

5.4. Determinazione dei carotenoidi e delle microcistine algali

Andrea Lami, Stefano Gerli, Rosaria Lauceri e Piero Guilizzoni, CNR-ISE Verbania

Sulle carote prelevate nel corso del 2014, come previsto dal programma triennale, sono state effettuate le analisi per la determinazione dei carotenoidi e delle tossine algali.

I dati sono stati espressi come di consueto per questo tipo di parametri in rapporto al contenuto di sostanza organica, misurata come perdita di peso (LOI: *Loss On Ignition*) a 550°C (LOI₅₅₀). I dati di base sono riportati nella tabella qui sotto.

Tab 5.4.1. Contenuto di acqua, Materia secca e organica (LOI₅₅₀) nelle carote di sedimento del Lago Maggiore (p.f.: peso fresco. p.s.: peso secco)

Carota	sezione		data		acqua	materia secca	LOI ₅₅₀
	da cm	a cm	da	a	% p.f.	% p.f.	% p. s.
LM14 1/1	0	1	2011	2014	60,22	39,78	5,69
	3	10	2002	2005	61,03	38,97	6,10
	13	15	1986	1989	60,67	39,33	4,99
LM14 13/2	0	1	2011	2014	78,13	21,87	9,93
	4	8	2002	2008	67,84	32,16	5,80
	13	15	1991	1994	71,39	28,61	5,85
LM14 16/1	0	1	2011	2014	72,26	27,74	9,15
	5	10	2002	2008	46,56	53,44	3,70
	13	15	1998	2000	45,29	54,71	2,89
LM14 17/1	0	1	2011	2014	62,26	37,74	6,09
	1	3	2002	2008	58,42	41,58	4,84
	13	15	1949	1939	52,61	47,39	4,01
LM14 B3/3	0	1	2011	2014	67,33	32,67	8,52
	2	4	2002	2008	64,12	35,88	8,14
	10	12	1968	1979	74,03	25,97	9,82
LM14 57	0	1	2010	2014	71,90	28,10	8,42
	8	11	1973	1987	72,95	27,05	7,82
	15	18	1960	1973	77,11	22,89	8,68
LM14 28/1	0	1	2009	2014	86,28	13,72	17,33
	4	8	1989	1994	81,63	18,37	13,82
	13	15	1949	1971	81,24	18,76	13,90
LM11 28/2	0	1	2005	2010	78,98	21,02	12,61
	2	4	1990	2000	80,76	19,24	12,08
	4	6	1980	1990	82,62	17,38	12,38

Analisi dei pigmenti algali

La determinazione dei pigmenti algali preservati nei sedimenti consente di evidenziare cambiamenti sia nell'abbondanza dei produttori primari che nella composizione della loro comunità.

La quantità totale dei produttori primari, rappresentata da clorofilla totale, carotenoidi totali (Tab.5.4.2 e Fig.5.4.1) e dal beta carotene (Tab 5.4.3 e Fig. 5.4.2.) è risultata essere generalmente maggiore negli strati più profondi rispetto a quelli recenti, indicando quindi un livello di produzione più elevato nel passato rispetto ad quello attuale.

Dall'esame dei carotenoidi specifici risulta abbastanza evidente che alcuni carotenoidi delle cianofitiche (echinenone, cantaxantina, mixoxantofilla) tendono ad avere concentrazioni più elevate nelle sezioni più recenti, mentre altri carotenoidi, come fucoxantina diatocantina e alloxantina, non presentano variazioni significative con la profondità.

Tab 5.4.2. Contenuto dei derivati clorofilliani e dei carotenoidi totali nelle sezioni di carote di sedimento del Lago Maggiore

Carota	Sezione		data		CD	TC
	da cm	a cm	da	a	Unità (g _{LOI}) ⁻¹	mg (g _{LOI}) ⁻¹
LM14 1/1	0	1	2011	2014	61.124	0.264
	3	10	2002	2005	52.516	0.255
	13	15	1986	1989	734.747	5.615
LM14 13/2	0	1	2011	2014	164.192	0.445
	4	8	2002	2008	74.684	0.468
	13	15	1991	1994	106.905	0.730
LM14 16/1	0	1	2011	2014	164.656	0.322
	5	10	2002	2008	32.307	0.270
	13	15	1998	2000	77.074	0.506
LM14 17/1	0	1	2011	2014	122.648	0.320
	1	3	2002	2008	81.946	0.474
	13	15	1949	1939	13.305	0.094
LM14 B3/3	0	1	2011	2014	104.574	0.304
	2	4	2002	2008	42.083	0.245
	10	12	1968	1979	71.887	0.481
LM14 57	0	1	2010	2014	157.997	0.867
	8	11	1973	1987	163.667	0.787
	15	18	1960	1973	154.136	0.823
LM14 28/1	0	1	2009	2014	224.253	1.414
	4	8	1989	1994	97.404	0.948
	13	15	1949	1971	84.183	0.755
LM11 28/2	0	1	2005	2010	82.246	0.548
	2	4	1990	2000	108.309	0.745
	4	6	1980	1990	124.669	1.035

Tab 5.4.3. Contenuto in carotenoidi specifici (mol (g_{LOI})⁻¹) nelle sezioni di carote di sedimento del Lago Maggiore

Carota	sezione		data		alfa carotene	beta carotene	gamma carotene	scionemina	fucoxantina	diadinoxantina	diatoxantina	dinoxantina	alloxantina	luteina	echinenone	zeaxantina	mixoxantofilla	mixoxantofilla degradata	cantaxantina	astaxantina
	cm	cm	anno	anno																
LM14 1/1	0	1	2011	2014	5	29	4	14	143	7	7	7	31	31	13	8	2	9	10	14
	3	10	2002	2005		18		11	64	10	7	7	49	42	19	10	8	0	15	17
	13	15	1986	1989		174	1646	93	0	816	151	340		588	628	398	195	95	17	181
LM14 13/2	0	1	2011	2014	12	82	10	51	216	17	18		66	64	31	15	7	1	24	43
	4	8	2002	2008	17	137	12	12	103	19	20		82	69	41	30	11	1	28	27
	13	15	1991	1994		27	264	12	0	173	13	19	48	74	61	40	82	12	24	24
LM14 16/1	0	1	2011	2014		10		17	140	13	11		66	52	27		19	1	16	18
	5	10	2002	2008	9	78	5	8	46	11	12	5	32	27	15	16	4	1	7	10
	13	15	1998	2000		19	189	9	9	90	15	27		59	58	35	52	8	1	13
LM14 17/1	0	1	2011	2014		16	7	35	242	10	9		49	45	21	10	36	1	13	22
	1	3	2002	2008	17	140	9	24	110	13	21		63	60	33	30	12	0	25	24
	13	15	1949	1939		5	12	5	0	36	7	6		32	26	14	6	1	1	8
LM14 B3/3	0	1	2011	2014		8	7	24	96	11	8	8	57	42	21	12	10	1	14	23
	2	4	2002	2008	4	21	4	10	38	7	6		26	26	13	7	4	1	9	12
	10	12	1968	1979		12	77	7	7	50	14	22		41	45	19	12	3	1	14
LM14 57	0	1	2010	2014	28	289	10	0	132	25	55		74	57	41	44	19	1	36	33
	8	11	1973	1987	29	293	11	0	128	17	61		67	64	39	35	21	1	33	31
	15	18	1960	1973		26	254	11	0	168	19	46	12	73	73	45	27	26	4	24
LM14 28/1	0	1	2009	2014	30	340	18	0	244	27	37	20	112	155	55	48	28	4	38	50
	4	8	1989	1994	15	126	10	0	78	21	34		65	84	43	27	10	2	25	23
	13	15	1949	1971		14	89	8	0	67	19	29		59	71	37	20	7	1	19
LM11 28/2	0	1	2005	2010	8	62	6	29	66	10	10		44	46	22	15	6	1	16	17
	2	4	1990	2000	9	53	9	29	84	14	21		60	62	35	15	9	1	22	17
	4	6	1980	1990	23	248	13	24	111	24	59	12	84	100	47	32	14	4	33	21

Tab 5.4.4. Contenuto in clorofilla a, dei suoi prodotti di degradazione e della clorofilla b e c (nMoli g LOI-1) nelle sezioni di carote di sedimento del Lago Maggiore

Carota	Sezione		data		Clorofilla a	Feofitina a	Feoforbide a	Clorofilla b	Clorofilla c
	cm	cm	anno	anno					
LM14 1/1	0	1	2011	2014	97	88	117	13	31
	3	10	2002	2005	21	74	129	6	6
	13	15	1986	1989		559	1749	838	59
LM14 13/2	0	1	2011	2014	213	259	2289	8	86
	4	8	2002	2008	58	163	86	4	9
	13	15	1991	1994		100	291	66	5
LM14 16/1	0	1	2011	2014	78	403	2290	6	33
	5	10	2002	2008	27	74	36	4	2
	13	15	1998	2000		96	188	104	9
LM14 17/1	0	1	2011	2014	134	283	1776	7	64
	1	3	2002	2008	98	179	1973	4	10
	13	15	1949	1939		6	27	12	1
LM14 B3/3	0	1	2011	2014	29	241	1815	8	8
	2	4	2002	2008	17	78	814	4	5
	10	12	1968	1979		26	143	66	5
LM14 57	0	1	2010	2014	197	409	257	10	18
	8	11	1973	1987	326	381	194	11	29
	15	18	1960	1973		177	402	183	9
LM14 28/1	0	1	2009	2014	247	420	403	27	59
	4	8	1989	1994	18	166	172	8	12
	13	15	1949	1971		8	158	148	6
LM11 28/2	0	1	2005	2010	37	81	1294	7	16
	2	4	1990	2000	37	118	1950	5	7
	4	6	1980	1990	94	244	222	8	4

Analisi delle microcistine

I cianobatteri sono organismi procarioti fotosintetici diffusi negli ambienti acquatici e la loro presenza è in aumento negli ultimi 20 anni (Taranu *et al.* 2015). In acqua dolce, a volte producono fioriture tossiche causate da diverse specie appartenenti, tra gli altri, ai generi *Microcystis*, *Planktothrix* e *Anabaena* (Whitton & Potts 2000). La tossicità è legata alla produzione di specifici metaboliti secondari, fra i quali le microcistine (più di 80 varianti), che possono essere tossici per la fauna selvatica, per il bestiame domestico e per gli esseri umani.

Nel 1998, l'Organizzazione Mondiale della Sanità ha sottolineato l'importanza di monitorare la concentrazione delle microcistine in acqua, e ha raccomandato come il limite di $1 \mu\text{g l}^{-1}$ per l'acqua potabile (WHO 1998). Questa linea guida è stata ottenuta da studi sulla microcistina più tossica (LR) e si riferisce alla concentrazione totale della microcistina LR (intra più extracellulare; Chorus e Bartram, 1999). Le concentrazioni sono misurate utilizzando metodi che non sono in grado di distinguere tra varianti (es. test ELISA); in questo caso viene stimata la concentrazione totale delle microcistine, considerate equivalenti al conformero LR. Questo è un approccio che, nella maggior parte dei casi, sopravvaluta il rischio. Per una valutazione più accurata del rischio è necessario identificare le diverse varianti. Ciò è possibile ricorrendo a tecniche di spettrometria di massa o cromatografiche. Ad oggi diverse pubblicazioni (Barone *et al.* 2010, Manganelli *et al.* 2010, Cerasino e Salmaso 2012) hanno documentato la presenza di cianobatteri tossici nelle acque interne italiane. Questi autori hanno dimostrato che fioriture potenzialmente tossiche possono verificarsi non solo in ambienti eutrofi, ma anche in quelli oligotrofi.

Sulla base di queste indicazioni si è tentato di ricostruire la presenza delle microcistine negli ultimi 50 anni analizzando alcune carote di sedimento del Lago Maggiore.

Tuttavia decisamente più scarse sono le indicazioni sulla presenza ed estrazione delle microtossine dai sedimenti (Efting *et al.* 2011) e pertanto è stato necessario sviluppare e mettere a punto un apposito protocollo di estrazione.

A tal fine sono state preparate 10 aliquote di 1,0 g del campione di sedimento del Lago Maggiore che sono state suddivise in 3 gruppi (3+3+4). Due aliquote di ciascun gruppo sono state fortificate con le microcistine LR ed RR. Dopo 24h di equilibratura i campioni di ciascun gruppo sono stati sottoposti ad una diversa procedura di estrazione per recuperare le microcistine. I campioni non fortificati sono stati utilizzati come controllo e/o addizionati, dopo la procedura di estrazione, con le microcistine, per essere utilizzate come soluzioni di riferimento. Le tre procedure di estrazione sono quelle riportate in tabella 5.4.5. Ciascun campione è stato sottoposto a due cicli di estrazione e ciascuna procedura di estrazione riprodotta in duplicato.

Tabella 5.4.5 descrizione delle diverse procedure di estrazione testate.

Procedura estrazione	Solvente	modalità d'estrazione
A	1. 100% MeOH 0,1% in HCOOH (1 ml) 2. 75% MeOH 0,1% in HCOOH (1 ml)	ultrasonificazione (200 watts, 24kHz): 30s x 5 volte, intervallo 1 min, punta sonicante 2, pulse 0,6, amplitudine 75%, 0°C 2 volte con 1 mL di solvente
B	1. 75% MeOH 0,1% in HCOOH (1 ml) 2. 75% MeOH 0,1% in HCOOH (1 ml)	ultrasonificazione (200 watts, 24kHz): 30s x 5 volte, intervallo 1 min punta sonicante 2, pulse 0,6, amplitudine 75%, 0°C 2 volte con 1 mL di solvente
C	1. 0,1 M EDTA - 0,1 M Pirofosfato, pH 3 (1 ml) 2. 0,1 M EDTA - 0,1 M Pirofosfato, pH 3 (1 ml)	ultrasonificazione (200 watts, 24kHz): 30s x 5 volte, intervallo 1 min, punta sonicante 2, pulse 0,6, amplitudine 75%, 0°C 2 volte con 1 mL di solvente

Dopo aver centrifugato i campioni a 12000 giri per 18 minuti a 4 °C (20°C nella procedura C), i surnatanti sono stati prelevati, filtrati su filtri per siringa in PTFE ed analizzati in HPLC-DAD per il contenuto di microcistine.

L'analisi con HPLC è stata eseguita utilizzando un cromatografo Themoscientific composto da un autcampionatore (WPS-3000), un pompa quaternaria (P680), un comparto per termostatazione della colonna (TCC 100) e un rivelatore UV-VIS (Ultimate DAD3000); la colonna utilizzata è stata una Luna C18(2) 100A New Column 5 μ , 250 x 4.6 mm di Phenomenex. La separazione cromatografica di diversi composti è stata raggiunta con alcune modifiche del metodo proposto da Guzzella et al. (2010).

Le procedure A e B hanno fornito risultati simili e migliori rispetto alla procedura C (tabella 5.4.6).

Tabella 5.4.6 Confronto dell'efficienza di recupero tra le metodologie testate

Procedura	Recupero % Mc-LR	Recupero % Mc-RR
A	79 \pm 4	58 \pm 9
B	80 \pm 8	58 \pm 8
C	46 \pm 10	13 \pm 2

Sulla base di questa indicazione si è scelto il metodo A, in quanto più semplice e con risultati soddisfacenti. Si è quindi proceduto ad analizzare alcuni campioni di sedimento delle carote del Lago Maggiore insieme ad alcuni campioni di sedimento provenienti da laghi (Varese e Pusiano) nei quali è noto il ricorrere di fioriture tossiche di cianobatteri, per aver un confronto con ambienti diversi.

I campioni analizzati sono quelli riportati qui di seguito (5.4.7):

Tab. 5.4.7. Campioni utilizzati per messa a punto della metodologia di estrazione.

No	Carota	sezione
1	Pusiano 10/1/3	1-2 cm
2	Varese 10/10	52-53 cm
3	LM 14 B3/3	0-1 cm
4	LM 14 13/2	0-1 cm
5	LM 14 57	0-1 cm
6	LM 11 28/02	0-1 cm

Circa 1,0 g di campione è stato posto in una provetta di vetro ad alta resistenza per centrifuga ed è stato aggiunto 1 ml di solvente estraente (100% MeOH, 0,1% in HCOOH). Il campione è stato sonicato in bagno di ghiaccio, centrifugato ed il surnatante recuperato per l'analisi HPLC.

In nessuno dei campioni analizzati è stato possibile riscontrare la presenza di microcistine. Gli stessi estratti sono stati anche analizzati presso i laboratori dell' Istituto Agrario di S. Michele all'Adige, Trento, dal Dr. Cerasino con un HPLC-MS. La metodica è caratterizzata da una sensibilità che supera di diversi ordini di grandezza quella propria del metodo HPLC-DAD, disponibile nei nostri laboratori. Tuttavia, anche in questo caso sono stati ottenuti simili risultati: le microcistine sono state rilevate ed identificate solo nei campioni fortificati, ma non nei sedimenti tali e quali.

I risultati ottenuti, indicano che nel sedimento le microcistine o non sono presenti, o lo sono a concentrazioni molto basse.

Si è perciò optato per una diversa strategia di estrazione che, utilizzando una maggiore quantità di sedimento, concentrasse maggiormente il campione in un piccolo volume di solvente estraente

Pertanto da ciascun campione di sedimento sono state prelevate due aliquote di circa 3 g, estratte con 4 ml di metanolo acquoso al 75%, 0.1% in HCOOH (due cicli di estrazione per aliquota) per sonicazione. Dopo centrifugazione, i surnatanti sono stati unificati e portati a secco su rotavapor a 36 °C, il campione ricostituito in 1 ml di MeOH al 75%, 0,1% in HCOOH, filtrato su filtro per siringa da 0,45 µm in PTFE ed analizzato in HPLC-DAD. Questa procedura permette di concentrare l'estratto di un ordine di grandezza rispetto alle prime determinazioni eseguite. Tuttavia, anche in questo caso, non è stata riscontrata la presenza di tossine in alcuno dei campioni di sedimento analizzati. Ciò fa concludere che, nonostante alcuni risultati sperimentali precedenti indicassero il contrario (Eftig, 2011), molto probabilmente le tossine non si conservano nei sedimenti delle carote analizzate.

Conclusioni

E' noto che in passato si siano verificate fioriture cianobatteriche nel Lago Maggiore come dimostrato dalla presenza dei loro carotenoidi specifici. I risultati ottenuti dalle nostre analisi suggeriscono che tali fioriture non siano state caratterizzate da produzione di microcistine. Tuttavia, altre indagini sono necessarie per avvalorare tale ipotesi. Infatti, l'assenza di microcistine nei sedimenti potrebbe essere dovuta ad un'elevata attività degradativa dei sedimenti stessi. Approcci diversi, quali quelli genetici, atti a valutare la potenzialità di produrre microcistine delle popolazioni cianobatteriche

identificate/identificabili nei sedimenti, contribuirebbero in maniera decisiva a chiarire questo punto.

Bibliografia

- Barone R., Castelli G., Naselli-Flores L., 2010, Red sky at night cyanobacteria delight: the role of climate in structuring phytoplankton assemblage in a shallow, Mediterranean lake (Biviere di Gela, southeastern Sicily), *Hydrobiologia*, 639:43-53.
- Cerasino, L., Salmaso, N., 2012. Diversity and distribution of cyanobacterial toxins in the Italian subalpine lacustrine district. *Oceanological and Hydrobiological Studies* 41. doi:10.2478/s13545-012-0028-9
- Chorus I. and Bartram J. Eds., 1999, Toxic cyanobacteria in water: a guide to their public health consequences, monitoring and management, E & FN Spon, London.
- Efting, A.A., Snow, D.D., Fritz, S.C., 2011. Cyanobacteria and microcystin in the Nebraska (USA) Sand Hills Lakes before and after modern agriculture. *Journal of Paleolimnology* 46, 17–27. doi:10.1007/s10933-011-9511-3
- Guzzella L., Ghislanzoni L., Pozzoni F., Cerasino L. Salmaso N. 2010. Determinazione di tossine algali (microcistine e nodularina) nelle acque superficiali. *Notiziario dei Metodi Analitici IRSA*, 1, 17-31.
- Manganelli M., Scardala S., Stefanelli M., Vichi S., Mattei D., Bogianni S., Ceccarelli P., Corradetti E., Petrucci I., Gemma S., Testai E., Funari E., 2010, Health risk evaluation associated to *Planktothrix rubescens*: An integrated approach to design tailored monitoring programs for human exposure to cyanotoxins, *Water Res.*, 44, 1297-1306.
- Taranu, Z.E., Gregory-Eaves, I., Leavitt, P.R., Bunting, L., Buchaca, T., Catalan, J., Domaizon, I., Guilizzoni, P., Lami, A., McGowan, S., Moorhouse, H., Morabito, G., Pick, F.R., Stevenson, M.A., Thompson, P.L., Vinebrooke, R.D., 2015. Acceleration of cyanobacterial dominance in north temperate-subarctic lakes during the Anthropocene. *Ecology Letters* n/a–n/a. doi:10.1111/ele.12420
- Whitton B.A., Potts M., 2000, The ecology of cyanobacteria. Their diversity in time and space, Kluwer Academic Publisher, Dordrecht, The Netherlands.
- WHO, 1998, Guidelines for Drinking Water Quality, 2nd ed. Addendum to vol. 2. Health Criteria and Other Supporting Information, World Health Organization, Geneva.

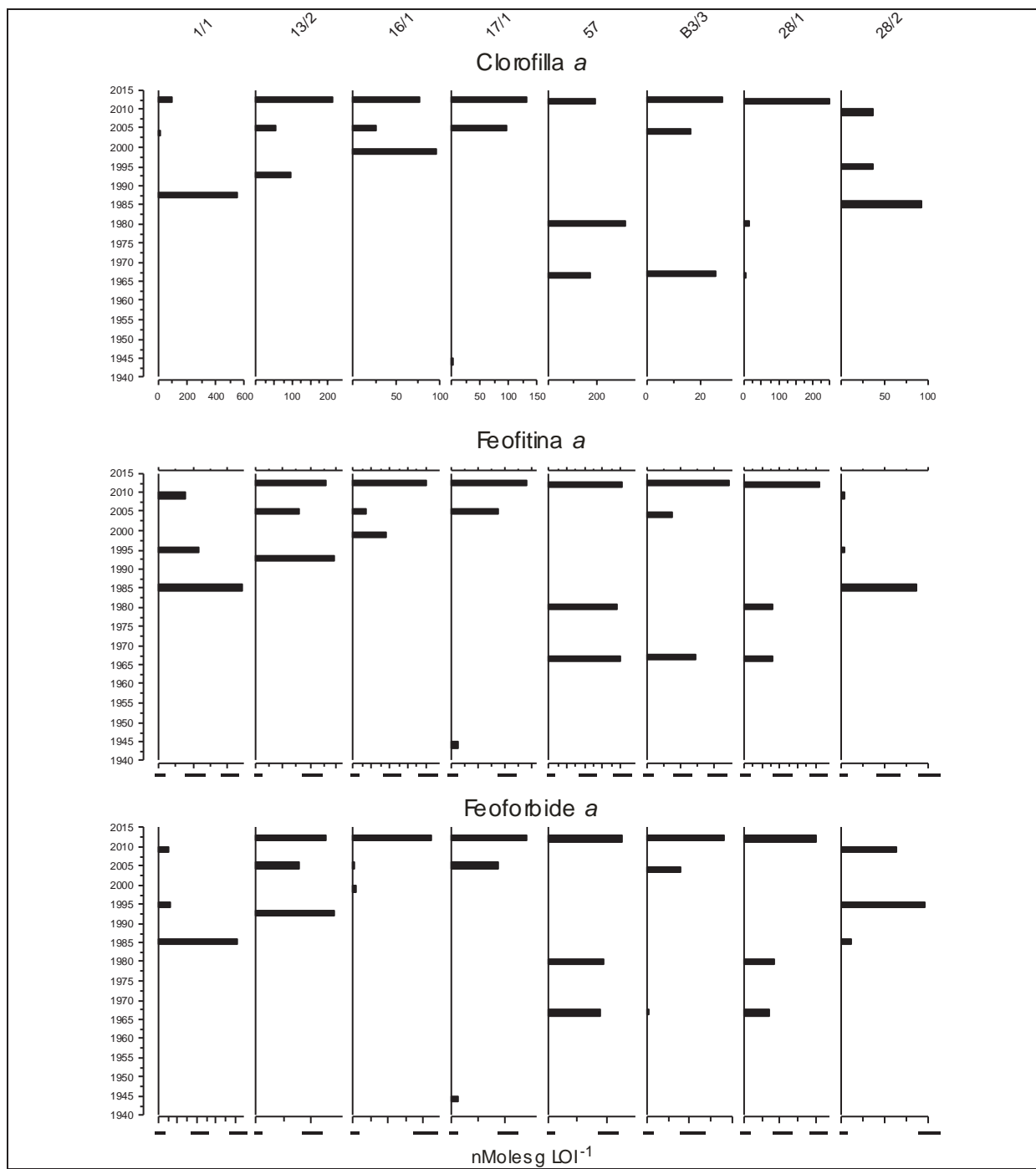


Fig 5.4.1. Distribuzione della clorofilla ed ei suoi prodotti di degradazione (feofitina e feoforbide) nelle sezioni delle carote di sedimento prelevate nel Lago Maggiore.

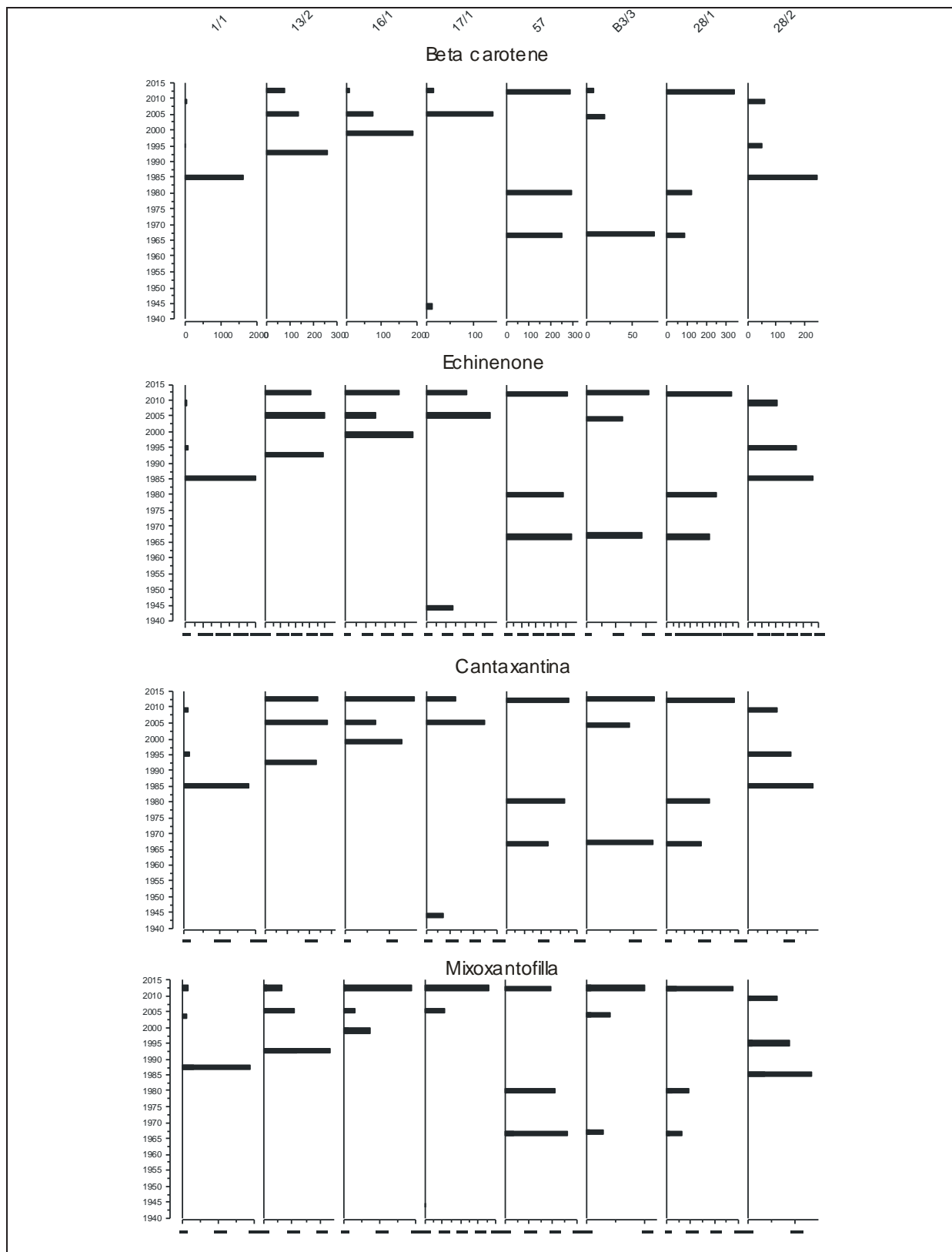


Fig 5.4.2. Distribuzione di beta carotene e dei carotenoidi specifici delle cianofitiche nelle sezioni delle carote di sedimento prelevate nel Lago Maggiore.

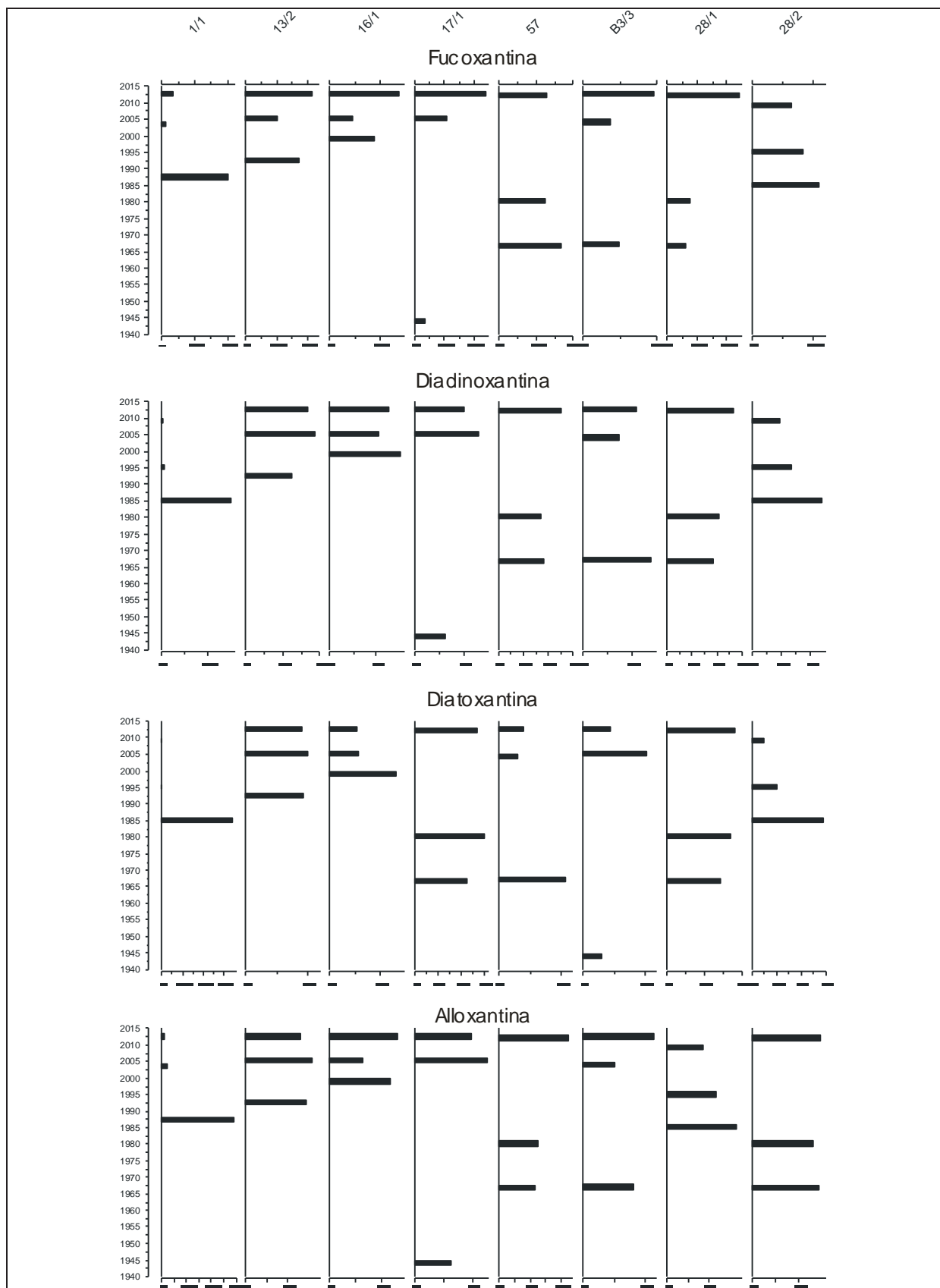


Fig 5.4.3. Distribuzione di carotenoidi specifici delle crisoficee (fucoxantina, diadinoxantina, e diatoxantina) delle criptoficee (alloxantina) nelle sezioni delle carote di sedimento prelevate nel Lago Maggiore.