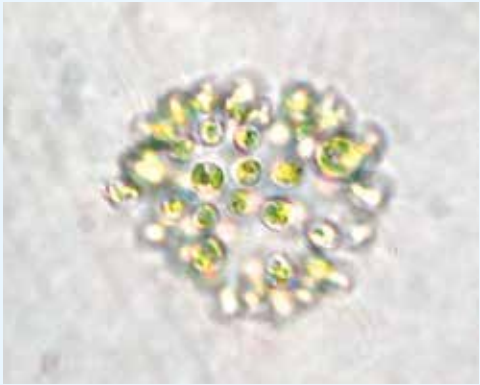
Chamaesiphon.

Cyanothece.

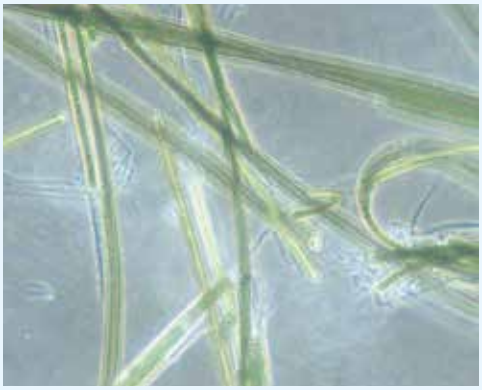
Gloeocapsa.



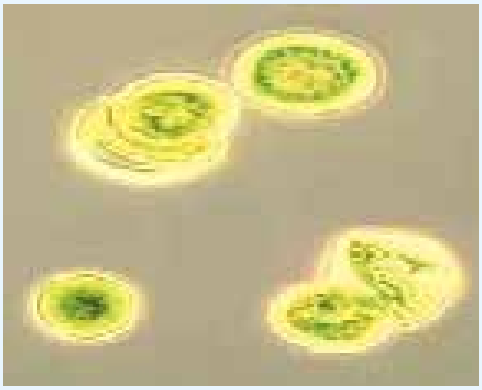
Synechocystis (Merismopedia).



Microcystis.

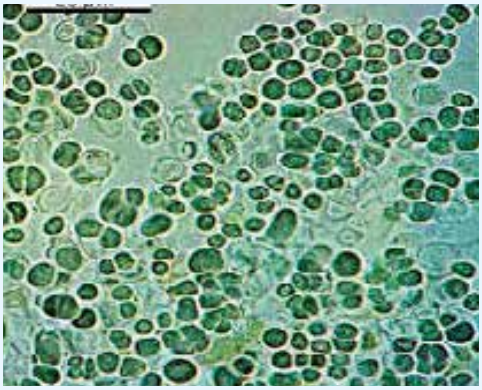


Lyngbya.

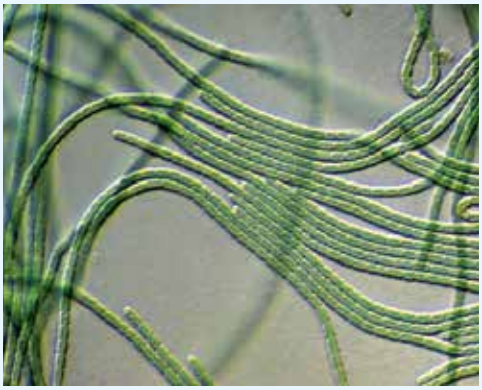


Synechoccus (Cyanocystis).

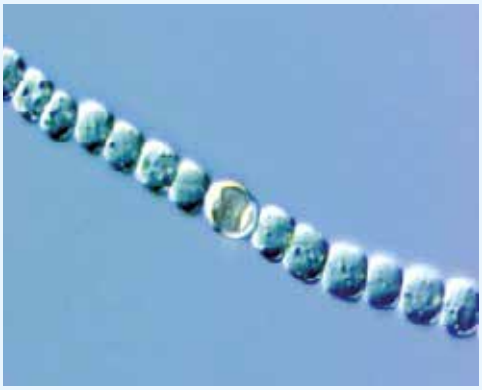
Microcoleus.



Pleurocapsa.



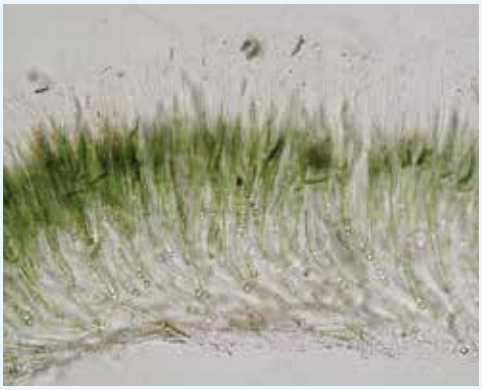
Oscillatoria.



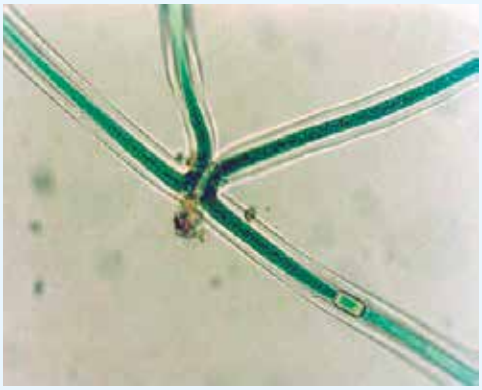
Anabaena.

Nostoc.

Rivularia.



Aphanizomenon.

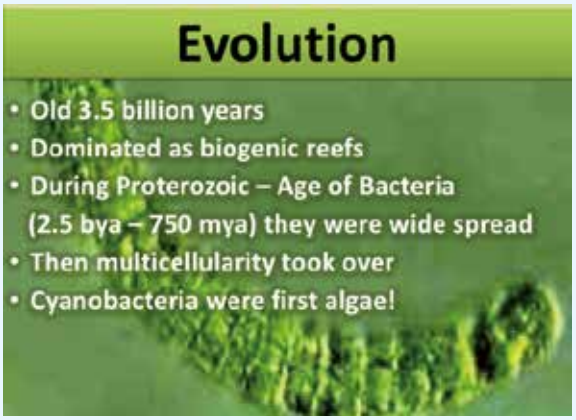


Scytonema.

Stigonema.

I Cianobatteri hanno incuriosito parecchi studiosi in conseguenza delle loro origini antichissime (*vedi box a lato*) e, al tempo stesso, delle somiglianze con i vegetali più evoluti.

Allen *e Coll*. (1968) sostenevano che gli studi sulle tecniche microbiologiche per isolare le alghe blu-verdi in laboratorio non avevano compiuto grandi progressi fino alla comparsa dei terreni d'arricchimento, che permettevano la differenziazione dalle alghe eucariote.



Uno di questi terreni era stato messo a punto da **Beijerinck** già nel 1902, che aveva coltivato una specie di *Nostoc* in un brodo privo di sostanze azotate. Studi successivi hanno dimostrato però che la capacità di fissare l'azoto è non è molto diffusa fra le specie di Cianobatteri e che pertanto questo metodo restringe il campo d'indagine fra tutte le alghe blu-verdi.

Altri Autori (**Peary** *e Coll*., 1964) hanno tentato di selezionare i Cianobatteri con temperature elevate d'incubazione (60-75 °C) per sfruttare le proprietà termofile dei medesimi. Tuttavia hanno visto che questa caratteristica fisiologica è relativamente rara nel gruppo.

Difatti **Kratz** *e Coll*. (1955) avevano suggerito come ottimali le temperature di +32,5 °C per *Nostoc muscorum*, +35 °C per *Anabaena cylindrica* e +41°C per *Anacystis nidulans,* mentre per molte specie di *Chlorella* bastano +25 °C (muore sopra i +30 °C).

L'esperienza di Allen *e Coll*. (1968) su *Chroococcaceae*, *Nostococeae* e *Oscillatoriaceae* è molto istruttiva. Questi Autori omogeneizzavano i campioni d'acqua per 30 minuti su agitatore rotante e sospendevano i campioni di suolo (10 g in 40 ml di brodo) prima di allestire una serie di diluizioni decimali da seminare, ciascuna, in tre provette di brodo, con e senza sodio nitrato (terreno di Hughes, Gorham e Zender).

L'incubazione avveniva in bagnomaria per 14 giorni a due temperature (+25 e + 35 °C) con illuminazione mediante lampada fluorescente da 600 candele.

Dal momento della crescita visibile (10-14 giorni) venivano allestiti preparati a fresco per lettura al microscopio in contrasto di fase, che permettevano una prima classificazione delle alghe nelle seguenti categorie:

1. Alghe blu-verdi: (a) unicellulari; (b) filamentose con eterocisti; (c) filamentose senza eterocisti; (d) ramificate.
2. Alghe eucariote: (a) alghe verdi; (b) diatomee; (c) euglenoidi.

L'incubazione alle due temperature sopra citate si rivelava ottimale per la selezione, anche perché le alghe con abbondanti vacuoli di gas all'interno crescono meglio a +25 °C.

Vaara *e Coll*. (1979) descrivono un metodo per isolare in coltura pura i Cianobatteri mediante striscio su piastre di BG-11 Agar supplementato con lo 0,5% di glucosio e lo 0,02% di *Casamino Acids*. L'incubazione avveniva a +26 °C con illuminazione continua a 500-900 lux, data da una lampada fluorescente. Il metodo sfrutta la proprietà di movimenti autonomi propria di gran parte dei Cianobatteri (*gliding*) sulla superficie dell' agar in cui sono stati tracciati dei solchi con una spatola di vetro sterilizzata.

Gli spostamenti delle microalghe sono superiori a quelli dei comuni batteri contaminanti. Le specie predominanti, provenienti dai laghi e dal Mar Baltico della Finlandia, erano rappresentate da *Oscillatoria*, *Anabaena* e *Lyngbya*.

Tang *e Coll*. (1997) affermano che i Cianobatteri possono essere fatti crescere in laboratorio su appositi terreni artificiali liquidi o solidi incubati a differenti temperature (da +5 a +35 °C) con illuminazione continua mediante lampada al *neon* da 40 W con emissione di fotoni a 225 micro-mol. $^{-2}$. s^{-1}

La temperatura ottimale d'incubazione nel 75% degli isolamenti varia, nell'esperienza di questi Autori, fra +15 e + 35 °C, con una media di +19,9 °C.

Bano *e Coll*. (2004) per caratterizzare cinque specie di Cianobatteri rispetto alle loro esigenze di pH e di salinità hanno coltivato i ceppi, opportunamente diluiti, in terreno ASN-III a +28 ± 2 °C con illuminazione continua, mantenendo poi le colture sviluppate a temperatura ambiente in luce diffusa.

Pathade *e Coll*. (2012) hanno adottato il terreno BG-11 liquido, considerato una base ottimale per il controllo di alghe Cloroficee e Cianoficee. La crescita delle medesime veniva valutata in termini di densità ottica a 678 nm con uno spettrofotometro a UV.

Perez *e Coll*. (2012) hanno fatto crescere ceppi di *Calothrix* e di *Anabaena* in terreno BG-11 senza azoto, tamponato a pH 7.6 con HEPES 10 mM, a +25 °C ± 2 °C.

TERRENI DI COLTURA

Il substrato artificiale più favorevole (adottato da più parti) sarebbe il terreno **BG-11**, sia in forma di Brodo che di Agar (contenente 1-1,5% di Agar), generalmente impiegato in provetta. Questo mezzo di coltura viene impiegato anche – in forma liquida – per far crescere le alghe con proprietà fotosintetiche nei bioreattori (*foto a lato*).

Terreno BG-11 (blue- green 11) per alghe e protozoi
(formula Oxoid)

Stocks		**per litre**
(1)	$NaNO_3$	15.0 g
		per 500 ml
(2)	K_2HPO_4	2.0 g
(3)	$MgSO_4.7H_20$	3.75 g
(4)	$CaCl_2.2H_20$	1.80 g
(5)	Citric acid	0.30 g
(6)	Ammonium ferric citrate green	0.30 g
(7)	$EDTANa_2$	0.05 g
(8)	Na_2CO_3	1.00 g

(9) Trace metal solution:	**per litre**
H_3BO_3	2.86 g
$MnCl_2.4H_2O$	1.81 g
$ZnSO_4.7H_20$	0.22 g
$Na_2MoO_4.2H_20$	0.39 g
$CuSO_4.5H_20$	0.08 g
$Co(NO_3)2.6H_20$	0.05 g

Medium	**per litre**
Stock solution 1	100.0 ml
Stock solutions 2 - 8	10.0 ml each
Stock solution 9	1.0 ml

Make up to 1 litre with deionized water. Adjust pH to 7.1 with 1M NaOH or HCl.
For agar add 15.0 g per litre of Bacteriological Agar (Oxoid L11)*.
Autoclave at 15 psi for 15 minutes.

ALTRI TERRENI

Il terreno di **Allen e Arnon**, la cui composizione è a fianco riportata, può essere impiegato liquido o solido, con l'aggiunta di agar-agar all'1,5% prima della sterilizzazione.

Composition :	
Magnesium Sulphate ($MgSO_4.7H_2O$)	0.025 g
Calcium chloride	0.05 g
Sodium chloride	0.20 g
Dipotassium hydrogen phosphate	0.35 g
A_5 trace elements stock solution	1.0 ml
Glass-distilled water	1,000 ml

$NaNO_3$	496.0 mg
K_2HPO_4	39.0 mg
$MgSO_4.7H_2O$	75.0 mg
$CaCl_2.2H_2O$	36.0 mg
Fe citrate	6.0 mg
$Na_2SiO_3.9H_2O$	59.0 mg
Na_2CO_3	20.0 mg
Citric acid	6.0 mg
EDTA	1.0 mg
Glass-distilled water	1.0 L

Adjust pH to 7.5±0.5

*Il terreno di **Gorham**, adatto per alghe in generale, identificato come terreno ATCC 625, ha la composizione (in grammi/litro) nel box a lato.*

L' **Algae Agar**, secondo la casa produttrice (Scharlab), ha una composizione che fornisce tutte le sostanze nutritive necessarie per una buona crescita delle alghe, ma non di funghi e batteri.

Il terreno è adatto per testare le alghe, ma il suo scopo principale è quello del mantenimento in coltura, oltre all'isolamento da acque contaminate.

La semina avviene per striscio, la temperatura d'incubazione consigliata è di +20 ± 2°C per 7 – 15 giorni in termostato con una fonte luminosa fino a notare crescita (entro 1-2 settimane). La sua composizione è la seguente (formula in grammi/litro):

sodio nitrato 1, di potassio fosfato 0.25, magnesio solfato 0.513, ammonio cloruro 0.05, calcio cloruro 0.058, ferro cloruro 0.003, agar 15.
Per la preparazione, sospendere 17 g di polvere in 1 l di acqua distillata, sciogliere in bagnomaria per ebollizione, autoclavare a 121 °C per 15 min.
Il pH finale = 7.0 ± 0.2

I terreni **MN** e **ASN-III**, citati da Waterbury *e Coll*. (1978), sono adatti per i Cianobatteri di provenienza marina ed hanno, rispettivamente, la seguente composizione (in grammi/litro):

MN = magnesio solfato 0.04, calcio cloruro 0.02, sodio nitrato 0.75, dipotassio fosfato 0.02, acido citrico 0.003, ferro ammonio citrato ico 0.003, EDTA 0.0005, sodio carbonato 0.02, metalli tracce 0.02, acqua deionizzata ml 250, acqua marina ml 750
pH finale = 8.5

ASN-III = sodio cloruro 25, magnesio solfato 3.5, magnesio cloruro 2, potassio cloruro 0.5, calcio cloruro 0.5, sodio nitrato 0.75, dipotassio fosfato 0.02, acido citrico 0.003, ferro ammonio citrato ico 0.003, EDTA 0.0005, sodio carbonato 0.02, metalli tracce 1, acqua deionizzata ml 1000
pH finale = 7.3

Il terreno **ASW** (*Artificial Seawater*, formula *Waterlife Research Institute*, *Longford*, *Middlesex, England*) adatto per Cianobatteri marini, semi-sintetico, ha la seguente composizione (in grammi/litro):

Soluzione 1 (sali): sodio nitrato 30, sodio fosfato bibasico 1.20, potassio fosfato bibasico 1
Soluzione 2 (estratto di suolo): si ricava terriccio preferibilmente prelevato da zone non abitate (ideale il bosco deciduo) che viene passato al setaccio da 2-4 *mesh* per allontanare le impurità, quindi sospeso in un volume doppio di acqua distillata e autoclavato per 2 ore a 15 psi. Dopo raffreddamento, il supernatante va filtrato su carta da filtro Whatman no.1, distribuito in flaconi per l'uso e sterilizzato in autoclave a 121 °C per 15 minuti.

Terreno completo: tricina 0.5 g, soluzione 1 (sali) 3.75 ml, soluzione 2 (estratto di suolo) 25 ml, acqua distillata fino a 1 litro. Aggiustare il pH a 7.6 – 7.8 con HCl 1 N e autoclavare a 121 °C per 15 minuti

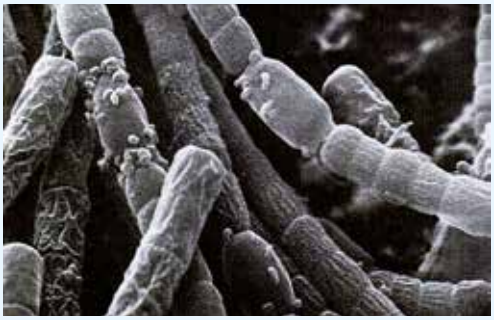
Castenholtz D Medium Modified *(ingredienti in grammi/litro)*
Terreno per Cianobatteri alofili - Composizione:

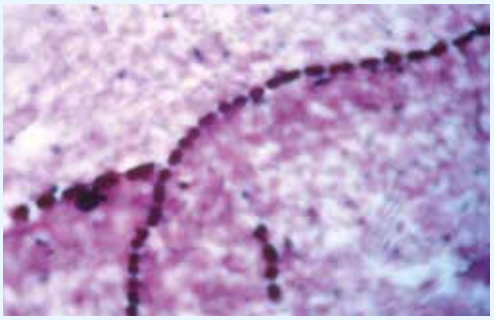
NaCl 160, sodio nitrato 0.69, sodio fosfato bibasico 0.111, potassio nitrato 0.103, magnesio solfato 0.1, acido nitriloacetico 0.1, calcio solfato 0.06, ferro cloruro 0.3, soluzione di Castenholtz (sotto riportata) di metalli in tracce 1 ml

$MnSO_4.H_2O$	2.28 g
H_3BO_3	0.5 g
$ZnSO_4.7H_2O$	0.5 g
$Co(NO_3)_2.6H_2O$	0.025 g
$CuSO_4.5H_2O$	0.025 g
$Na_2MoO_4.2H_2O$	0.025 g
H_2SO_4	0.5 ml
Distiller water to	1.0 L

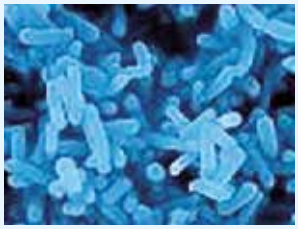
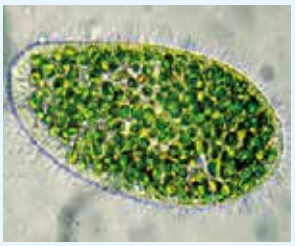
Per la preparazione, aggiungere l'acido nitriloacetico a 500 ml di acqua distillata. Sciogliere regolando il pH a 6.5 con KOH. Aggiungere gli altri ingredienti, aggiustare il pH a 7.5 ± 0.2. Portare a volume di 1 litro con acqua distillata.

È importante isolare in laboratorio colture di alghe della stessa specie, esenti da organismi contaminanti (si chiamano per questa prerogativa colture *axeniche*). Pertanto i vari metodi chiamati di "arricchimento" (basati su formule senza azoto, aggiunta di sostanze selettive, pH particolare, temperatura d'incubazione elevata, ecc) si sono rivelati preziosi per separare popolazioni miste di alghe e anche di alghe unite a batteri.
Difatti in natura si stabiliscono interazioni sorprendenti fra alghe (soprattutto le microalghe) ed i batteri planctonici ambientali (*vedi foto di situazioni di simbiosi viste al microscopio elettronico e ottico*). Alcune interazioni fra alghe planctoniche e batteri sono state accuratamente studiate e descritte da Grossart *e Coll*.(2007) e da altri Autori (Cole, 1999).





Interazioni fra alghe e batteri
(da Grossart H.P. *e Coll*., 2007; Seong K.A. *e Coll*., 2013; SAMS, 2014)

	Si ignorano a vicenda	**4 Nessuna interazione**	Si ignorano a vicenda	
	Competono con le alghe su nutrienti e fosfati	**3 Commensa-lismo**	Competono con i batteri su nutrienti e fosfati	
Batteri	Lisano le alghe (vari generi, vedi nota 1)	**2 Paras-sitismo**	Formano anti-biotici contro i batteri ❑	**Alghe**
	Offrono alle alghe composti re-mineralizzati, vitamine e siderofori che legano il ferro (*Marinobacter spp.*)	**1 Simbiosi**	Offrono ai batteri materia organica disciolta (DOM), TEP*, CSP **, DMSP***	

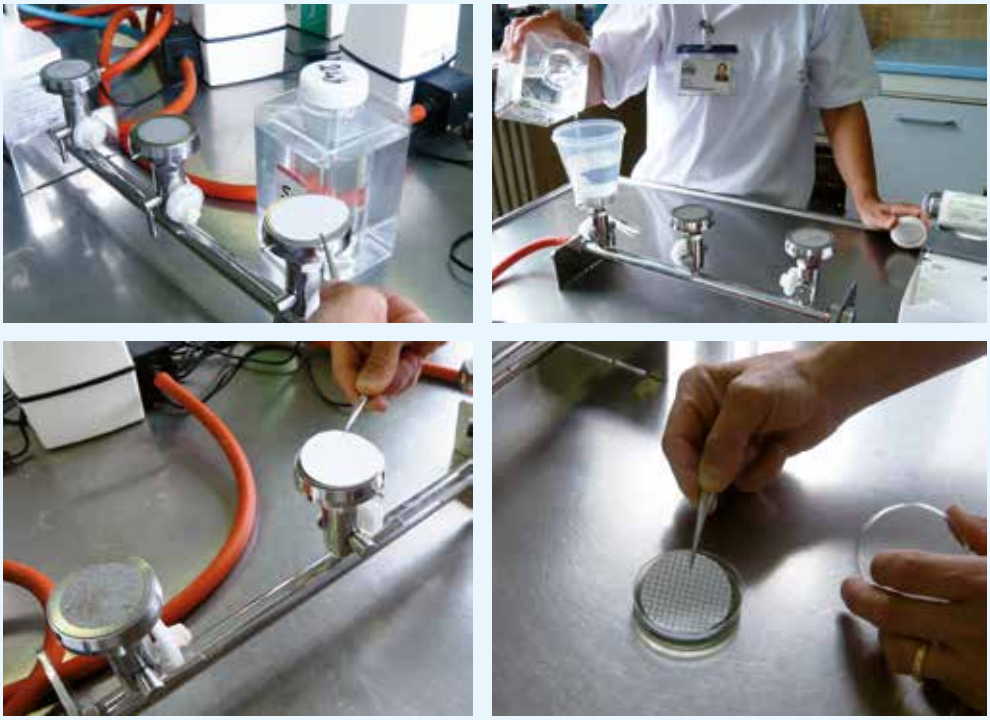
DOM = *dissolved organic matter* (favorisce l'aggregazione dei batteri e la simbiosi con le alghe)
TEP* = *transparent exopolymer particles* (sostanze contenenti principalmente carboidrati e composti del carbonio con funzioni nutritive)
CSP** = *Coomassie Blue-stainable particles* (sostanze proteiche che si colorano con il colorante specifico per le proteine Blu di Coomassie)
DMSP***= dimetil-sulfonio-propionato, composto solforato prodotto specialmente da dinoflagellati, che i batteri usano riducendolo a dimetil-solfuro (DMS)
Nota 1 = tra i generi con proprietà algicide sono da segnalare: *Micrococcus, Pseudomonas, Vibrio parahaemolyticus, Bacillus*

❑ Nuove molecole ad azione antibatterica isolate dalle alghe (Dhargalkar *e Coll*., 2009)

Alga	Sostanza	Classe
Delisea pulchra	Pulchralide, fembrolide	Furanici dimerici alogenati
P. cartilagineum	Anverene	Monoterpene alogenato
Myriogramme smithii	p-methoxyfenolo, p-methoxybenzaldeide	
D. menzesii	Menzochinone	Chinoni

I BATTERI PLANCTONICI, CHIAVE FUNZIONALE DELL'ECOSISTEMA ACQUATICO (COLE, 1999)

Il peso dei batteri planctonici nelle interazioni che avvengono all'interno dell'ecosistema acquatico è notevole. Infatti i batteri sono responsabili di una larga frazione della respirazione aerobica e per intero di quella anaerobica. Inoltre la re-mineralizzazione delle sostanze organiche avviene in gran parte per merito loro.



Metodo della filtrazione dei campioni d'acqua su membrana in estere di cellulosa: 1) posizionamento della membrana sul supporto filtrante; 2) filtrazione del campione mediante aspirazione; 3) prelievo della membrana dopo filtrazione; 4) semina della membrana sulla superficie di un terreno solido in piastra di Petri.

Nei sistemi acquatici, specialmente in quelli che accolgono materiale organico proveniente dall'esterno, la produzione di metaboliti utili realizzata dai batteri è uguale o superiore a quella fatta dalle alghe.

Va tenuto conto che, rispetto alle alghe, i batteri sono presenti nelle acque libere in concentrazioni spesso superiori e certamente notevoli (10^6/ml), anche se essi, quando vengono contati sui terreni in laboratorio, risultano inferiori di numero.

Difatti, in passato con i metodi colturali le concentrazioni venivano sottostimate (con valori ridotti fino a 10^2 – 10^3 cellule/ml di acqua), in quanto i batteri risultavano parzialmente "dormienti".

Solo con tecniche più sofisticate è stato possibile accertare la reale quantità dei batteri presenti, adottando, ad esempio, una delle seguenti metodiche:

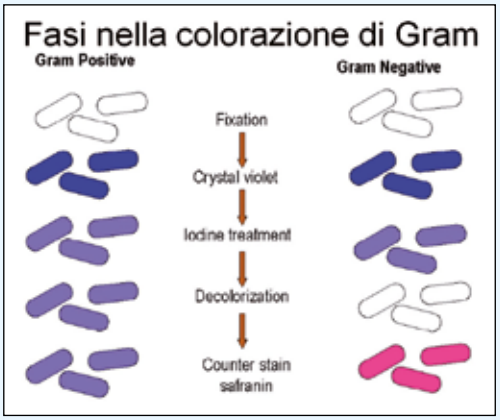
- filtrazione dei campioni d'acqua su membrana in estere di cellulosa (porosità 0.45 μm) e successiva semina della stessa su terreno agarizzato;
- esami microscopici in epifluorescenza, che rende altamente visibili i batteri, grazie al legame che si crea fra il colorante arancio d'acridina e il DNA (o RNA) batterico. Il DNA si colora in giallo-verde, l'RNA in rosso-arancio.

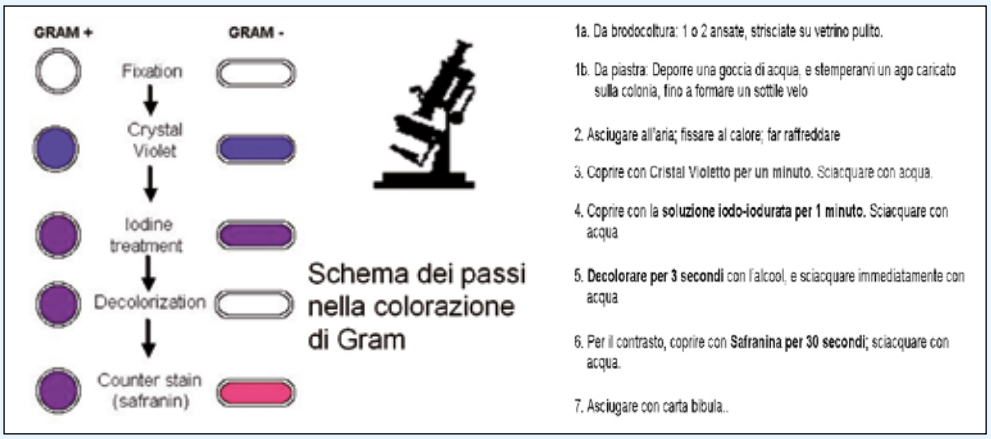
COLORAZIONI

Le colture possono essere esaminate con un microscopio stereoscopico a basso ingrandimento (da 100 a 400 x).

Successivamente dalle colture su terreno solido in piastra di Petri o in provetta è consuetudine allestire dei preparati, trasferendo con l'ansa una piccola porzione di materiale colturale entro una goccia di soluzione fisiologica sterile (o PBS) posta su un vetrino porta-oggetti.

Il preparato a fresco così ottenuto va protetto posizionando sopra la goccia un vetrino copri-oggetti.



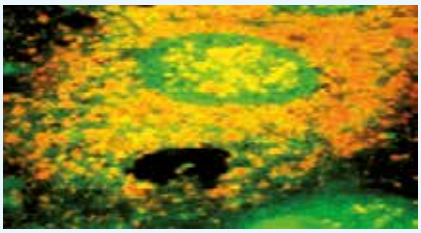


Dalle colture di microalghe si possono fare anche degli strisci su vetrini che, fissati alla fiamma del *Bunsen*, danno luogo a preparati colorabili col metodo di *Gram*.

Colorazione con arancio d'acridina

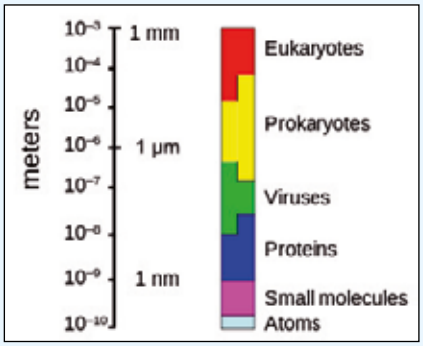
MATERIALE

Soluzione di fissaggio dei preparati: miscela di acido acetico-etanolo 1:3
Soluzione colorante fluorescente: arancio d'acridina allo 0,05 % in acqua distillata con pH aggiustato a 1.5 – 3.5 con HCl 1 N
PBS (*Phosphate Buffered Saline*): sodio cloruro 10 g, potassio cloruro 0.250 g, potassio fosfato monobasico 0.250 g, sodio fosfato bibasico biidrato 1.755 g, acqua distillata 1000 ml
pH finale = 7.4 ± 0.2
Sterilizzare in autoclave a 121 °C per 20 minuti



METODO

Allestire lo striscio da colorare e lasciarlo asciugare all'aria. Fissarlo coprendolo con soluzione di fissaggio per 30 minuti a temperatura ambiente.
Applicare il colorante per 30 minuti a temperatura ambiente. Lavare due volte con PBS. Far asciugare su carta assorbente nuova e osservare al microscopio a campo oscuro e luce ultravioletta con obiettivo ad immersione d'ingrandimento 40x



BIBLIOGRAFIA

Pubblicazioni scientifiche

1) Allen M.M. *e Coll.*, Selective isolation of blue-green algae from water and soil, J. gen. Microbiol. 1968, *51*, 203-209.
2) Bano A. *e Coll.*, Characterization of five cyanobacterial species with respect to their pH and salinity requirements, Pak. J. Bot. 2004, *36*, 133-143.
3) Barbato F. *e Coll.*, Sfruttamento delle microalghe: tra realtà e prospettive, 2012,19-28.
4) Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 9th edition, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, USA, 1993.
5) Cole J.J., Aquatic microbiology for ecosystem scientists: new and recycled paradigms in ecological microbiology, Ecosysyems 1999, *2*, 215-225.
6) Dhargalkar V.K. *e Coll.*, Southern Ocean seaveeds: a resource for exploration in food and drugs, Aquaculture 2009, *287*, 229.242.
7) Food Standard Agency Buidheann-Bidhe, End-Products Testing for Shellfish Toxins, Information for Shellfish Harvesters, Growers and Processors.
8) Grossart H.P. *e Coll.*, Interactions of planktonic algae and bacteria: effects on algal growth and organic matter dynamics, Aquatic Microbial Ecology 2007, *47*, 163 -176.
9) Kratz W.A. *e Coll.*, Nutrition and growth of several blue-algae, Am. J. Bot. 1955, *42*, 282.
10) Paeri H.V., Harmful cyanobacterial blooms: causes, consequences, and controls, Microb. Ecol. 2013, DOI 10.1007/s00248-012-0159-y.
11) Pathade K.N. *e Coll.*, Influence on modified BG-11 medium on growth of *Kirchnerella subsolitaris*, Mutilogic in Science 2012, *2*, 40-44.
12) Peary J.A. *e* Castenholz R.W., Temperature strains of a thermophilic blue-green alga, Nature Lond. 1964, *202*, 720.
13) Perez G. *e Coll.*, Differential response to moderate UV-B irradiation of two heterocystous Cyanobacteria isolated from a temperate ricefield, Advances in Microbiol. 2012, *2*, 37-47.
14) Poletti R. , Milandri A., Pompei M., Algal Biotoxins of Marine Origin: New Indications from the European Union, Vet. Res. Com. 2003, *27 suppl.1*, 173-182.
15) Regolamento (UE) n. 15/2011 della Commissione del 10 gennaio 2011 che modifica il regolamento (CE) n. 2074/2005 per quanto riguarda i metodi di analisi riconosciuti per la rilevazione delle biotossine marine nei molluschi bivalvi vivi, Gazzetta Ufficiale dell'Unione Europea, 11.1.2011, 6/3 – 6/5.
16) Santegoeds C.M. *e Coll.*, Denaturing gradient gel electrophoresis used to monitor the enrichment culture of aerobic chemoorganotrophic bacteria from a hot spring Cyanobacteria mat, Appl. Environm. Microbiol. 1998, *62*, 3922-3928.
17) Seong K.A. *e Coll.*, Interactions between marine bacteria and red tide organisms in korean waters, Algae 2013, 28, 297-315.
18) Tang E.P.Y., Tremblay R., Warwick F.V., Cyanobacterial dominance of polar freshwater ecosystems: are high latitude mat-formers adapted to low temperature, J. Phycol. 1997, *33*, 171-181.
19) UNI EN 15204, Qualità dell'acqua – Norma guida per la conta di fitoplancton utilizzando la microscopia inversa (tecnica di Utermhöl), UNI Ente Italiano di Unificazione, Milano, dicembre 2006.
20) Vaara T. *e Coll.*, Two improved methods for obtaining axenic cultures of Cyanobacteria, Appl. Environm. Micr. 1979, *38*, 1011-1014.
21) Valdiglesias V. *e Coll.*, Okadaic acid: more than a diarrheic toxin, Mar. Drugs 2013, 4328-4349; doi: 10.3390/md 11114328.
22) Waterbury J.B. *e Coll.*, Patterns of growth and development in pleurocapsalean Cyanobacteria, Microbiol Rew. 1978, *42*, 2-44.

Siti Internet consultati

1) http://microbiology .ucdavis.edu/meeks/BG11 medium.html, 2014, Composition of BG-11 Medium for Algae and Protozoa
2) http://www.epicentro.iss.it/problemi/alghe/alghe.asp, Alghe tossiche: la diffusione del fenomeno, modalità di intossicazione e sintomi, prevenzione e trattamento
3) SARS (Scottish Marine Institute Oban, Argyll, England) www.sams.ac.uk
4) Ward's Natural Science, Working with algae and cyanobacteria, Rochester, New York, 2002, www.ccap.ac.uk

Fonti informative sull' uso dei *kit* diagnostici per le biotossine algali
(da Food Standards Agency [food.gov.uk])

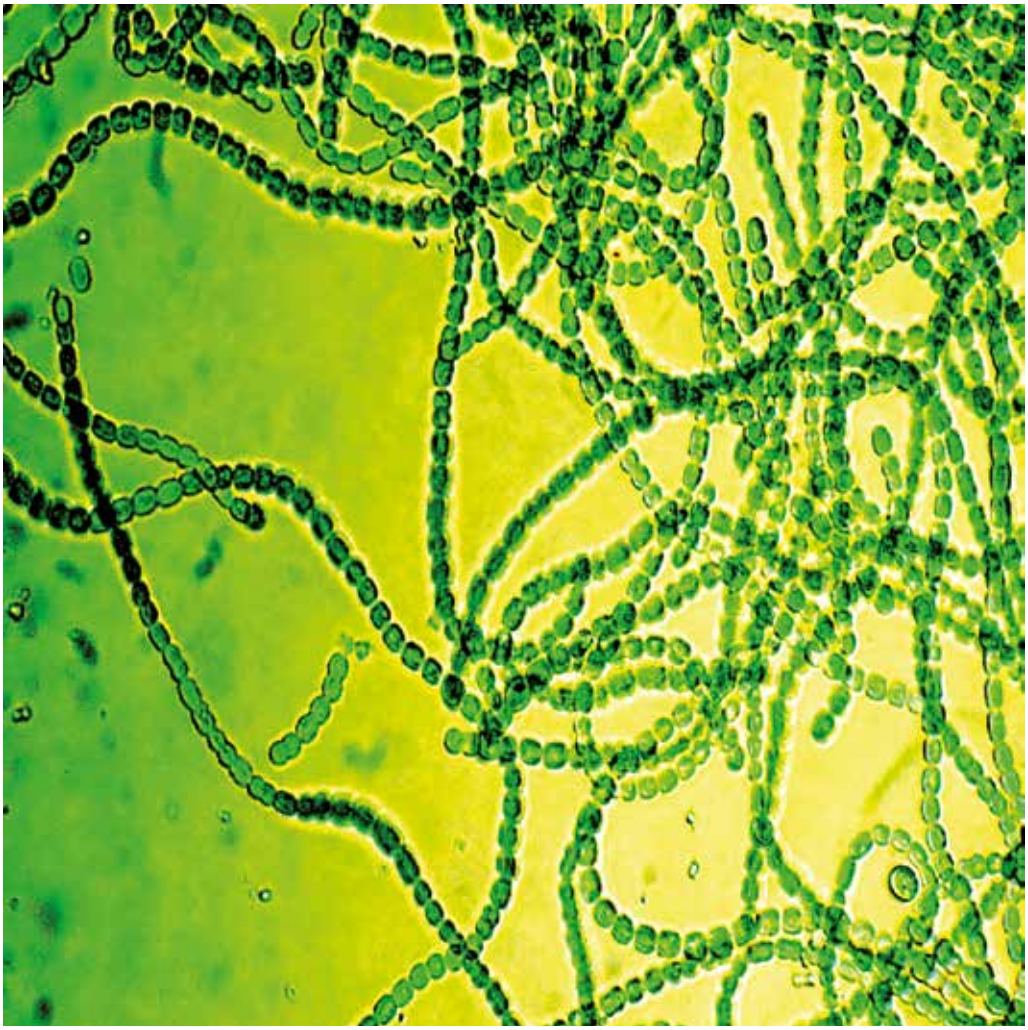
NOME *KIT*	PRODUTTORE	FONTE INFORMATIVA
Ridascreen®	R-BIOPHARM GmbH, Darmstadt, Germany	www.r.biopharm.com
Jellet Rapid Test®	Jellet Ltd, Chester Basin, Canada	www.jellet.ca
SAXITEST®	ZEULAB, Zaragoza, Spain	www.zeulab.com
DOMOTEST®		
OKATEST®		
MICROCYSTEST KIT®		
DSP CHECK®	UBE, Tokyo, Japan	ube.ind.co.jp
ANTI-OKADAIC ACID ELISA KIT® ROUGIER	BIO-TECH, Val Molin, Canada	www.biotech.ca
SCETI K.K. DSP RAPID KIT®	SCETI, Okinawa, Japan	www.sceti.co.jp
MICROTOX®	AZUR Environmental, Melbourne, Australia	www.azurenvironmental.com

Collections of Algal Cultures
www.phycology.net

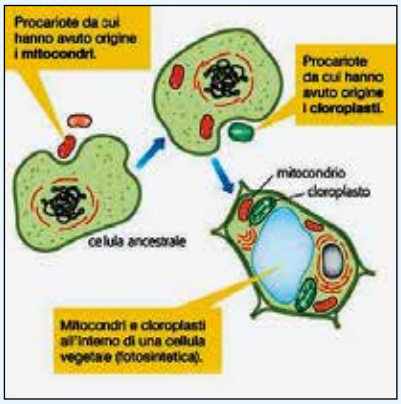
Multidisciplinary Commission of the International Union of Biological Sciences (IUBS)
WFCC World Federation for Culture Collections
WFCC-MIRCEN WDCM World Data Centre for Microorganisms
United Nations Environment Programme MSDN Microbial Strain Data Network
European Culture Collections' Organisation ECCO
Academy of Sciences of the Czech Republic, Institute of Botany (CCALA)
Czech Collection of Algae and Cyanobacteria (listing)
American Type Culture Collection, VA (ATCC)
American Type Culture Collection (database)
Centre for Ecology and Hydrology (CCAP) Culture Collection of Algae and Protozoa (database)
Chinese Academy of Sciences, Culture Collection Committee (CTCCCAS)
Freshwater Algae Culture Collection (listing)
CSIRO, Marine research (CS) CSIRO Collection of Living Microalgae (database)
Charles University Prague, Department of Botany (CAUP)
Collection of Algae of Charles University Prague (listing)
Duke University, Chlamydomonas Genetics Center (CGC)
Chlamydomonas Genetics Center Collection (listing)
Institut Pasteur, Paris (PCC) Pasteur Culture Collection of Cyanobacteria (listing)
Loras College, Iowa, USA The Loras College Freshwater Diatom Culture Collection (listing)
Thailand Network on Culture Collections (TNCC)
BIOTEC Culture Collection (database)
National Institute for Environmental Studies, Japan (NIES)
Microbial Culture Collection (listing)
Philipps-University Marburg, Department of Cell Biology and Applied Botany (CCAM)
Culture Collection of Algae Marburg (listing)
Provasoli-Guillard National Center for Culture of Marine Phytoplankton, ME (CCMP)

Provasoli-Guillard National Center for Culture of Marine Phytoplankton
Station Biologique Roscoff, Phytoplancton (RCC)
Roscoff Culture Collection of Marine Phytoplancton (listing)
University of British Columbia, Department of Botany (CCCM)
Canadian Center for the Culture of Microorganisms (listing)
University of Caen Basse, Laboratoire de Biologie et Biotechnologies Marines (ALGOBANK)
Algobank (database)
University of Coimbra, Department of Botany (ACOI)
Coimbra Collection of Algae (listing)
University of Cologne, Institute of Botany (CCAC)
Culture Collection of Algae at the University of Cologne (database)
University of Göttingen, Sammlung von Algenkulturen (SAG)
Culture Collection of Algae at the University of Göttingen (database)
University of Hamburg, Institute of General Botany (SVCK)
Culture Collection of Conjugatophyceae (listing)
University of Texas at Austin, School of Biological Sciences (UTEX)
Culture Collection of Algae at the University of Texas at Austin (listing)
University of Toronto, Department of Botany (UTCC)
University of Toronto Culture Collection of Algae and Cyanobacteria (listing)

OSSERVAZIONI PERSONALI SUI CIANOBATTERI



Nella pagina precedente: *preparato a fresco di* Nostoc muscorum *esaminato al microscopio con 400 ingrandimenti*.



PREMESSA

L'origine antichissima dei Cianobatteri, le loro caratteristiche biologiche uniche (vedi: Ai confini delle microbiologia, parte seconda), i lavori pubblicati assai coinvolgenti sono tre buoni motivi per studiare dal vivo questi abitanti del mare.

Magari in un'esperienza di laboratorio che fin dall'inizio prometteva, oltre alla coltura *in vitro*, la realizzazione di materiale fotografico originale.

Questi obiettivi sono stati raggiunti ottenendo dall' Università di Austin (Texas, USA) due ceppi di microalghe "rappresentativi", appartenenti alle specie *Oscillatoria brevis* (codice B1567) e *Nostoc muscorum* (codice B2209), così classificati dalla UTEX *Culture Collection of Algae* della stessa Università.

Alghe Oscillatoria *nel loro ambiente naturale e fotografate al microscopio a 400 ingrandimenti dopo coltivazione in laboratorio su terreno sintetico.*

"La scelta di prendere come campione fra i Cianobatteri le microalghe Oscillatoria e Nostoc è stata suggerita dalle differenze morfologiche e colturali fra le due specie, che prospettavano opportunità diverse di osservazione senza perdere la visione di caratteristiche di altri generi affini" (m.z.).

COLTURE

Su terreno solido BG-11 Agar le microalghe dei generi *Oscillatoria* e *Nostoc* sviluppano con colonie piatte, di forma irregolare, a margini frastagliati, pigmentate, che confluiscono in una patina aderente al substrato. Le colonie mostrano un centro più denso verde scuro, mentre la zona periferica ha lo stesso colore, ma più chiaro, con sfumature blu-verdi.

Piastre di terreno BG-11 Agar con sviluppo di Oscillatoria brevis *(a sinistra) e* Nostoc muscorum *(a destra).*

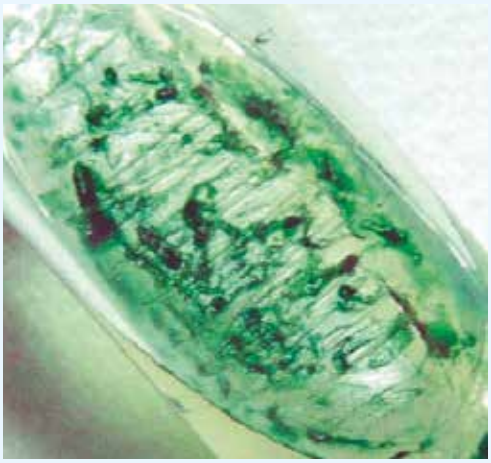
L'aspetto delle colture di microalghe su terreni solidi è variabile da umido (*Nostoc*) a secco (*Oscillatoria*), mentre il colore assume un tono sempre più intenso di verde dai riflessi bluastri con il procedere dell'incubazione (*blue-green algae*).

Particolare ingrandito delle colonie di Oscillatoria brevis *su terreno solido BG-11 Agar in provetta dopo 10 gg. d'incubazione a +20 °C.*

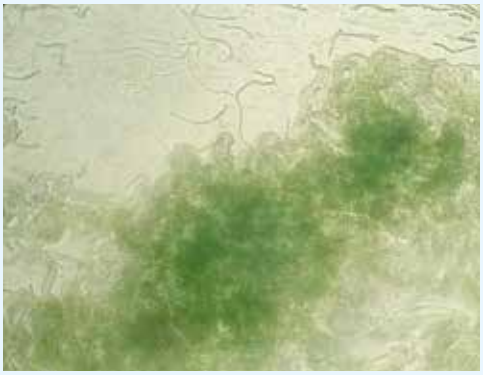
Colture di microalghe su terreno BG-11 Agar: a sinistra Oscillatoria, *a destra* Nostoc.

Lo sviluppo della coltura diventa apprezzabile dopo almeno 10 giorni d'incubazione a temperatura di +20 °C con illuminazione artificiale continua, sia in provette (con tappo parzialmente svitato per assicurare passaggio di aria) che su piastre di Petri.

L'incubazione delle colture in termostato a +30 °C, con illuminazione continua a luce fluorescente, accorcia notevolmente il tempo di sviluppo delle colonie.

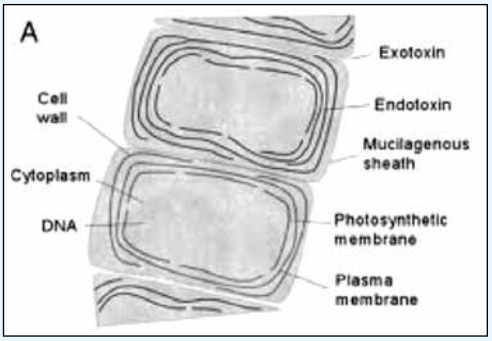


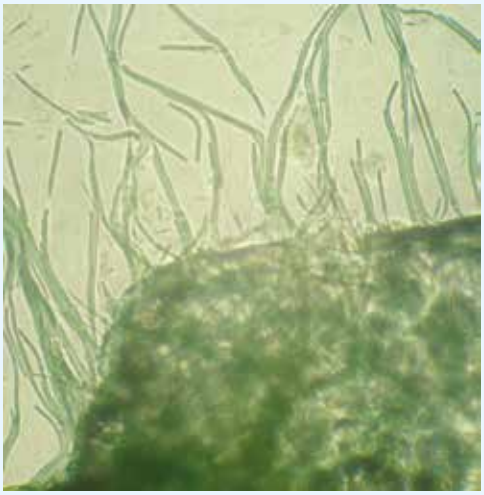
Particolare ingrandito delle colonie di Nostoc muscorum *su terreno solido BG-11 Agar in provetta dopo 10 gg. d'incubazione a +20 °C.*



Vista a maggior ingrandimento (200x), la coltura di Nostoc muscorum *su mezzo solido in PIASTRA appare formata da colonie ravvicinate di colore più scuro e dai contorni sfumati, circondate da numerose cellule batteriche sparse sulla superficie del terreno.*

Osservando a maggior ingrandimento il bordo delle colonie di microalghe coltivate in piastra, si possono notare alcuni particolari differenziali.



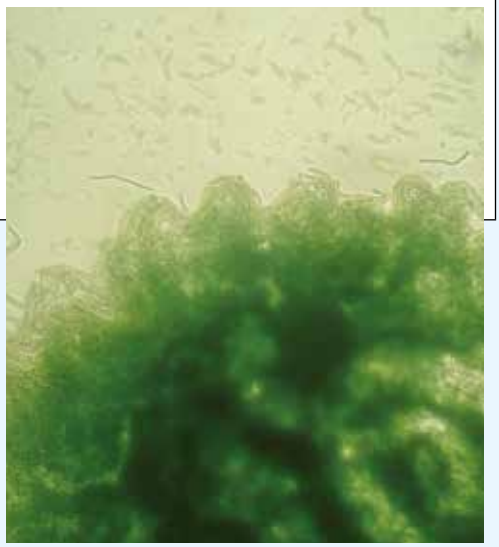


In *Oscillatoria brevis* il margine della colonia appare netto e ricco di filamenti composti da cellule allineate (*tricomi*) che si prolungano verso l'esterno.

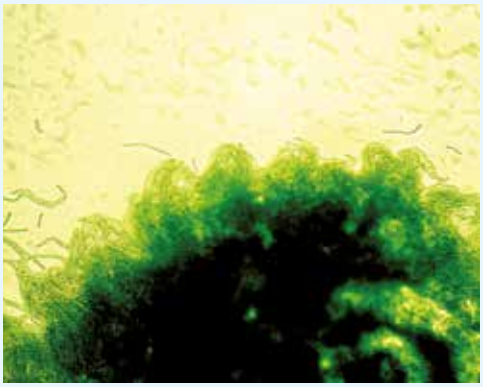
In *Nostoc muscorum*, viceversa, la struttura della colonia appare più compatta e il bordo è frastagliato.

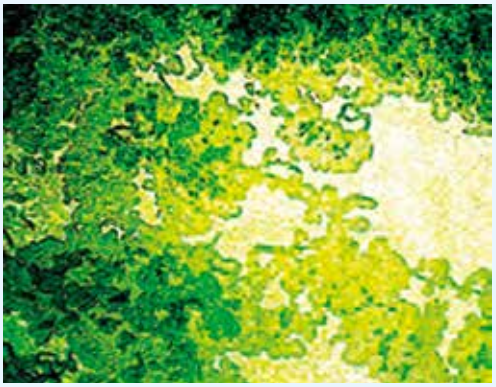
In terreno liquido (BG-11 Broth) le microalghe sviluppano inizialmente in profondità, formando un sedimento che assume contorni e dimensioni diverse. Nel caso di *Oscillatoria brevis* si produce un ammasso di cellule somiglianti ad un "*filo d'erba*" verde, che si allunga in entrambe le direzioni col procedere dell'incubazione, fino a produrre una specie di "*foglia*". *Nostoc muscorum*, invece, crea un "*fiocco*" dall'aspetto vaporoso che si solleva facilmente, disperdendo nel liquido di coltura le cellule che lo compongono.

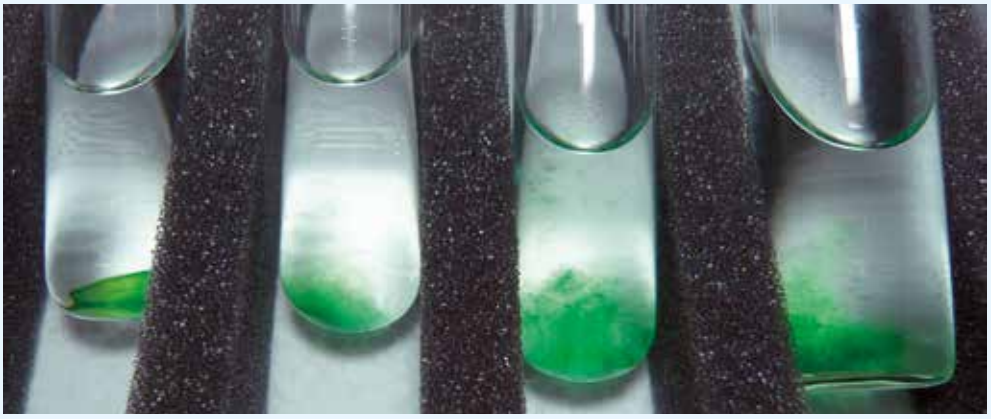
L'illuminazione continua (24/24 ore) delle colture in termostato è stata garantita da una lampada a luce bianca fredda fluorescente da 13 W, comunemente usata per la crescita delle piante acquatiche, collocata a una distanza media di 20 cm da piastre e provette.



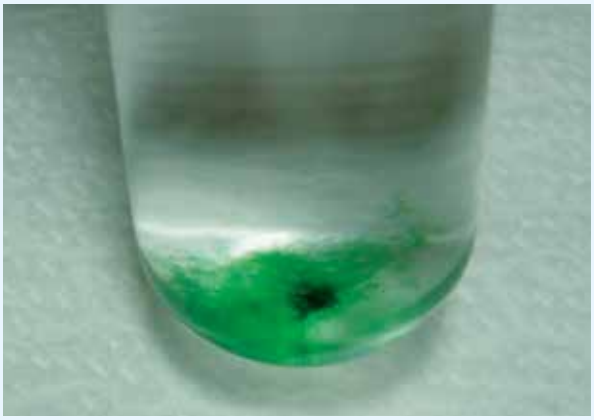
Essendo fornite di proprietà fotosintetiche, seguite da produzione di clorofilla-a, queste microalghe, in coltura su mezzo solido, appaiono fluorescenti (colore giallo sul bordo delle colonie). Nelle foto, realizzate al microscopio con 100 ingrandimenti, sono illustrati due aspetti delle colonie di *Nostoc muscorum*, coltivate su BG-11 Agar in piastre di Petri, dopo 20 giorni d'incubazione a +25 °C con illuminazione continua.







Colture in terreno liquido a confronto: a sinistra, due provette di Oscillatoria brevis, *a destra due provette di* Nostoc muscorum, *incubate per 15 gg. a +20 °C in Brodo BG-11.*



A destra: Oscillatoria brevis, *a sinistra* Nostoc muscorum – *Colture incubate per 10 gg. a +20 °C in terreno liquido (Brodo BG-11).*

Nostoc muscorum a maggior ingrandimento.

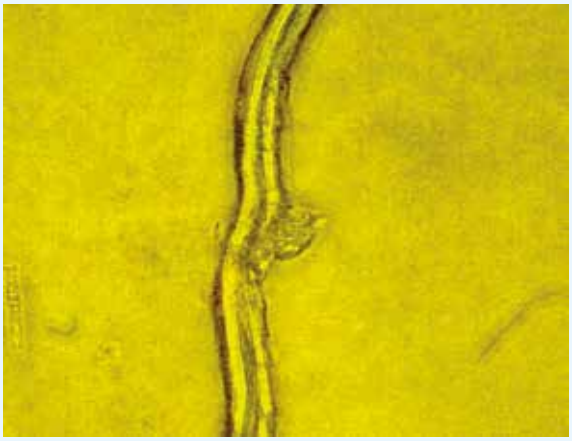
Coltura incubata per 10 gg. a +20 °C in terreno liquido (Brodo BG-11).
Le colonie sviluppano mostrando una zona centrale più densa e intensamente pigmentata ed una fascia periferica meno marcata e dai contorni irregolarmente sfumati.

PREPARATI MICROSCOPICI

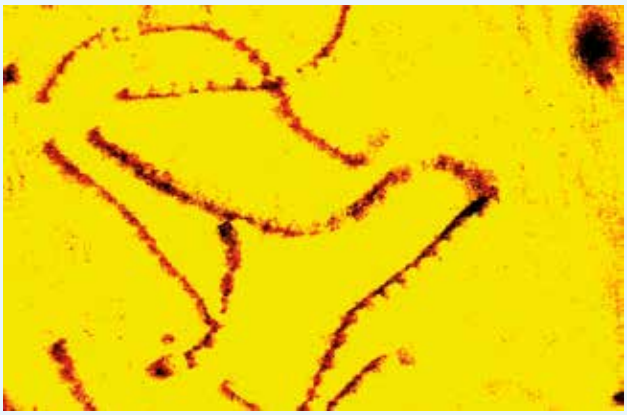
Dopo allestimento di preparati a fresco, realizzati per striscio su vetrino con soluzione fisiologica 0,85% NaCl e copri-oggetto, le colture sviluppate su BG-11 Agar appaiono al microscopio formate da agglomerati di cellule che assomigliano ad ife fungine (immagine a lato: *Oscilatoria brevis*).

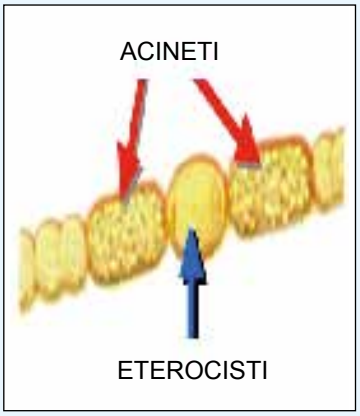
In *Nostoc muscorum* le cellule si dispongono a formare lunghe catene, la cui parte terminale può mostrare una zona di riproduzione. Un più attento esame della struttura cellulare di questa specie rivela che le cellule, disposte in lunghi filamenti, sono in realtà formate da elementi segmentati e uniti a "*corona di rosario*" dall'aspetto estremamente elegante.

Oscillatoria brevis. *Preparato microscopico a fresco da Agar coltura (200x).*



A sinistra: immagine al microscopio di alga Oscillatoria brevis*, coltivata su piastra di terreno BG-11 Agar per 20 giorni a +30 °C, che mostra una zona di riproduzione. A destra, una colonia di* Nostoc muscorum*, coltivato su terreno solido (ingrandimento = 400x)*





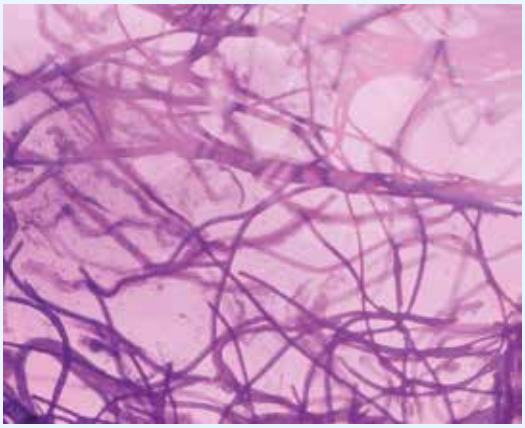
Nostoc muscorum *da coltura su terreno solido in un preparato a fresco osservato al microscopio in contrasto di fase (200 ingrandimenti), Sono messe in evidenza le eterocisti.*

Sebbene nella maggior parte dei casi non sia necessario procedere a colorazioni per osservare al microscopio i Cianobatteri (in quanto è sufficiente l'esame a fresco su vetrino), è possibile eseguire, come per i batteri tradizionali, il fissaggio del preparato alla fiamma e la colorazione con il metodo di Gram.

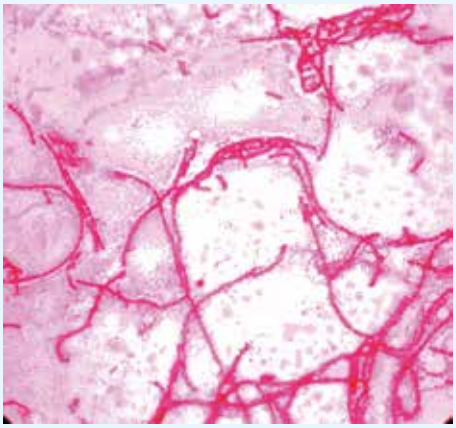
Parecchi Autori preferiscono esaminare le microalghe al microscopio in contrasto di fase, sia nel caso di campioni raccolti nell'ambiente che di ceppi isolati in colture sviluppate in laboratorio.

La visione è ritenuta più completa, in quanto è possibile con questa tecnica apprezzare meglio i particolari, comprese le fasi di riproduzione.

Inoltre non sono necessarie colorazioni, dal momento che le cellule algali si distinguono facilmente dal materiale eterogeneo estraneo eventualmente presente nel preparato.



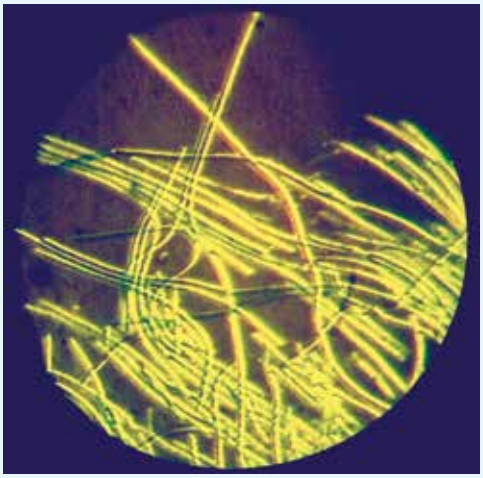
Oscillatoria brevis – *Preparato microscopico da terreno BG-11 Agar – Colorazione di Gram (ingrandimento 400x).*



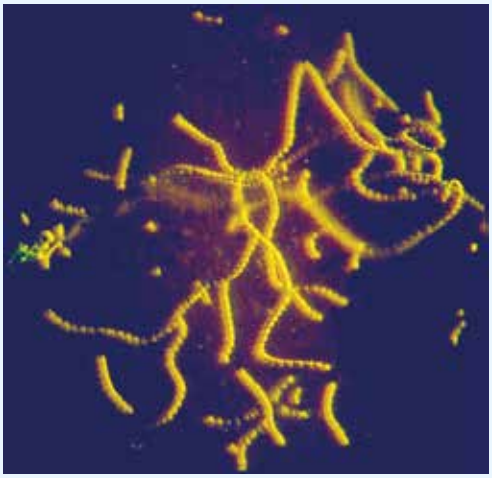
Nostoc muscorum - *Preparato microscopico da terreno BG-11 Agar – Colorazione di Gram (ingrandimento 400x).*

Le foto mostrano le specie *Nostoc* e *Oscillatoria* coltivate per un mese su terreno solido (BG-11 Agar), dopo allestimento di preparati a fresco su vetrino con copri-oggetto. La patina colturale era stata sospesa nello stesso tipo di terreno, ma nella formulazione liquida.

La lettura dei vetrini è stata fatta con microscopio a contrasto di fase e campo oscuro (Leitz SM-Lux), usando un obiettivo 40x e oculari 10x. Il condensatore, parzialmente abbassato, ha permesso in questo caso di ottenere un' immagine pressoché tridimensionale dell'oggetto, con buona definizione dei particolari.



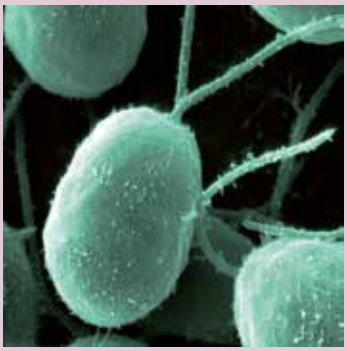
Oscillatoria brevis *(contrasto di fase+campo oscuro).*



Nostoc muscorum *(contrasto di fase+campo oscuro).*

AGATA E LE ALGHE MISTERIOSE
di Alice Cardoso e Sandra Serra, Macro Junior editore, 2013.

Agata e le altre ninfe giocano spensierate sulle rive di un **lago** cristallino, mentre i ranocchi vi si tuffano per mangiare le piccole alghe.
Ma arriva la stagione delle piogge e Agata si accorge che qualcosa di strano e minaccioso, cresciuto sul fondo del lago, fa scomparire i pesci, togliendo loro le forze!
Sono misteriose **alghe,** di colore e forma mai visti prima, divenute tossiche per l'inquinamento. Agata e la regina delle ninfe scoprono che, purtroppo, ancora una volta la loro serenità è messa in pericolo dai **residui chimici** dei fertilizzanti dispersi dall'uomo e che la pioggia ha trasportato nelle acque del lago…



Per ripulire dai veleni inquinanti il lago (Erie, negli USA)

con un intervento di ingegneria genetica, gli scienziati dell'Ohio State University nel 2005 hanno modificato il DNA di una fra le alghe del lago***, in modo da farle produrre una proteina che lega i metalli pesanti.***
Oggi *Chlamydomonas reinhardtii****, è capace di assorbire nelle acque fino al 20% del suo peso di residui chimici, distruggendoli definitivamente*** *(Heavy metal bioremediation using genetically altered biomass,ohioseagrant.osu.edu/research/biotechnology/?ID=R/BT-006).*

APPENDICE

Le alghe in cucina

Ricette tratte da:
“Mangiare con le alghe”
(da www.celtnet.org.uk, traduzione di Silvana Bianchini Rangozzi)

Le alghe si trovano in commercio concentrate e si possono combinare con molti alimenti, ad esempio come contorno delle pietanze abituali oppure sotto forma di insalate, zuppe, piatti a base di verdure o legumi, ecc.

Di solito sono confezionate essiccate ed hanno l'aspetto di foglie, barrette o polvere; in ogni caso vanno usate in piccole quantità (5-10 grammi a persona), poiché una volta bagnate in acqua possono aumentare più di dieci volte il loro volume.

Alcune avvertenze da seguire nelle preparazioni in cucina:

Wakame – Immergere 30 grammi di *Wakame* secco in abbondante acqua per circa mezz' ora. Rimuovere poi le alghe bagnate, riporle su un tagliere con il gambo rivolto verso l'alto, tagliare le foglie ed eliminare il gambo. Tritare le foglie in bocconcini e immergerle in acqua bollente per rivitalizzare il loro colore prima dell'uso.

Kombu – La dose è di una striscia di alga per 4 persone. Si bagnano in acqua tiepida e si mettono nei passati di verdura o di legumi, dei quali facilitano la cottura e la digestione.

Dulse – Vanno messe a bagno per eliminare eventuali micro-molluschi; poi si strizzano le foglie e si tagliano.

Nori – Serve prevalentemente per il *sushi* e in polvere per condire il riso. Vendute in fogli per preparare i *maki-sushi*, mentre cruda, tagliata a striscioline, si usa al posto del sale per le insalate, la pasta e i cereali.

Hijiki – Bollita, marinata, in salsa di soia, per avvolgere il *sushi*. Si acquistano essiccate e si fanno rinvenire in acqua tiepida. Hanno un gusto intenso, si saltano in padella o si utilizzano per insaporire le minestre vegetali.

Spirulina – Si consuma in polvere aggiunta a succhi, yogurt e centrifugati di verdura.

Agar-Agar – (come addensante) Si pesano 2 g di agar in polvere, da aggiungere a 1/2 litro di acqua o altro liquido; la sospensione, stemperata a freddo, va portata ad ebollizione e mescolata per alcuni minuti a fuoco lento in bagnomaria. La gelificazione avviene durante il raffreddamento, prima a temperatura ambiente, poi in frigorifero.

Ingredienti

- 25 g di alga *Dulse* secca;
- 1 litro di brodo di pollo;
- 100 g di alga *Laver* (= Nori);
- 30 g di lattuga di mare fresca;
- 2 uova sbattute;
- sale e pepe nero per insaporire;
- ½ cucchiaio d' olio di semi di sesamo;
- 100 g di alga *Gutweed* (= Ulva o Enteromorpha) croccante fritta.

Zuppa di alghe *(Seaweed soup)*

Preparazione

Mettere l'alga *Dulse* in una larga ciotola d'acqua e reidratarla per 10 minuti circa.

Scolare quindi l'alga e porla in una casseruola con un po' d'acqua, sufficiente a coprirla.

Portare a bollore e continuare la bollitura per 10 minuti circa, aggiungendo acqua se necessario.

Scolarla e farla raffreddare un po' prima di sminuzzarla finemente e metterla da parte.

Aggiungere il brodo di pollo in una larga padella con la *Laver*.

Ridurre a fuoco lento, coprire e cuocere per 90 minuti o finché la *Laver* è tenera.

A questo punto, aggiungere la lattuga di mare e la *Dulse* e riportare a bollore, cuocendo poi a fuoco lento per pochi minuti.

Prendere un mestolo di brodo e mescolarlo alle uova sbattute, amalgamando bene e vigorosamente per incorporarle, quindi rimuovere dal fuoco.

Insaporire il gusto aggiungendo l'olio di semi di sesamo, servire in coppe calde e guarnire con il *Gutweed* fritto e croccante.

Ingredienti

- 3 cucchiaini d'olio d'oliva;
- 1 cipolla media tritata;
- 3 spicchi di aglio tritato;
- 1 pizzico di timo;
- 1 pizzico di rosmarino;
- 200 g di riso Arborio;
- 2 noci di burro;
- 1 litro e ½ di brodo vegetale;
- 150 g di lattuga di mare;
- 30 g di parmigiano grattugiato fresco;
- 10 g di lattuga di mare secca.

Risotto alla lattuga di mare

(Sea lettuce risotto)

Preparazione

In una padella soffriggere dolcemente cipolla e aglio in olio d'oliva (senza far prendere troppo colore).

Aggiungere le erbe aromatiche, il riso e una noce di burro.

Agitare o mescolare in modo da coprire bene con l'olio tutti i chicchi di riso.

Quando il riso è translucido, versare tutto il brodo in un colpo solo e farli assorbire completamente (10 minuti circa).

Tritare grossolanamente la lattuga di mare e mescolarla al risotto.

Lasciar cuocere per altri due minuti, quindi aggiungere il brodo necessario per riscaldare accuratamente il piatto.

Insaporire con sale e pepe, aggiungere infine il parmigiano grattugiato e la noce di burro per mantecare. Servire subito.

Ingredienti

- 25 g di alga *Dulse* secca;
- 110 g di burro sciolto e raffreddato;
- 1 carota grossa grattugiata;
- 4 uova;
- 50 g di zucchero semolato;
- 250 g di farina bianca setacciata;
- 1 cucchiaio e ½ di polvere lievitante.

Pane alla dulse *(Dulse bread)*

Preparazione

Tritare finemente l'alga *Dulse* in un robot da cucina, quindi metterla in una coppa e versarvi acqua fredda sufficiente a coprirla.

Lasciar inzuppare bene per 10 minuti; quindi, trascorso il tempo, asciugare la *Dulse* e formare un panetto asciutto.

Ungere di burro una teglia per pane.

Versare il resto del burro sciolto in una coppa e aggiungere le uova, la *Dulse*, la carota grattugiata, lo zucchero e il sale.

Sbattere bene per amalgamare, quindi, gradualmente, incorporare la farina e il lievito.

Versare l'impasto nella teglia già preparata e mettere in forno pre-riscaldato a +140 °C per circa 45 minuti o fino a che, infilando uno stecchino centralmente, non esca asciutto e pulito.

Lasciare raffreddare nella teglia per circa 5 minuti prima di porlo su una rastrelliera per far raffreddare completamente.

Infine tagliare a fette e servire.

È ottimo con il the o come pane per accompagnare le zuppe.

Ingredienti

- 300 g di riso bianco;
- qualche striscia di alga *Kombu* secca (o per un gusto intenso di *Laminaria digitata* o di *Saccharina latissima*).

Risotto con Kombu *(Rice with Kombu)*

Preparazione

Inzuppare l'alga *Kombu* seccca (o le alghe alternative negli ingredienti) in una coppa di acqua per circa 10 minuti o finché non è morbida, quindi scolarla e asciugarla.

Lavare accuratamente il riso, quindi scolarlo (questo permette di togliere l'eccesso di amido).

Mettere la *Kombu* in una casseruola e metterci sopra il riso.

Aggiungere acqua fino a coprirlo completamente e cuocere con coperchio a fuoco basso finché il riso non è cotto (circa 40 minuti).

Ingredienti

Per 18-20 pezzi

- 300 g di farina;
- 1 lievito di birra;
- sale q.b.;
- 300-350 ml di acqua;
- 1 piatto di alghe;
- olio per friggere.

Zeppoline al sapore di mare*

Preparazione

Lavare più volte le alghe marine e poi lasciarle in acqua per almeno 12 ore. Sgocciolare bene e tagliare a striscioline.

In una zuppiera disporre la farina a fontana, versarvi il lievito sciolto in un po' d'acqua tiepida, salare e cominciare a lavorare delicatamente, aggiungendo man mano il resto dell'acqua (sempre tiepida) finché l'impasto non sarà compatto, liscio e morbido.

Lasciar lievitare l'impasto mantenuto coperto con uno strofinaccio pulito per 1-2 ore, fino ad ottenere un raddoppio di volume.

Mescolare delicatamente la pastella alle alghe marine.

Scaldare abbondante olio di semi in una padella, friggere l'impasto versandolo nell'olio a cucchiaiate. Cuocere in modo uniforme le zeppoline e poi passarle su carta assorbente una volta dorate.

Salare leggermente e servire il piatto ancora caldo.

** Zeppoline napoletane fritte, da http://ambrosiaenettare.blogspot.it/, traduzione di Giuseppe Arcangeli.*

Nella stessa collana sono stati pubblicati i seguenti volumi:

1 - 1979 Infezioni respiratorie del bovino
2 - 1980 L'oggi e il domani della sulfamidoterapia veterinaria
3 - 1980 Ormoni della riproduzione e Medicina Veterinaria
4 - 1980 Gli antibiotici nella pratica veterinaria
5 - 1981 La leucosi bovina enzootica
6 - 1981 La «Scuola per la Ricerca Scientifica» di Brescia
7 - 1982 Gli indicatori di Sanità Veterinaria nel Servizio Sanitario Nazionale
8 - 1982 Le elmintiasi nell'allevamento intensivo del bovino
9 - 1983 Zoonosi ed animali da compagnia
10 - 1983 Le infezioni da Escherichia coli degli animali
11 - 1983 Immunogenetica animale e immunopatologia veterinaria
12 - 1984 5° Congresso Nazionale Associazione Scientifica di Produzione Animale
13 - 1984 Il controllo delle affezioni respiratorie del cavallo
14 - 1984 1° Simposio Internazionale di Medicina veterinaria sul cavallo da competizione
15 - 1985 La malattia di Aujeszky. Attualità e prospettive di profilassi nell'allevamento suino
16 - 1986 Immunologia comparata della malattia neoplastica
17 - 1986 6° Congresso Nazionale Associazione Scientifica di Produzione Animale
18 - 1987 Embryo transfer oggi: problemi biologici e tecnici aperti e prospettive
19 - 1987 Coniglicoltura: tecniche di gestione, ecopatologia e marketing
20 - 1988 Trentennale della Fondazione Iniziative Zooprofilattiche e Zootecniche di Brescia, 1956-1986
21 - 1989 Le infezioni erpetiche del bovino e del suino
22 - 1989 Nuove frontiere della diagnostica nelle scienze veterinarie
23 - 1989 La rabbia silvestre: risultati e prospettive della vaccinazione orale in Europa
24 - 1989 Chick Anemia ed infezioni enteriche virali nei volatili
25 - 1990 Mappaggio del genoma bovino
26 - 1990 Riproduzione nella specie suina
27 - 1990 La nube di Chernobyl sul territorio bresciano
28 - 1991 Le immunodeficienze da retrovirus e le encefalopatie spongiformi
29 - 1991 La sindrome chetosica nel bovino
30 - 1991 Atti del convegno annuale del gruppo di lavoro delle regioni alpine per la profilassi delle mastiti
31 - 1991 Allevamento delle piccole specie
32 - 1992 Gestione e protezione del patrimonio faunistico
33 - 1992 Allevamento e malattie del visone
34 - 1993 Atti del XIX Meeting annuale della S.I.P.A.S., e del Convegno su Malattie dismetaboliche del suino
35 - 1993 Stato dell'arte delle ricerche italiane nel settore delle biotecnologie applicate alle scienze veterinarie e zootecniche - Atti 1ª conferenza nazionale
36 - 1993 Argomenti di patologia veterinaria
37 - 1994 Stato dell'arte delle ricerche italiane sul settore delle biotecnologie applicate alle scienze veterinarie e zootecniche
38 - 1995 Atti del XIX corso in patologia suina e tecnica dell'allevamento
39 - 1995 Quale bioetica in campo animale? Le frontiere dell'ingegneria genetica
40 - 1996 Principi e metodi di tossicologia in vitro
41 - 1996 Diagnostica istologica dei tumori degli animali
42 - 1998 Umanesimo ed animalismo
43 - 1998 Atti del Convegno scientifico sulle enteropatie del coniglio
44 - 1998 Lezioni di citologia diagnostica veterinaria
45 - 2000 Metodi di analisi microbiologica degli alimenti
46 - 2000 Animali, terapia dell'anima
47 - 2001 Quarantacinquesimo della Fondazione Iniziative Zooprofilattiche e Zootecniche di Brescia, 1955-2000

48 - 2001 Atti III Convegno Nazionale di Storia della Medicina Veterinaria
49 - 2001 Tipizzare le salmonelle
50 - 2002 Atti della giornata di studio in cardiologia veterinaria
51 - 2002 La valutazione del benessere nella specie bovina
52 - 2003 La ipofertilità della bovina da latte
53 - 2003 Il benessere dei suini e delle bovine da latte: punti critici e valutazione in allevamento
54 - 2003 Proceedings of the 37th international congress of the ISAE
55 - 2004 Riproduzione e benessere in coniglicoltura: recenti acquisizioni scientifiche e trasferibilità in campo
56 - 2004 Guida alla diagnosi necroscopica in patologia suina
57 - 2004 Atti del XXVII corso in patologia suina e tecnica dell'allevamento
58 - 2005 Piccola storia della Medicina Veterinaria raccontata dai francobolli
59 - 2005 IV Congresso Italiano di Storia della Medicina Veterinaria
60 - 2005 Atti del XXVIII corso in patologia suina e tecnica dell'allevamento
61 - 2006 Atlante di patologia cardiovascolare degli animali da reddito
62 - 2006 50° Fondazione Iniziative Zooprofilattiche e Zootecniche di Brescia, 1955-2005
63 - 2006 Guida alla diagnosi necroscopica in patologia del coniglio
64 - 2006 Atti del XXIX corso in patologia suina e tecnica dell'allevamento
65 - 2006 Proceedings of the 2nd International Equitation Science Symposium
66 - 2007 Piccola storia della Medicina Veterinaria raccontata dai francobolli - II edizione
67 - 2007 Il benessere degli animali da reddito: quale e come valutarlo
68 - 2007 Proceedings of the 6th International Veterinary Behaviour Meeting
69 - 2007 Atti del XXX corso in patologia suina
70 - 2007 Microbi e alimenti
71 - 2008 V Convegno Nazionale di Storia della Medicina Veterinaria
72 - 2008 Proceedings of the 9th world rabbit congress
73 - 2008 Atti Corso Introduttivo alla Medicina non Convenzionale Veterinaria
74 - 2009 La biosicurezza in veterinaria
75 - 2009 Atlante di patologia suina I
76 - 2009 Escherichia Coli
77 - 2010 Attività di mediazione con l'asino
78 - 2010 Allevamento animale e riflessi ambientali
79 - 2010 Atlante di patologia suina II Prima Parte
80 - 2010 Atlante di patologia suina II Seconda Parte
81 - 2011 Esercitazioni di microbiologia
82 - 2011 Latte di asina
83 - 2011 Animali d'affezione
84 - 2011 La salvaguardia della biodiversità zootecnica
85 - 2011 Atti I Convegno Nazionale di Storia della Medicina Veterinaria
86 - 2011 Atti II Convegno Nazionale di Storia della Medicina Veterinaria
87 - 2011 Atlante di patologia suina III
88 - 2012 Atti delle Giornate di Coniglicoltura ASIC 2011
89 - 2012 Micobatteri atipici
90 - 2012 Esperienze di monitoraggio sanitario della fauna selvatica in Provincia di Brescia
91 - 2012 Atlante di patologia della fauna selvatica italiana
92 - 2013 Thermography: current status and advances in livestock animals and in veterinary medicine
93 - 2013 Medicina veterinaria (illustrato). Una lunga storia. Idee, personaggi, eventi
94 - 2014 La medicina veterinaria unitaria (1861-2011)
95 - 2014 Alimenti di origine animale e salute
96 - 2014 I microrganismi, i vegetali e l'uomo

Finito di stampare da

Tipografia Camuna S.p.A. - Breno (Bs)

Centro Stampa di Brescia

nel mese di marzo 2015

Informazione ecologica:

pubblicazione stampata con assenza di esalazioni alcooliche

Sistema Cesius® brevetto **Philip Borman Italia**

ISBN 978-88-97562-11-5

9 788897 562115