

# Fioriture di cianobatteri della specie *microcystis wesenbergii* nel lago di Muzzano (Svizzera)

Autor(en): **Bottinelli, Michele / Tonolla, Mauro / Forlani, Giuseppe**

Objektyp: **Article**

Zeitschrift: **Bollettino della Società ticinese di scienze naturali**

Band (Jahr): **88 (2000)**

PDF erstellt am: **16.07.2024**

Persistenter Link: <https://doi.org/10.5169/seals-1003220>

## **Nutzungsbedingungen**

Die ETH-Bibliothek ist Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Inhalten der Zeitschriften. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern.

Die auf der Plattform e-periodica veröffentlichten Dokumente stehen für nicht-kommerzielle Zwecke in Lehre und Forschung sowie für die private Nutzung frei zur Verfügung. Einzelne Dateien oder Ausdrucke aus diesem Angebot können zusammen mit diesen Nutzungsbedingungen und den korrekten Herkunftsbezeichnungen weitergegeben werden.

Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Die systematische Speicherung von Teilen des elektronischen Angebots auf anderen Servern bedarf ebenfalls des schriftlichen Einverständnisses der Rechteinhaber.

## **Haftungsausschluss**

Alle Angaben erfolgen ohne Gewähr für Vollständigkeit oder Richtigkeit. Es wird keine Haftung übernommen für Schäden durch die Verwendung von Informationen aus diesem Online-Angebot oder durch das Fehlen von Informationen. Dies gilt auch für Inhalte Dritter, die über dieses Angebot zugänglich sind.

---

# Fioriture di cianobatteri della specie *Microcystis Wesenbergii* nel lago di Muzzano (Svizzera)

Michele Bottinelli<sup>1,2</sup>, Mauro Tonolla<sup>2</sup>, Giuseppe Forlani<sup>1</sup>, Carlo Crivelli<sup>2</sup>,  
Anna Maria Sanangelantoni<sup>1</sup> e Raffaele Peduzzi<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Università di Pavia, Dip. Genetica e Microbiologia «A. Buzzati Traverso»,  
via Ferrata 1, 27100 Pavia, Italia

<sup>2</sup>Istituto Cantonale Batteriosierologico e Laboratoire d'Ecologie Microbienne (Università di Ginevra),  
via Giuseppe Buffi 6, CH-6904 Lugano, Svizzera.

---

**Riassunto:** Negli ultimi anni il lago di Muzzano, un piccolo lago di circa 200000 m<sup>2</sup> situato nel bacino imbrifero del lago di Lugano (Ceresio), è stato soggetto ad improvvise morie di pesci. Attraverso prelievi mensili si è pertanto proceduto alla verifica ed identificazione dei cianobatteri presenti nel lago, in quanto è risaputo che simili fenomeni possono esser dovuti alla presenza di microcistine, peptidi ciclici ad azione epatotossica prodotti da quest'ultimi. Una fioritura di grandi dimensioni composta dal genere *Microcystis*, il più importante tra i gruppi di cianobatteri che producono epatotossine, è stata riscontrata a partire da fine luglio ad inizio ottobre 1997. La caratterizzazione, sia morfologica che tramite tecniche molecolari, ha evidenziato che questa fioritura risulta composta da un unico morfotipo: *Microcystis wesenbergii*. Le analisi effettuate sulle cellule microbiche hanno mostrato la presenza di almeno cinque diversi tipi di microcistine.

**Abstract:** During recent years, the Lake Muzzano, a shallow lake of approximately 200000 m<sup>2</sup> close to Lugano (TI-Switzerland), has been subjected to episodes of high fish mortality. Monthly samplings were thus undertaken to verify whether these phenomena could be due to the presence of hepatotoxin-producing cyanobacteria, that have been shown world-wide in superficial fresh-waters. A *Microcystis* bloom of great dimensions, that at both morphological and molecular analysis resulted as composed mainly by *Microcystis wesenbergii*, was observed in the period from July to October, 1997. Biochemical evidence for the presence in the bloom of at least five different types of microcystins is reported.

**Key words:** shallow lake, cyanobacteria, bloom, hepatotoxin, microcystine, peptide sintetasi, rRNA, RP-HPLC.

---

## INTRODUZIONE

### I cianobatteri

I cianobatteri sono microorganismi procariotici fotoautotrofi obbligati capaci di compiere una fotosintesi ossigenica molto simile a quella delle piante e delle alghe. Le diverse componenti dell'apparato fotosintetico sono tuttavia localizzate sulla membrana cellulare, organizzata in tilacoidi, invece che nei cloroplasti. I più recenti studi di carattere molecolare hanno messo in evidenza che essi appartengono al dominio Bacteria, all'interno del quale costituiscono, sulla base delle sequenze dell'rRNA 16S, un gruppo omogeneo (WOESE 1994). Essi sono relativamente uniformi anche dal punto di vista metabolico e nutrizionale, ma mostrano un'eterogeneità nelle dimensioni del genoma (1.6x10<sup>9</sup> - 8.6x10<sup>9</sup> dalton) e nei valori di G+C (dal 35 al 71%). La tassonomia dei cianobatteri è particolarmente difficoltosa dal momento che presentano una considerevole variabilità morfologica non sempre correlata ad importanti differenze genotipiche.

### Ecologia e fioriture

I cianobatteri occupano una gamma di habitat molto più ampia di quella degli altri procariotici fotosintetici. Infatti, possono trovarsi in qualsiasi ambiente caratterizzato dalla presenza di luce, acqua, sali minerali, anidride carbonica e azoto atmosferico. I luoghi più comuni in cui tali batteri

prosperano sono i bacini d'acqua dolce e le riserve idriche, dove danno luogo periodicamente ai cosiddetti fenomeni di fioriture stagionali (blooming). La formazione di queste fioriture è stimolata da numerosi fattori chimico-fisici, come elevate concentrazioni di nutrienti organici ed inorganici (soprattutto azoto e fosforo) e particolari condizioni di luce e temperatura. Non è stato però fino ad ora possibile correlare con precisione il verificarsi delle fioriture a determinati parametri ambientali.

### Le tossine

L'aumento della biomassa cianobatterica (bloom) determina sia problemi estetici, come le schiume superficiali ed i cattivi odori, sia rischi per la salute umana ed animale, dovuti alla produzione di potenti tossine che alcuni cianobatteri sono in grado di sintetizzare. Il problema per gli animali deriva dal fatto che i cianobatteri sono dotati di gasvacuoli che permettono loro un continuo spostamento lungo la colonna d'acqua per ottimizzare la fotosintesi: galleggiando in superficie, essi possono essere trasportati facilmente dai venti vicino alle rive, dove possono essere ingeriti dal bestiame. Oltre alla tossicità delle fioriture algali un problema non secondario è rappresentato dalla loro successiva decomposizione che determina la deossigenazione e l'alterazione delle proprietà chimiche dell'acqua, rendendo così impossibile la vita per molti animali acquatici.

Le tossine prodotte dai cianobatteri sono riconducibili a due categorie fondamentali, le neurotossine e le epatotossine, diverse tra loro sia per la struttura chimica, che per il bersaglio su cui agiscono.

- Le neurotossine sono ammine secondarie bicicliche con struttura comparabile a quella degli alcaloidi. In particolare, l'anatossina-a ha una struttura molto simile a quella della cocaina. Il bersaglio di tutte le neurotossine è la placca neuromuscolare, ma i meccanismi d'azione sono diversi. L'anatossina-a, prodotta da *Anabaena flos-aquae*, si comporta come l'acetilcolina, inducendo stimolazione muscolare; tuttavia, essendo insensibile all'azione degradativa dell'enzima acetilcolinesterasi, provoca uno stato di perenne contrazione delle fibrocellule muscolari che può portare nel soggetto colpito a paralisi respiratoria, e conseguente morte.
- Le epatotossine, sono prodotte prevalentemente dai cianobatteri dei generi *Microcystis* (microcistine) e *Nodularia* (nodularine) ed essendo i generi più frequenti risultano essere quelle più studiate. Si tratta di peptidi a basso peso molecolare che presentano una tipica struttura ciclica. Le nodularine sono prodotte unicamente dal genere *Nodularia* e sono pentapeptidi, mentre le microcistine possono essere prodotte anche da ceppi appartenenti ai generi *Anabaena*, *Oscillatoria* e *Nostoc* e sono eptapeptidi. Le microcistine agiscono a livello del fegato, dove sono veicolate da trasportatori di anioni organici a specificità multipla il cui compito fisiologico risiede nel trasporto degli acidi biliari agli epatociti (HOOSER *et al.* 1991, RUNNEGAR *et al.* 1991). L'ingestione di queste tossine provoca una contrazione degli epatociti dovuta all'azione inibitrice delle tossine sulle protein-fosfatasi di tipo 1 e di tipo 2A (MACKINTOSH *et al.* 1990). Le microcistine deformano le cellule epatiche agendo sul citoscheletro (impalcatura di filamenti proteici) degli epatociti, che fra le altre funzioni ha anche quella di conferire la forma alla cellula. Questo provoca emorragia intraepatica, portando a collasso cardiocircolatorio e, in breve tempo, alla morte.

L'interesse degli studiosi si è concentrato principalmente sulle microcistine in quanto i cianobatteri che le producono sono i più frequentemente riscontrabili nelle acque. Esse vengono considerate endotossine in quanto non sono secrete attivamente dalle cellule, ma possono liberarsi nel mezzo acquoso quando avviene la lisi cellulare. La funzione di queste molecole nei cianobatteri, pur oggetto di diversi studi (CARMICHAEL 1994), rimane ancora oscura, così come non è chiaro il motivo per cui alcuni ceppi di *Microcystis aeruginosa* sintetizzano le tossine e altri no.

### La struttura delle microcistine

Tutte le cinquanta varianti di microcistine fino ad ora isolate (RINEHART *et al.* 1994) presentano una struttura ad anello composta da sette aminoacidi, la cui tipica formula, riportata nella figura sottostante (Fig. 1), corrisponde a: D-Ala<sup>1</sup>-L-X<sup>2</sup>-eritro-b-metil-D-iso-Asp<sup>3</sup>-L-Z<sup>4</sup>-Adda<sup>5</sup>-D-iso-Glu<sup>6</sup>-Mdha<sup>7</sup>

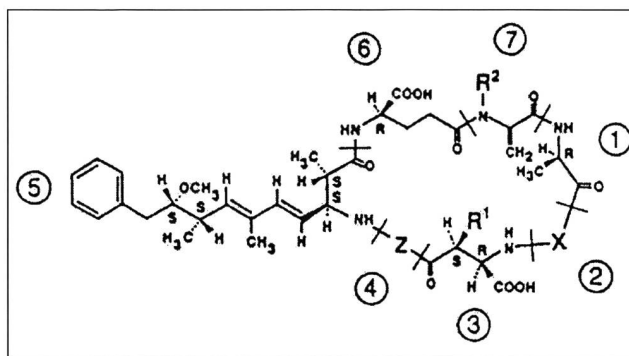


Fig. 1 - Struttura generale delle microcistine

In tale sequenza è possibile individuare due aminoacidi unici, non proteici, tipici delle microcistine: il primo è il b-aminoacido Adda [acido 3-ammino-9-metossi-2,6,8-trimetil-10-fenildeca-4,6-dienoico] in posizione 5; l'altro è l'*N*-metil-deidroalanina (Mdha), che si trova in posizione 7. Una particolare attenzione merita l'aminoacido Adda, che da solo non è tossico, ma all'interno delle microcistine sembra essere essenziale per la loro tossicità (HARADA *et al.* 1990; NAMIKOSHI *et al.* 1990). Esso rappresenta inoltre uno strumento per l'identificazione delle microcistine, in quanto conferisce alla molecola il suo caratteristico massimo di assorbanza alla lunghezza d'onda di 238 nm (LAWTON *et al.* 1994).

Le lettere **X** e **Z** rappresentano gli aminoacidi che possono variare nella struttura ciclica; le microcistine sono infatti definite usando suffissi a due lettere, che stanno ad indicare le diverse combinazioni dei due aminoacidi variabili; ad esempio: la microcistina-LR indica la tossina che contiene gli aminoacidi Leucina-Arginina, la microcistina-RR quella con due Arginine, la microcistina-YR quella con gli aminoacidi Tirosina-Arginina, e così via.

La variante -LR è quella più diffusa di tutte le microcistine fino ad ora trovate, ed è anche quella a più elevata tossicità, come mostrato nella seguente tabella:

	LD <sub>50</sub> (topo o ratto)
Microcistina-LR	50 µg Kg <sup>-1</sup>
Microcistina-RR	600 µg Kg <sup>-1</sup>
Microcistina-YR	68 µg Kg <sup>-1</sup>
Nodularina	30-50 µg Kg <sup>-1</sup>
Tossina del botulino	3x10 <sup>-5</sup> µg Kg <sup>-1</sup>
Tossina del tetano	1x10 <sup>-4</sup> µg Kg <sup>-1</sup>
Tossina della difterite	0.3 µg Kg <sup>-1</sup>
Stricnina	500 µg Kg <sup>-1</sup>
Cianuro di sodio	1000 µg Kg <sup>-1</sup>

La struttura ciclica, il contenuto di aminoacidi insoliti ed il basso peso molecolare hanno fatto ipotizzare fin dalla loro scoperta che questi peptidi fossero sintetizzati non a livello ribosomale, ma ad opera di una peptide sintetasi (NEILAN *et al.* 1999), un genere di enzima attraverso il quale molte specie di batteri e funghi sintetizzano composti bioattivi come antibiotici, inibitori enzimatici ed immunosoppressori.

### Le peptide sintetasi

Le peptide sintetasi sono enzimi multifunzionali, generalmente di notevoli dimensioni (100-1600 kD), composti da domini (spesso in numero uguale al numero di aminoacidi del peptide che sintetizzano) di circa 600 aminoacidi, intervallati da regioni di dimensioni simili, dette interdomini. Ogni dominio è responsabile dell'attivazione di un aminoacido che costituisce il futuro peptide. Inoltre ogni dominio presenta almeno sei regioni «core» altamente conservate, ciascuna formata da tre-otto aminoacidi, il cui ordine e la cui localizzazione all'interno di tutti i domini conosciuti sono ben conservati. Gli aminoacidi vengono attivati come amino-acil-adenilati, a spese di molecole di ATP, e legati covalentemente per mezzo di un legame tioestere al corrispondente sito attivo, grazie all'aiuto di uno o più cofattori del tipo 4'-fosfopantoina (PAN). Si ha così la formazione del legame peptidico (transpeptidazione). Tali cofattori guidano quindi lo scorrimento degli aminoacidi attraverso i domini allineati, permettendo la creazione di un peptide avente una sequenza che segue fedelmente l'ordine dei domini specifici sull'enzima. Al termine della reazione di «montaggio» del peptide si ha il suo rilascio dal multienzima e la sua ciclizzazione.

I meccanismi di sintesi di queste epatotossine cicliche sono stati studiati in dettaglio soprattutto nel cianobatterio *Microcystis aeruginosa*, produttore della microcistina-LR (e-RR), altamente tossica, e che risulta riscontrabile in svariate ecosistemi lacustri in tutto il mondo. Pur non essendo mai riusciti a isolare, purificare ed analizzare la peptide sintetasi di *M. aeruginosa*, è stato tuttavia identificato il locus codificante (MEIBNER *et al.* 1996), che è stato ora completamente sequenziato (NEILAN *et al.* 1999, NISHIZAWA *et al.* 1999). Recentemente si è potuta inoltre verificare anche la relazione tra il gene clonato e la produzione di microcistine, introducendo una delezione nella sequenza nucleotidica *in vivo* ed osservando sia la perdita della produzione dell'eptapeptide (DITTMANN *et al.* 1997), sia la conseguente perdita della tossicità nei confronti di *Daphnia galeata* (ROHRLACK *et al.* 1999).

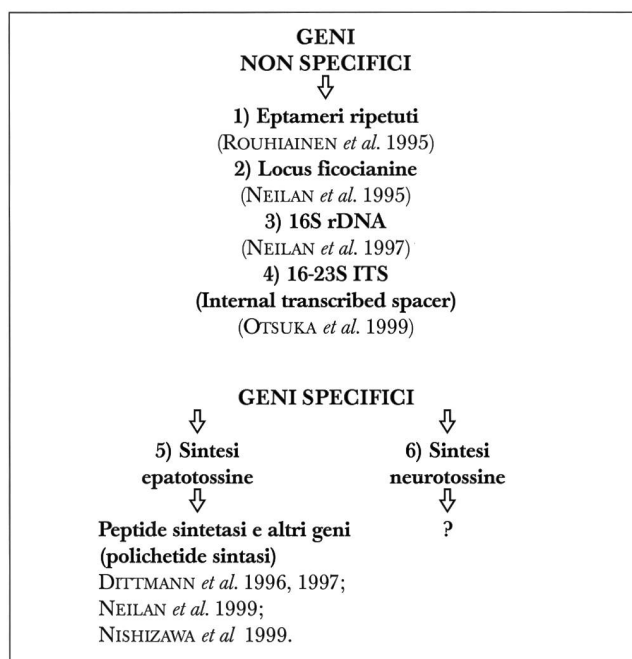
### Metodi di rivelazione delle tossine nelle acque

Per molti anni i test di tossicità sono stati eseguiti *in vivo* su topi o ratti. Tali metodiche sono state più recentemente sostituite con saggi anche più sensibili che utilizzano linee cellulari *in vitro* (CODD *et al.* 1989), o linee cellulari epatiche (BHATTACHARYA *et al.* 1996). Sono inoltre molto utilizzate, o in fase di sviluppo, analisi che sfruttano le caratteristiche fisico-chimiche e biologiche delle tossine. Tra queste l'HPLC (High-performance Liquid Chromatography), che sfrutta il peculiare assorbimento a 238 nm della molecola dell'Adda, l'HPTLC (High-performance Thin Layer Chromatography), la spettrometria di massa MALDI-TOF (Matrix-Assisted Laser Desorption / Ionization Time-of-Flight) (ERHARD *et al.* 1997), la Gas Cromatografia, il saggio colorimetrico di inibizione delle proteine fosfatasi (WARD *et al.* 1997), saggi immunoenzimatici come l'ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) e quelli radioimmunologici. Gran parte di queste tecniche non risultano però del tutto efficienti, perché non sufficientemente sensi-

bili, perché incapaci di distinguere peptidi dotati di elevata attività biologica da quelli relativamente meno pericolosi, o perché basati sulla disponibilità di attrezzature non facilmente reperibili. A ciò si aggiunge la possibilità che si verifichi la produzione contemporanea di più tossine. Oggi si cerca di risolvere il problema con un approccio biomolecolare, mediante l'individuazione di sonde molecolari in grado di caratterizzare i cianobatteri produttori di tossine e di metterli in evidenza nei siti di possibile contaminazione. Questo approccio permetterebbe l'identificazione dei ceppi tossici prima di un'eventuale fioritura, prima quindi della produzione e liberazione delle tossine nelle acque.

### Metodi molecolari per l'identificazione di cianobatteri tossici

La ricerca di sonde molecolari adatte al riconoscimento della presenza nelle acque di ceppi cianobatterici tossici si è mossa in due direzioni, come illustrato dal seguente diagramma:



Un metodo idealmente perfetto per questo genere d'identificazione sarebbe il secondo, cioè usare come sonde porzioni di geni coinvolti nella sintesi delle tossine (geni specifici).

Per quanto riguarda le neurotossine non sono ad oggi conosciuti i geni coinvolti nella loro sintesi. Per le epatotossine, invece, molti gruppi di ricerca stanno lavorando da parecchi anni all'isolamento in alcuni ceppi tossici di *Microcystis* di geni per le peptide sintetasi che si ritengono coinvolte nella sintesi delle microcistine.

Mediante oligonucleotidi specificamente disegnati sulle sequenze di altre peptide sintetasi conosciute, questi geni sono stati clonati, giungendo al completo sequenziamento di quelli di *M. aeruginosa* K-139. La sequenza è depositata nella banca dati dell'EBI (European Bioinformatics Institute; <http://www.ebi.ac.uk>) con il numero di accesso ABO19578 (NISHIZAWA *et al.* 1999).



## Il laghetto di Muzzano

I pochi studi effettuati in precedenza sul lago di Muzzano lo descrivevano come un lago eutrofico, ricco di plancton, circoscritto da una regione urbana e conosciuto dall'opinione pubblica unicamente per le due improvvise morie di pesci del 1967 e del 1994. Sospettando che le condizioni del lago potessero dar luogo a fioriture di cianobatteri, si è pensato di caratterizzarlo dal punto di vista limnologico, d'identificare le diverse specie di cianobatteri presenti e di verificare la loro possibile tossicità. L'improvviso sviluppo della fioritura cianobatterica avvenuta nel mese di settembre 1997 e ripetutasi nel settembre 1998 ha aperto nuovi fronti della ricerca indirizzati soprattutto alla caratterizzazione del tipo di fioritura e dei cianobatteri coinvolti.

## MATERIALI E METODI

### Terreni di coltura e condizioni di crescita

Sono stati impiegati terreni liquidi e solidi (agar 0.6%) per cianobatteri (BG11 e BG11<sub>0</sub>, RIPPKA 1988), che sono stati incubati a 27 °C, e cresciuti in condizioni limitanti di radiazione luminosa (circa 50 µmol s<sup>-1</sup> m<sup>-2</sup>).

### Microscopia ottica

Essendo difficilmente distinguibili morfologicamente da altri microorganismi fotoautotrofi come le alghe eucariotiche, l'identificazione dei cianobatteri è stata confermata tramite epifluorescenza, utilizzando speciali filtri ottici che permettono di eccitare in modo specifico i diversi pigmenti fotosintetici producendone l'autofluorescenza. L'identificazione è possibile in quanto un cianobatterio risulta fluorescente sia al set di filtri per la messa in evidenza delle ficocianine e ficoeritrine (F41 HQ535/50, Q565LP, HQ610/75), sia a quello per la clorofilla *a* (G436, FT510, LP520), mentre gli altri microorganismi fotosintetici risultano fluorescenti unicamente al set di filtri corrispondente alla clorofilla *a* (TSUJI *et al.* 1986).

### Microscopia elettronica a scansione

Le sospensioni batteriche sono state miscelate con una soluzione di fissaggio alla glutaraldeide (5.0 ml di tampone fosfato 0.2 M, 0.6 ml glutaraldeide 50%, 4.4 ml d'acqua distillata) in un rapporto di 1:9, e fissate per almeno due ore. La soluzione è stata filtrata su filtri di policarbonato (Millipore GTTPO1300 con pori di 0.22 µm e 13 mm di diametro), lavata con tampone fosfato 0.2 M, pH 7.2, quindi trattata con soluzione di fissaggio al tetrossido di osmio (5.0 ml di tetrossido di osmio 4%, 5.0 ml di tampone fosfato 0.2 M). Dopo almeno 15 minuti i filtri sono stati lavati con acqua distillata e filtrata (filtro con pori di 0.22 µm di diametro), e disidratati con bagni successivi di 5 minuti ciascuno in soluzioni di etanolo a concentrazioni crescenti (35%, 45%, 55%, 65%, 75%, 85%, 95%, 100%), precedentemente filtrate come descritto. Dopo l'ultimo lavaggio con etanolo al 100% i filtri con i batteri sono stati immersi 5 minuti in esametildisilano. I preparati sono infine stati disidratati al punto critico con il «Critical Point Dryer» (BAL-TEC) secondo il manuale, e ricoperti con

dell'oro utilizzando l'apparecchio Sputter CD005 (BAL-TEC).

### Analisi molecolari

DNA genomico ad alto peso molecolare è stato estratto dalla fioritura cianobatterica come descritto da FRANCHE & DEMERVAL (1988). I geni del 16S rDNA sono stati amplificati a partire dal DNA estratto tramite PCR, utilizzando il «forward primer» HK25 (o 27F1) che corrisponde alle posizioni 8-27 (BROSIUS *et al.* 1981), ed il «reverse primer» HK26 (o 1494Rc) che corrisponde alle posizioni 1494-1513 (NEILAN *et al.* 1997) dell'rDNA di *Escherichia coli*.

HK25: 5'- AGAGGTTTGATCATGGCTCA -3'

HK26: 5'- ACGGTTACCTTGTTACGAC -3'

L'amplificato è stato purificato con QIAquick PCR purification Kit, e controllato per elettroforesi su gel d'agarosio. Si è quindi proceduto ad una clonazione utilizzando il kit TOPO TA Cloning (Invitrogen). Alcuni cloni sono stati analizzati, tramite amplificazione, per verificare la presenza dell'inserito. Dopo estrazione, purificazione dei plasmidi ricombinanti e una nuova PCR, sono stati ottenuti i prodotti di amplificazione di circa 1500 pb (lunghezza nucleotidica dell'rDNA). I frammenti isolati sono stati quantificati grazie al kit PICOGREEN<sup>®</sup> ds DNA, ed in seguito sequenziati con ABI Prism 310 (Perkin-Elmer) utilizzando gli stessi oligonucleotidi HK25, HK26.

### Elaborazione dati

Le sequenze nucleotidiche ottenute sono state analizzate utilizzando un computer Apple Macintosh 4400/200 ed il programma di gestione del sequenziatore fornito dalla PE-Biosystem. In seguito i dati sono stati trasferiti su un computer IBM compatibile ed analizzati usando il programma MegAlign (DNASTAR Inc., Windows 3.06a). Le sequenze del 16S rDNA sono state inoltre confrontate con le sequenze batteriche omologhe ottenute dal Ribosomal Database Project (Maidak *et al.*, 1997). L'albero filogenetico è stato invece costruito utilizzando il programma MEGA (Kuma *et al.*, 1993).

### Analisi biochimiche

A motivo della loro natura fortemente idrofobica la maggior parte dei protocolli sinora messi a punto per l'estrazione, l'identificazione e la quantificazione delle microcistine cianobatteriche prevede una solubilizzazione iniziale in solventi organici, una purificazione parziale mediante estrazione in fase solida su resine ad interazione idrofobica (octadecilsilano) e un'analisi finale mediante cromatografia liquida ad alta pressione a fase inversa (RP-HPLC). Una simile procedura è stata utilizzata anche nel corso del presente lavoro, ed è schematizzata in figura 2.

### Estrazione metanolica

Per l'estrazione aliquote opportune della fioritura cianobatterica sono state filtrate per mezzo di un apparato a vuoto su filtri Whatman GF/A (No. 1825025) di 25 mm di diametro, lasciando applicato il vuoto fino a completa

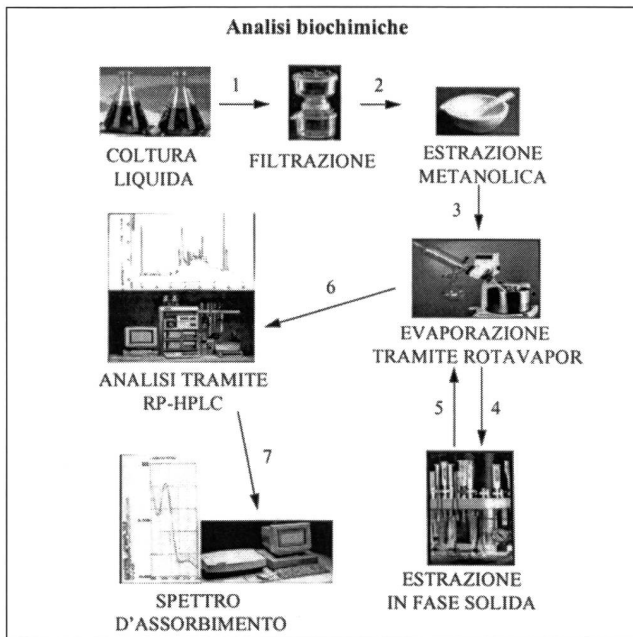


Fig. 2 - Schema della procedura sperimentale impiegata per l'identificazione della presenza di microcistine nella fioritura algale.

liofilizzazione delle cellule. Il materiale è stato staccato dal filtro con un bisturi, unito in un mortaio a 10 g g<sup>-1</sup> di sabbia di fiume ed omogenato, per mezzo di un pestello, in cinque successive estrazioni con 10 ml g<sup>-1</sup> di metanolo. Gli estratti sono stati uniti, filtrati su carta da filtro in modo da separare il materiale insolubile e mandati a secco in un apparato Rotavapor (Heidolph VV 2000/VB 2000) sotto vuoto a 45 °C. I residui ottenuti sono stati risospesi in 20 ml di metanolo 20% (v/v) ed il materiale insolubile eliminato per filtrazione attraverso un filtro di nitrocellulosa con pori da 0.2 µm.

#### Estrazione in fase solida su octadecilsilano

L'estrazione in metanolo determina la solubilizzazione anche di elevate concentrazioni di pigmenti di natura idrofobica, quali clorofille e carotenoidi. Per ottenere la loro eliminazione si è utilizzata un'estrazione in fase solida su octadecilsilano su colonne Bakerbond spe C-18 da 1 ml, attivate mediante il passaggio di 5 ml di metanolo 100% e 10 ml metanolo 20% (v/v). Aliquote degli estratti sono state caricate ad un flusso di 1 ml min<sup>-1</sup>, lavando poi in sequenza con 10 ml di metanolo 20% e 10 ml di metanolo 50%. Il materiale ancora adeso è stato infine eluito con 10 ml di metanolo 100%. L'eluato è stato mandato a secco con le modalità indicate in precedenza ed i residui risospesi in 500 µl di metanolo 20%.

#### Analisi per RP-HPLC

Dopo aver centrifugato la risospensione per 5 minuti a 8000 x g (13000 rpm), un'aliquota di 20 µl del surnatante è stata iniettata su una colonna Zorbax ODS RP-18 (4.6 x 250 mm) equilibrata in metanolo 90% : 5 mM ammonio acetato pH 5.0 in rapporto 90 : 10. Questa viene quindi eluita per 30 minuti in isocratica ad un flusso di 1

ml min<sup>-1</sup>, monitorando l'eluato a 238 nm e recuperando manualmente in tempo reale l'eluato in corrispondenza di eventuali picchi.

#### Purificazione semi-preparativa per RP-HPLC

Per ottenere il recupero di elevate quantità delle putative microcistine, tali da consentire ulteriori analisi, la suddetta procedura è stata modificata; la colonna è stata inizialmente equilibrata ad una concentrazione meno elevata di metanolo (20%) in modo da consentire una vera e propria adesione dei peptidi alla resina. L'utilizzo di un super loop in Peek ha permesso di iniettare aliquote da 1 ml; la procedura è stata reiterata più volte consentendo l'iniezione di volumi di preparato fino a 5 ml. La colonna è stata quindi lavata mediante un gradiente da 20 all'8% metanolo (6 ml) e quindi eluita come descritto. Lo spettro di assorbimento dei composti in tal modo isolati è stato misurato per mezzo di uno spettrofotometro Kontron Unikon 860. La lunghezza d'onda è stata variata mediante l'uso di un monocromatore tra 180 e 300 nm.

## RISULTATI E DISCUSSIONE

#### Analisi morfologiche dei cianobatteri

Dal momento che uno degli scopi iniziali del lavoro era una ricognizione delle specie cianobatteriche presenti nel lago di Muzzano nei diversi periodi dell'anno, i prelievi periodici alle varie profondità sono stati analizzati mediante microscopia ottica. A partire dai prelievi effettuati in maggio-giugno, si è riusciti a mettere in coltura cinque differenti specie di cianobatteri, sui quali sono state poi condotte le analisi d'identificazione morfologica, che hanno permesso la caratterizzazione dei generi: *Synechocystis* sp., *Synechococcus* sp., *Plectonema* sp., *Pseudoanabaena* sp., *Nostoc* sp.. Inoltre, a fine agosto e per tutto il mese di settembre si è sviluppata un'imponente fioritura identificata poi, sia microscopicamente che con tecniche molecolari, come *Microcystis wessenbergii*.

#### *Synechocystis* sp.

(Cl. *Cyanophyceae*; sCl. *Cocconeae*; O. *Chroococcales*; *Synechocystis* group).

Cianobatteri unicellulari che si dividono per fissione binaria, secondo due o tre piani ad angolo retto tra loro. Cellule singole, o a coppie; raramente in natura alcuni ceppi possono formare aggregati di cellule in materiale capsulare amorfo. Diametro ~3 µm.

#### *Synechococcus* sp.

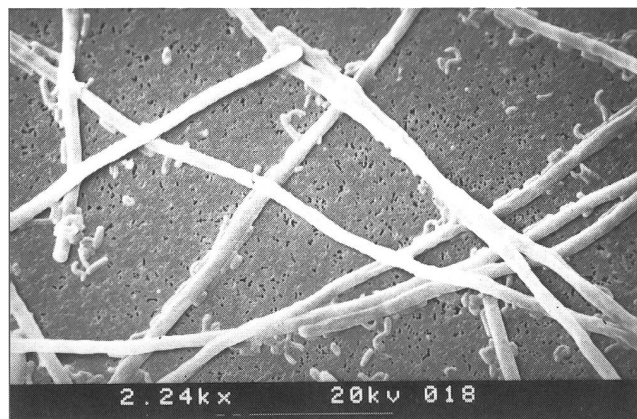
(Cl. *Cyanophyceae*; sCl. *Cocconeae*; O. *Chroococcales*; *Synechococcus* group).

Cellule singole coccoidi, talvolta a coppie, cilindriche o ellissoidali. Di colore verde-azzurro, sempre prive di guaina. Divisione binaria secondo un unico piano. Diametro inferiore ai 3 µm.

#### *Plectonema* sp.

(Cl. *Cyanophyceae*; sCl. *Hormogoneae*; O. *Oscillatoriales*; LPP group).

Ammasso cespuglioso o intrecciato di filamenti ricurvi, con cellule terminali arrotondate (Fig. 3). Cellule di colore blu-verdi, senza eterocisti e con guaina spessa, stratificata. Ramificazioni visibili, spesso a coppie o a croce. Larghezza 3-9  $\mu\text{m}$ , lunghezza 11-22  $\mu\text{m}$ . Presente soprattutto in acque stagnanti, su supporti fissi (sassi, piante acquatiche, pezzi di legno).



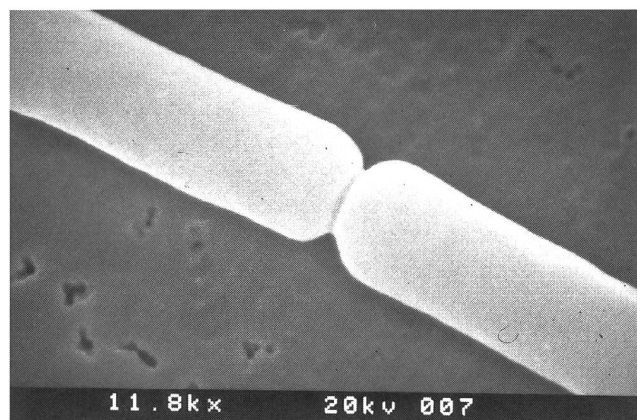
10  $\mu\text{m}$

Fig. 3 - *Plectonema gracillum* al microscopio elettronico a scansione.

***Pseudoanabaena sp.***

(Cl. *Cyanophyceae*; sCl. *Hormogoneae*; O. *Oscillatoriales*).

Le cellule sono da allungate a isodiametriche, spesso a forma di canna. Molti ceppi hanno gas vacuoli polari, ma questa caratteristica non è espressa in tutte le condizioni di coltura, e in alcuni cloni sembra sia stata persa permanentemente. Incapace di produrre eterocisti o acineti (Fig. 4). Il colore varia da blu-verde a rosso. Il diametro dei triconi è di 1-3  $\mu\text{m}$ . Riscontrata in acque termali ( $\approx 55^\circ\text{C}$ ), nei fanghi marini e in quelli d'acqua dolce; comune nei sedimenti anaerobici contenenti solfuri. Alcune forme sono conosciute nel plancton d'acqua dolce, ed alcuni ceppi sono capaci di sintetizzare nitrogenasi quando le colture sono in anaerobiosi.



1  $\mu\text{m}$

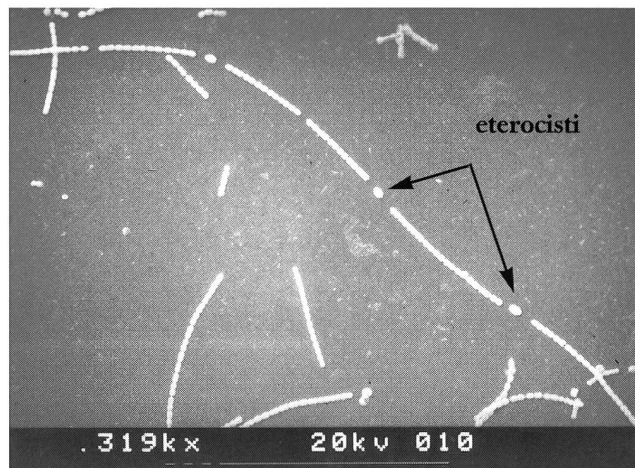
Fig. 4 - *Pseudoanabaena sp.* al microscopio elettronico a scansione.

***Nostoc sp.***

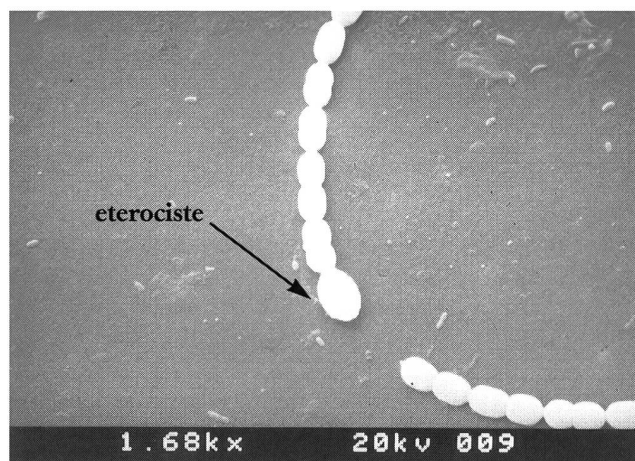
(Cl. *Cyanophyceae*; sCl. *Hormogoneae*; O. *Nostocales*).

Cianobatterio filamentoso, che fissa l'azoto atmosferico mediante la formazione di eterocisti, ben visibili nelle immagini al microscopio elettronico a scansione (Fig. 5).

In acqua dolce è ricco di vacuoli gassosi che permettono il galleggiamento superficiale. Alcuni ceppi sono planctonici, altri invece vivono in simbiosi con vegetali superiori.



100  $\mu\text{m}$



10  $\mu\text{m}$

Fig. 5 - *Nostoc sp.* visto al microscopio elettronico a scansione.

***Microcystis wesenbergii***

(Cl. *Cyanophyceae*; sCl. *Cocconeae*; O. *Chroococcales*; *Synechococcus* group).

Cellule singole coccoidi, che possono aggregarsi protette da una guaina, in particolare quando formano le fioriture superficiali. Posseggono vacuoli gassosi che permettono loro il galleggiamento superficiale. Possono produrre microcistine epatotossiche. Colore verde-blu. Diametro  $\sim 3 \mu\text{m}$  (Fig. 6 e 7).



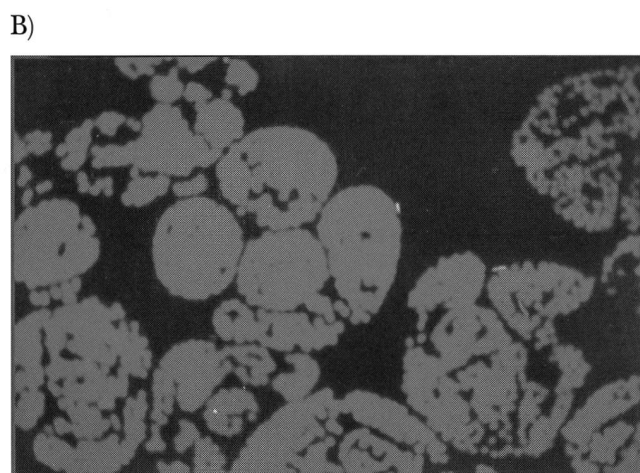
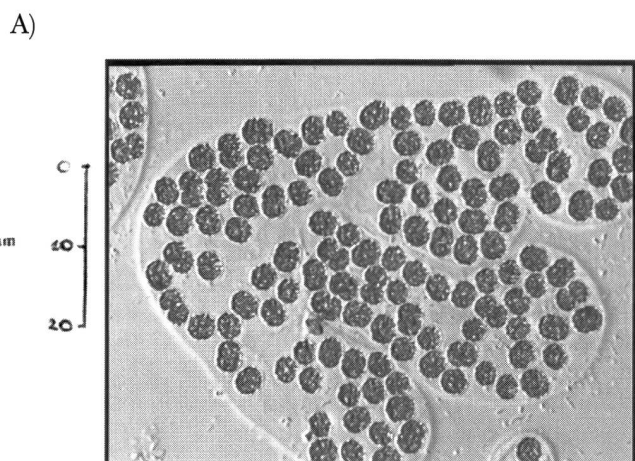


Fig. 6 - *Microcystis wesenbergii* al microscopio ottico A) a luce trasmessa, B) ad epifluorescenza con filtro per le ficocianine e le coeocitrine.

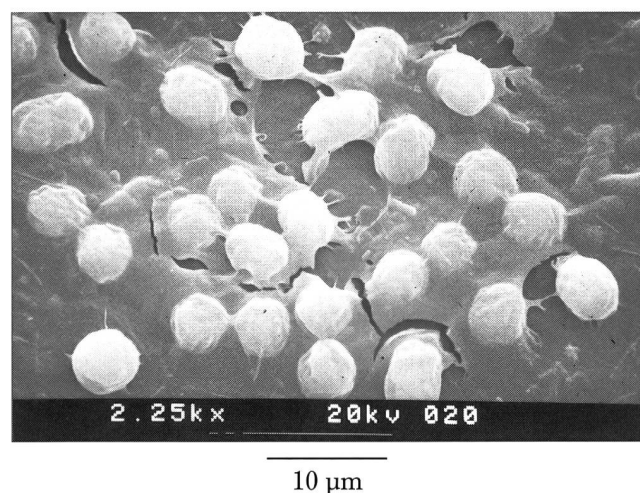


Fig. 7 - *Microcystis wesenbergii* al microscopio elettronico a scansione.

**Sequenziamento del gene per l'RNA ribosomiale 16S e confronto con le sequenze depositate in banche dati**

Dalla fioritura cianobatterica di *Microcystis wesenbergii* è stato estratto il DNA genomico, ed i geni del 16S rDNA sono stati amplificati tramite PCR utilizzando due oligonucleotidi specifici: HK25 e HK26. L'amplificato purificato è

stato clonato ottenendo 160 cloni. Le prime 32 colonie di questi cloni sono state analizzate tramite amplificazione, estrazione dei plasmidi ricombinanti e purificazione dai quali è stato possibile mettere in evidenza sette prodotti di amplificazione di circa 1500 pb (Fig. 8).

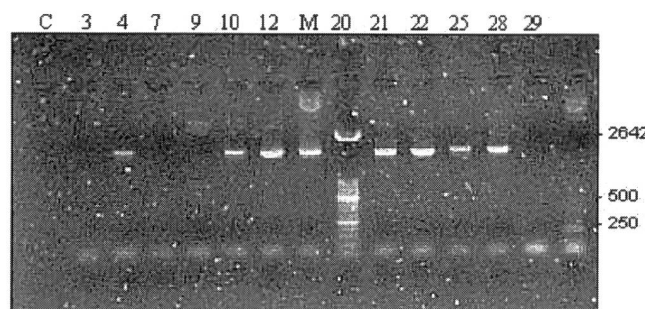


Fig. 8 - Gel di agarosio con i sette frammenti di rDNA di 1500 pb (C corrisponde al controllo negativo, M è il marcatore  $\lambda$ -Hind III).

I sette frammenti isolati sono stati quantificati e quindi sequenziati. La sequenza dei frammenti clonati, confrontata con la banca dati EMBL, ha dimostrato di corrispondere al 100% alla sequenza depositata con il numero di accesso D89034 del 16S rDNA di *Microcystis wesenbergii* NIES 111 determinata da KONDO *et al.*, 1996 (Fig. 9 e 10).

```
5':tcttaacgtaaacgttataatgcaagtcgaacgggaattctcggtattctagtgccggacggg-
tagtaacgcgtaagaatctaactcaggacggggacaacagttggaaaacgactgtaataacc-
gatgtccgcaaggtgaaacctaattggcctggagaagagctgcgtctgattagctagttgggggg-
taaaggcctaccaaggcgacgatcagtagctgtctgagaggatgagcagccacactgggactgag
acacggcccagactcctacgggaggcagcagtggggaatttccgcaatggcgaaagcctgacg-
gagcaacgcctcgtgaggggaggaaaggtctttgattgtaaacctctttctcaaggaagaagttct-
gacggtaactgaggaatcaacctcggtaactccgtgccaacaaccgcggtataacgggggggg-
tagcggtatccggaattattgggcgtaaacgctccgcaggtggtagcaaacgctcgcctcaaatcag
gtgcttaacgacctaaggcgtggaaactggcaactataaacattaggggtagcaaggattcc-
cattttaccggtgaaatccgtaaaaattggggaagaactcgggtggcgaaagcgtg-
catctgggctgttctgacactcagggacaaaattaggggagcgaaggatt:3'
```

Fig. 9 - Frammento di rDNA 16S (pos. 21-721 pb) ottenuto.

Questo risultato ha quindi confermato l'identificazione morfologica di *M. wesenbergii* (BOTTINELLI *et al.*, 1998a-1998b).

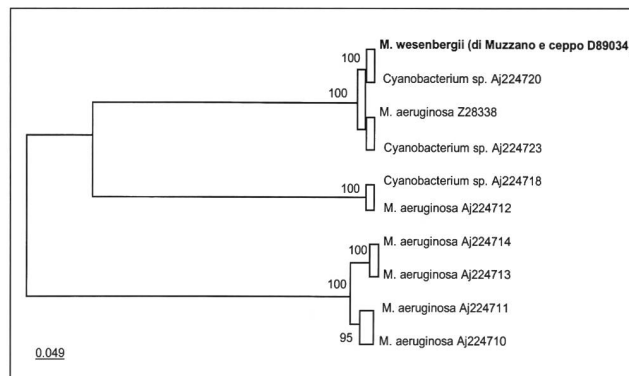


Fig. 10. Albero filogenetico ottenuto utilizzando il programma MEGA (Kuma *et al.*, 1993), che conferma l'omologia tra le sequenze presenti nel Ribosomal Database Project (Maidak *et al.*, 1997) e quella di *M. wesenbergii* ottenuta dal Lago di Muzzano.

### Determinazione della presenza di microcistine in estratti della fioritura e loro stima quantitativa

Per verificare la possibile presenza nella fioritura di tossine epatotossiche, si è ricorsi ad una separazione dei componenti di un estratto metanolico della fioritura e alla loro caratterizzazione spettrofotometrica. La presenza nella composizione di queste tossine, quale elemento invariante, di un amminoacido non convenzionale, l'Adda, con un caratteristico picco di assorbimento a 238 nm, può infatti consentire con buona approssimazione l'identificazione di questi metaboliti (LAWTON *et al.*, 1994). Non disponendo degli opportuni standard si è deciso di mettere inizialmente a punto il metodo utilizzando come controllo positivo un ceppo di *M. aeruginosa* (PCC7941) che dai dati in letteratura è noto produrre le microcistine-RR e -LR. Seguendo la metodologia descritta è stato possibile ottenere un profilo di eluizione a 238 nm del preparato ottenuto da una coltura axenica di *M. aeruginosa*, consentendo di evidenziare effettivamente la presenza di due picchi prominenti. La determinazione della loro assorbanza ad una lunghezza d'onda compresa tra 180 e 300 nm ha mostrato uno spettro molto simile a quello pubblicato per questi composti (dati non mostrati).

La medesima procedura effettuata con un estratto metanolico ottenuto dalla fioritura ha messo in evidenza la presenza di almeno cinque sostanze con un massimo di assorbanza a 238 nm (vedi cromatogramma fig. 10), due delle quali non risolte (picchi 2 e 3).

Il confronto tra i cromatogrammi ottenuti con modalità rigorosamente identiche da estratti di *Microcystis aeruginosa* coltivata *in vitro* e della fioritura del lago di Muzzano suggerisce che una delle tossine presenti in quest'ultima sia la microcistina-LR, dal momento che entrambi i composti eluiscono con il medesimo tempo di ritenzione (dati non mostrati). È stato inoltre possibile stimare il recupero di circa 140 nmol complessive di questi composti a partire dall'estrazione del materiale contenuto in 10 ml di fioritura. Questo potrebbe rappresentare una sottostima della quantità effettivamente presente.

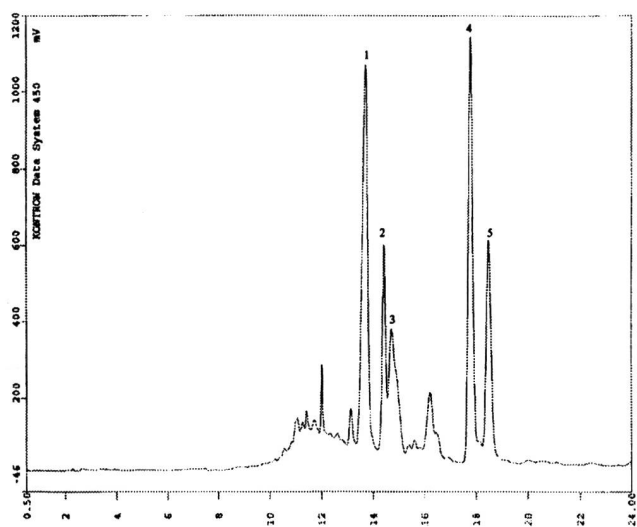


Fig. 11 - Profilo di eluizione a 238 nm di un'aliquota da 1 ml di estratti metanolici preparati dalla fioritura di *M. wesenbergii*.

Ad ogni modo un simile valore indica la presenza nella fase più densa della fioritura, vicino alla superficie, di una concentrazione di epatotossine non inferiore a  $10^{-5}$  M. Un valore così elevato, dal momento che questi inibitori risultano in grado di bloccare l'attività della fosfatasi di tipo 1 e 2A a concentrazioni infinitesimali comprese tra  $10^{-9}$  e  $10^{-7}$  M (MACKINTOSH *et al.* 1990), porta ad ipotizzare che l'ingestione anche di piccole quantità di questo materiale da parte della fauna lacustre possa effettivamente determinare l'insorgenza di fenomeni di tossicità acuta o di accumulo lungo la catena alimentare.

### CONCLUSIONI

Le analisi limnologiche effettuate sul lago di Muzzano, nell'arco di un anno indicano che si tratta di un ecosistema ipertrofico. Le condizioni del mese di agosto (1997) sono state ulteriormente analizzate in quanto dovrebbero aver fortemente stimolato lo sviluppo dei cianobatteri, ed in particolare della specie dominante nella fioritura: *Microcystis wesenbergii*. Per lo sviluppo di questa fioritura sembrano essere state determinanti le condizioni di scarsa pluviometria, poco vento, buon irraggiamento luminoso unite ad un elevato pH (tra 8 e 9), un'elevata temperatura ( $\sim 26^{\circ}\text{C}$ ), elevate concentrazioni di ortofosfati [ $0.04 \text{ mg l}^{-1}$ ] e tenori relativamente ridotti di nitrati [ $0.7 \text{ mg l}^{-1}$ ] e ammonio [ $0.01\text{-}0.02 \text{ mg l}^{-1}$ ].

Le analisi molecolari compiute hanno permesso, tramite il sequenziamento del gene codificante il 16S rRNA, di caratterizzare filogeneticamente come *M. wesenbergii* l'unico morfotipo algale presente nella fioritura. Inoltre, tramite estrazione metanolica ed analisi per RP-HPLC, è stato possibile mettere in evidenza nella fioritura cianobatterica la presenza di almeno cinque presunte microcistine.

Il ceppo individuato è stato spesso isolato come responsabile di fioriture tossiche nei paesi asiatici ed il fatto che si siano individuate microcistine fra le quali la potente microcistina-LR fa presupporre che una simile fioritura cianobatterica possa rappresentare un rischio per coloro che svolgono attività ricreative nel laghetto, o che si cibano dei pesci ivi contenuti. È auspicabile dunque la prosecuzione di un monitoraggio che possa segnalare in tempo reale il ripetersi di questi fenomeni, consentendo la messa in atto di opportune norme di tutela della salute pubblica.

### Ringraziamenti

Ringrazio tutti i collaboratori del Dipartimento di Genetica e Microbiologia dell'Università di Pavia e dell'Istituto Cantonale Batteriosierologico di Lugano.

Inoltre ringrazio la dottoressa M.C. Margheri del Dipartimento di Microbiologia del C.N.R. di Firenze ed il professor Hans R. Preisig dell'Abteilung für Systematische Botanik am Institut für Pflanzenbiologie und Botanischer Garten der Universität Zürich per il loro aiuto datomi nell'identificazione delle diverse specie di cianobatteri; di nuovo quest'ultimo per la prima fotografia in figura 7 ed il dottore Josef Niederberger (dell'Abteilung für Systematische Botanik am Institut für Pflanzenbiologie und Bota-



nischer Garten der Universität Zürich) per averci concesso le sequenze degli oligonucleotidi utilizzati per il sequenziamento del gene dell'rRNA ribosomale 16S di *Microcystis sp.* (HK25 e HK26).

Infine ringrazio la Pro Natura per l'autorizzazione ad effettuare le analisi ed i prelievi sul laghetto di Muzzano.

## BIBLIOGRAFIA

- BHATTACHARYA R., RAO P.V., BHASKAR A.S., PANT S.C., DUBE S.N., 1996. Liver slice culture for assessing hepatotoxicity of freshwater cyanobacteria. *Hum. Exp. Toxicol.* 15: 105-110.
- BOTTINELLI M., ISENBURG C., FORLANI G., TONOLLA M., DEMARTA A., CRIVELLI C., PEDUZZI R., SANANGELANTONI A.M., 1998A. Toxic's bloom of cyanobacteria *Microcystis wessenbergii* in Lake Muzzano (TI), Switzerland. *Atti del congresso dell'Accademia Svizzera di Scienze Naturali, «La ricerca alpina e le traversali»*, 23-26 settembre, Airolo, San Gottardo, Piora: 3.
- BOTTINELLI M., CAMPANI A., VEZZANI L., FORLANI G., TONOLLA M., ISENBURG C., PEDUZZI R., SANANGELANTONI A.M., 1998B. Fioriture tossiche di cianobatteri della specie *Microcystis wessenbergii* in un piccolo lago prealpino. *Atti del convegno congiunto ABCD-AGI-SIBBM-SIMGBM 1-4 ottobre*, Montesilvano Lido: 258.
- BROSJUS J., ULLRICH A., RAKER M.A., GRAY A., DULL T.J., GUTTELL R.R., NOLLER H.F., 1981. Construction and fine mapping of recombinant plasmid containing the *rrnB* ribosomal operon of *E.coli*. *Plasmid*, 6:112-118.
- CARMICHAEL W.W., 1994. Le tossine dei cianobatteri. *Le Scienze* 307: 22-29.
- CODD G.A., BROOKS W.P., PRIESTLY I.M., POON G.K., BELL S.G., 1989. Production, detection and quantification of cyanobacterial toxins. *Toxicity Assessment* 4: 499-511.
- DITTMANN E., MEIBNER K., BÖRNER T., 1996. Conserved sequences of peptide synthetase genes in the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. *Phycologia* 35: 62-67.
- DITTMANN E., NEILAN B.A., ERHARD M., VON DÖHREN H., BÖRNER T., 1997. Insertional mutagenesis of a peptide synthetase gene which is responsible for hepatotoxin synthesis in the cyanobacterium *Microcystis PCC7806*. *Mol. Microbiol.* 26: 779-787.
- ERHARD M., VON DÖHREN H., JUNGBLUT P., 1997. Rapid typing and elucidation of new secondary metabolites of intact cyanobacteria using MALDI-TOF mass spectrometry. *Nature Biotech.* 15: 906-909.
- FRANCHE C., DEMERVAL T., 1988. Tests on *nif* probes and DNA hybridization. *Methods in Enzymology* 167: 803-808.
- HARADA K.I., MATSUURA K., SUZUKI M., WATANABE M.F., OISHI S., DAHLEM A.M., BEASLEY V.R. AND CARMICHAEL W.W., 1990. Isolation and characterisation of the minor components associated with microcystins LR and RR in the cyanobacterium (blue-green algae). *Toxicon* 28: 55-64.
- HOOSER S.B., KUHLENSCHMIDT M.S., DAHLEM A.M., BEASLEY V.R., CARMICHAEL W.W. AND HASCHKEK, 1991. Uptake and subcellular localization of tritiated dihydro-microcystin LR in rat liver. *Toxicon* 29: 589-601.
- KONDO R., KOMURA M., HIROSHI S., HATA Y., 1996. Submitted to the DDBJ / EMBL / Genbank databases. Numero d'accesso: D89034.
- KUMASU, TAMURA K., NEI M., 1993. MEGA: Molecular Evolution Genetic Analysis, version 1.0. The Pennsylvania State University Park, PA 16802.
- LAWTON L.A., EDWARDS C. AND CODD G.A., 1994. Extraction and high-performance liquid chromatographic method for the determination of microcystin in raw and treated waters. *Analyst.* 119: 1525-1530.
- MACKINTOSH C., BEATTIE K.A., KLUMPP S., COHEN P. AND CODD G.A., 1990. Cyanobacterial microcystin-LR is a potent and specific inhibitor of protein phosphatases 1 and 2A from both mammals and higher plants. *FEBS Lett.* 264: 187-192.
- MAIDAK B.L., OLSEN G.J., LARSEN N., OVERBEEK R., MCCAUGHEY M.J., WOESE C.R., 1997. The RDP (Ribosomal Database Project). *Nucleic Acids Res.*, 25: 109-111.
- MEIBNER K., DITTMANN E., BÖRNER T., 1996. Toxic and non-toxic strains of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* contain sequences homologous to peptide synthetase genes. *FEMS Microbiol. Lett.* 135: 295-303.
- NAMIKOSHI M., RINEHART K.L., SAKAI R., SIVONEN K., CARMICHAEL W.W., 1990. Structures of three new cyclic heptapeptide hepatotoxins produced by the cyanobacterium (blue-green alga) *Nostoc sp.* strain 152. *J. Org. Chem.* 55: 6135-6139.
- NEILAN B.A., JACOBS D., GOODMAN A.E., 1995. Genetic diversity and phylogeny of toxic cyanobacteria determined by DNA polymorphisms within the phycocyanin locus. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 3875-3883.
- NEILAN B.A., JACOBS D., DEL DOT T., BLACKALL L.L., HAWKINS P.R., COX P.T., GOODMAN A.F., 1997. rRNA sequences and evolutionary relationships among toxic and non-toxic cyanobacteria of genus *Microcystis*. *J. Syst. Bact.* 47: 693-697.
- NEILAN B.A., DITTMANN E., ROUHIAINEN L., BASS A., SCHAUB V., SIVONEN K., BÖRNER T., 1999. Nonribosomal peptide synthesis and toxigenicity of cyanobacteria. *J. Bact.* 183: 4089-4097.
- NISHIZAWA T., ASAYAMA M., FUJII K., HARADA K.-I., SHIRAI M., 1999. Genetic analysis of the peptide synthetase genes for cyanobacterial heptapeptide microcystin in *Microcystis spp.* *J. Biochem.*, 126: 520-529.
- OTSUKA S., SUDA S., LI R., WATANABE M., OYAZU H., MATSUMOTO S., WATANABE M.M., 1999. Phylogenetic relationships between toxic and non-toxic strains of the genus *Microcystis* based on 16S to 23S internal transcribed spacer sequence. *FEMS Microbiol. Lett.* 172: 15-21.
- RINEHART K.L., NAMIKOSHI M., CHOI B.W., 1994. Structure and biosynthesis of toxins from blue-green algae (cyanobacteria). *J. Appl. Phycol.* 6: 159-176.
- RIPPKA R., 1988. Isolation and purification of cyanobacteria. *Methods in Enzymology* 167: 3-27.
- ROHRLACK T., DITTMANN E., HENNING M., BÖRNER T., KOHL J.-G., 1999. Role of microcystins in poisoning and food ingestion inhibition of *Daphnia galeata* caused by the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 737-739.
- ROUHIAINEN L., SIVONEN K., BUIKEMA W.J., HASELKORN R., 1995. Characterization of toxin-producing cyanobacteria by using an oligonucleotide probe containing a tandemly repeated heptamer. *J. Bacteriol.* 177: 6021-6026.
- RUNNEGAR M.T.C., GERDES R.G., FALCONER I.R., 1991. The uptake of the cyanobacterial hepatotoxin microcystin by isolated rat hepatocytes. *Toxicon* 29: 43-51.
- TSUJI T., OHKI K., FUJITA Y., 1986. Determination of photosynthetic pigment composition in an individual phytoplankton cell in seas and lakes using fluorescence microscopy; properties of the fluorescence emitted from picophytoplankton cells. *Marine Biology* 93: 343-349.
- WARD J.C., BEATTIE K.A., LEE E.Y.C., CODD G.A., 1997. Colorimetric protein phosphatase inhibition assay of laboratory strains and natural blooms of cyanobacteria: comparisons with high-performance liquid chromatographic analysis for microcystins. *FEMS Microbiol. Lett.* 153: 465-473.
- WOESE C.R., 1994. There must be a Prokaryote somewhere: microbiology's search for itself. *Microbiol. Rev.* 58: 1-9.

