

## Caratterizzazione e analisi delle proprietà ottiche dei cianobatteri lacustri

Mariano Bresciani<sup>\*</sup>, Rosaria Lauceri<sup>\*\*</sup>, Erica Matta<sup>\*</sup>, Monica Pinardi<sup>\*</sup>, Andrea Lami<sup>\*</sup>, Martina Austoni<sup>\*\*</sup>, Gianluca Persichetti<sup>\*\*\*</sup>, Ciro Manzo<sup>\*\*\*\*</sup>, Romeo Bernini<sup>\*\*\*</sup>, Genni Testa<sup>\*\*\*</sup>, Giovanni Onorato<sup>\*\*\*</sup>, Ilaria Cazzaniga<sup>\*</sup>, Claudia Giardino<sup>\*</sup>, Emanuela Viaggiu<sup>\*\*\*\*\*</sup>, Roberta Congestri<sup>\*\*\*\*\*</sup>, Mauro Musanti<sup>\*</sup>, Giuseppe Morabito<sup>\*\*</sup>

(\*) Istituto per il Rilevamento Elettromagnetico dell'Ambiente, CNR-IREA, via Bassini 15, 20133 Milano, tel 02-23699298; e-mail: bresciani.m@irea.cnr.it

(\*\*) Istituto per lo Studio degli Ecosistemi, CNR-ISE, Largo Tonolli 50-52, 28922 Pellanza (VB), tel. 0323-518300, e-mail: r.lauceri@ise.cnr.it; g.morabito@ise.cnr.it

(\*\*\*) Istituto per il Rilevamento Elettromagnetico dell'Ambiente, CNR-IREA, Via Diocleziano 328 - 80124 Napoli; e-mail: persichetti.g@irea.cnr.it

(\*\*\*\*) Istituto sull'Inquinamento Atmosferico, CNR-IAA, Via Salaria Km 29,300, 00016, Monterotondo Scalo, Roma; e-mail: manzociro@gmail.com

(\*\*\*\*\*) Dipartimento di Biologia, Università di Roma, Tor Vergata, e-mail: viaggiu@uniroma2.it; roberta.congestri@uniroma2.it

### Sommario

Negli ultimi vent'anni le fioriture di cianobatteri nei laghi sono aumentate in frequenza ed intensità, causando impatti negativi a livello ecologico, biogeochimico e igienico-sanitario. Al fine di migliorare la conoscenza delle fioriture dei cianobatteri nelle acque dei laghi italiani, è in corso il progetto BLASCO (Blending Laboratory and Satellite techniques for detecting Cyanobacteria), che ha come obiettivo la caratterizzazione delle fioriture di cianobatteri potenzialmente tossici tramite l'integrazione di misure in laboratorio e l'utilizzo d'immagini ottiche satellitari e aviotrasportate.

In laboratorio, sono state caratterizzate le proprietà ottiche (assorbimento, fluorescenza, back-scattering, riflettanze) di otto differenti specie di cianobatteri, secondo un gradiente di diluizione e in diverse condizioni di temperatura e intensità luminosa.

L'analisi del data-set ha permesso l'implementazione di algoritmi semi-empirici specifici per la quantificazione dei differenti pigmenti dei cianobatteri e la parametrizzazione della modellistica bio-ottica dedicata alla mappatura dei cianobatteri nelle acque lacustri da immagini ottiche.

### Abstract

In the last twenty years the blooms of cyanobacteria in lakes have increased in frequency and intensity, causing negative impacts on ecological, biogeochemical and sanitation. In order to improve knowledge of the blooms of cyanobacteria in the waters of the Italian lakes, the project BLASCO (Blending and Satellite Laboratory techniques for detecting cyanobacteria) is in progress, which is aimed at the characterization of potentially toxic cyanobacteria blooms through the integration of laboratory measurements and the use of satellite and airborne optical images.

The optical properties (absorption, fluorescence, back-scattering, reflectance) of eight different species of cyanobacteria have been characterized in laboratory experiments, according to a dilution gradient and in different conditions of temperature and light intensity.

The analysis of the data set has allowed the implementation of specific semi-empirical algorithms for the quantification of the different pigments of cyanobacteria and parameterization of bio-optical modeling dedicated to the mapping of cyanobacteria on lake from optical images.

## Introduzione

La stima delle proprietà ottiche dei cianobatteri permette di caratterizzare il modo in cui questi organismi assorbono e riflettono la radiazione luminosa incidente (Mishra et al., 2009). La quantità e la qualità della luce assorbita, riflessa e riemessa come fluorescenza dipende dal tipo di pigmenti fotosintetici che questi organismi possiedono (Simis et al., 2005), ma anche dalla forma e dalle dimensioni delle loro cellule e/o colonie e dalle loro caratteristiche fisiologiche, come la presenza di vacuoli (Matthews e Bernard, 2013).

La più importante caratteristica ottica che contraddistingue i cianobatteri è la presenza delle ficobiliproteine. Questi pigmenti (ficoeritrina, ficocianina, e alloficocianina) sono fondamentali per l'assorbimento di alcune frequenze della radiazione luminosa e la loro trasmissione, come energia di eccitazione, alla Clorofilla-a (Chl-a) (Golbeck et al., 1991; Jupp et al., 1994).

I cianobatteri, grazie alle ficobiliproteine presentano picchi di assorbimento spettrale che li contraddistinguono dagli altri gruppi fitoplanctonici. Le ficocianine (PC) presentano un massimo di assorbimento intorno a 620 nm, le alloficocianine (APC) intorno a 650 nm e le ficoeritrine (PE) a 565 nm. Questi pigmenti formano un grande complesso proteico che trasferisce energia principalmente a centri di reazione del fotosistema II (Ibelings et al., 1994).

La produzione e le caratteristiche dei pigmenti accessori dipendono sia dalle specie sia dalle condizioni ambientali (l'intensità della luce, qualità della luce, e la disponibilità di nutrienti) e condizionano fortemente il segnale di riflettanza che emerge dalle acque. Questa variabilità naturale dovrebbe essere tenuta presente quando si utilizzano algoritmi di telerilevamento che colpiscono i pigmenti accessori per quantificare la biomassa dei cianobatteri.

La riflettanza acquisita "in situ/laboratorio" è un parametro, la cui accurata stima è indispensabile per la validazione delle performance radiometriche delle immagini satellitari e/o aviotrasportate, per la calibrazione vicaria e per la validazione della correzione atmosferica, nonché per lo sviluppo e la validazione degli algoritmi sia semi-empirici che analitici (Hommerson et al., 2012; Brando et al., 2015).

La stima dei cianobatteri con PC da satellite utilizza prevalentemente le caratteristiche di assorbimento e riflettanza da 620 a 650 nm per l'implementazione di rapporti di bande tra riflettanza e concentrazioni di PC e/o per l'implementazione di modelli semi-analitici (Kutser, 2004; Song et al., 2013; Schalles e Yacobi, 2000; Dekker 1993).

L'obiettivo principale del progetto BLASCO (Blending and Satellite Laboratory techniques for detecting cyanobacteria), finanziato dalla fondazione CARIPLO, che si concluderà nel 2017, è lo sviluppo di una metodologia in grado di identificare la presenza di cianobatteri potenzialmente tossici nei laghi e di seguirne le dinamiche fisiologiche, spaziali e temporali. La conoscenza delle caratteristiche dei cianobatteri si basa sull'integrazione di osservazioni di laboratorio, in situ e satellitari utilizzando differenti tecniche di misura (radiometriche, fluorimetriche, citologiche, ecc.). La ricerca ha permesso e permetterà di individuare e sviluppare nuove metodologie d'analisi per la caratterizzazione dei cianobatteri, fornire elementi per la messa a punto di strumenti di allarme precoce, per prevenire possibili effetti nocivi delle fioriture e suggerire potenziali strategie per il contenimento dei fenomeni di fioritura algale.

In particolare, in questo lavoro vengono presentate le misure effettuate su differenti colture di cianobatteri, che hanno permesso la loro caratterizzazione ottica, l'implementazione di algoritmi semi-empirici e la parametrizzazione di modelli semi-analitici dedicati ai cianobatteri.

## Materiali e metodi

Colture di specie di cianobatteri diverse sono state diluite, in rapporti decrescenti tra concentrazione di organismi e terreno liquido specifico (BG11), in modo da simulare diverse situazioni di densità cellulare osservabili in natura.

Le specie considerate sono state: *Anabaena flos-aquae*, *Anabaena viguieri*, *Microcystis aeruginosa* (strains 1785 e 1885), *Planktothrix rubescens*, *Synechococcus* sp., *Synechocystis* sp. e

*Cylindrospermopsis* sp.. La scelta delle specie è stata effettuata in maniera tale da avere a disposizione organismi con ficocianine e con ficoeritrine, ed anche in modo che fosse rappresentativa delle specie che hanno fatto registrare maggiori fenomeni di fioritura nei laghi del Nord Italia (Bresciani et al., 2016).

Le densità cianobatteriche di tutte le colture sono state determinate tramite il conteggio cellulare utilizzando un microscopio ad inversione (ingrandimento 400x) in accordo con Utermöhl (1958). Le concentrazioni di Chl-a sono state determinate sia tramite metodo spettrofotometrico in accordo con Lorenzen (1967) che tramite analisi con High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) in accordo con Guilizzoni (2011). Le concentrazioni di PC sono state determinate spettrofotometricamente e quantificate con l'equazione di Bennett e Bogorad (1973). Attraverso la metodologia della *filter path technique* (Kishino et al., 1985) per ogni coltura di cianobatteri sono stati misurati gli spettri di assorbimento  $a_{ph}(\lambda)$ , specifici tramite la divisione rispetto alla concentrazione dei pigmenti fotosintetici considerati  $a^*_{phPC}(\lambda)$ .

Le misure di radianza e di riflettanza sono state effettuate con gli spettroradiometri FieldSpec ASD-FR e SpectralEvolution nell'intervallo spettrale compreso tra i 400 e i 2500 nm con field of view (FOV) rispettivamente di 5° e 2°. Le misure di riflettanza sono state effettuate in laboratorio tramite l'utilizzo di apposite luci a LED CREE e con pannello Spectralon calibrato.

Al fine di effettuare al meglio le misure si è utilizzata una base in neoprene per evitare l'influenza della vetreria sul segnale di riflettanza. Le distanze tra il campione, le lampade e il sensore sono state mantenute costanti per ogni differente set di misura e le misure sono state effettuate mantenendo le ottiche ad una angolazione costante di 40° rispetto alla fonte di illuminazione e la superficie della coltura di cianobatteri (Fargion e Mueller, 2000).

La fluorescenza è stata misurata con un fluorimetro BBE-Fluoroprobe, e tramite l'utilizzo di due LED con lunghezza d'onda di emissione a 265nm e una fibra ottica di 600  $\mu\text{m}$  di diametro, per la raccolta del segnale di fluorescenza, in cui il sistema di raccolta della fluorescenza fosse ortogonale rispetto alla direzione di eccitazione. È stato utilizzato un tempo di integrazione di 1s e per ogni set di misura sono state effettuate 5 repliche.

Il data-set spettrale è stato ri-campionato sulla base delle caratteristiche radiometriche dei sensori satellitari di nuova generazione, Sentinel-3 (S-3), Sentinel-2 (S-2) e Landsat-8 (L-8) al fine di valutare la capacità da parte di questi sensori di poter discriminare e quantificare i cianobatteri nelle acque.

Il data set di proprietà ottiche inerenti è stato utilizzato per effettuare una simulazione con metodo di Montecarlo (Manzo et al., 2015) effettuata inserendo come input differenti assorbimenti spettrali di cianobatteri, assorbimenti di altri gruppi fitoplanctonici e delle sostanze organiche colorate disciolte oltre che al coefficiente di backscattering. Sono state effettuate 5000 simulazioni per valutare come al variare delle percentuali dei differenti gruppi algali variasse la firma spettrale e quale fosse l'interazione dei vari gruppi sulla firma spettrale ottenuta.

Colture di *Anabaena lemmermannii* sono state analizzate dopo essere state mantenute, per sette giorni, in condizioni di illuminazione diverse. In particolare, la coltura iniziale è stata suddivisa in due aliquote, un'aliquota è stata mantenuta a bassa intensità luminosa e l'altra ad intensità luminosa più elevata, ciò allo scopo di indurre risposte fisiologiche diverse, quali la maggiore sintesi di pigmenti a basse intensità o fenomeni di foto-inibizione (ridotte capacità di utilizzare la radiazione luminosa) ad intensità più elevate.

## Risultati

L'analisi degli assorbimenti specifici per i vari pigmenti dei cianobatteri ha permesso di creare una banca dati utile (Fig. 1a) per la parametrizzazione dei modelli bio-ottici, per la valutare la variabilità intraspecifica probabilmente dovuta alla morfologia delle differenti cellule e al loro stato di aggregazione (Sathyendranath et al., 1987) e per comprendere il contributo dei differenti pigmenti.

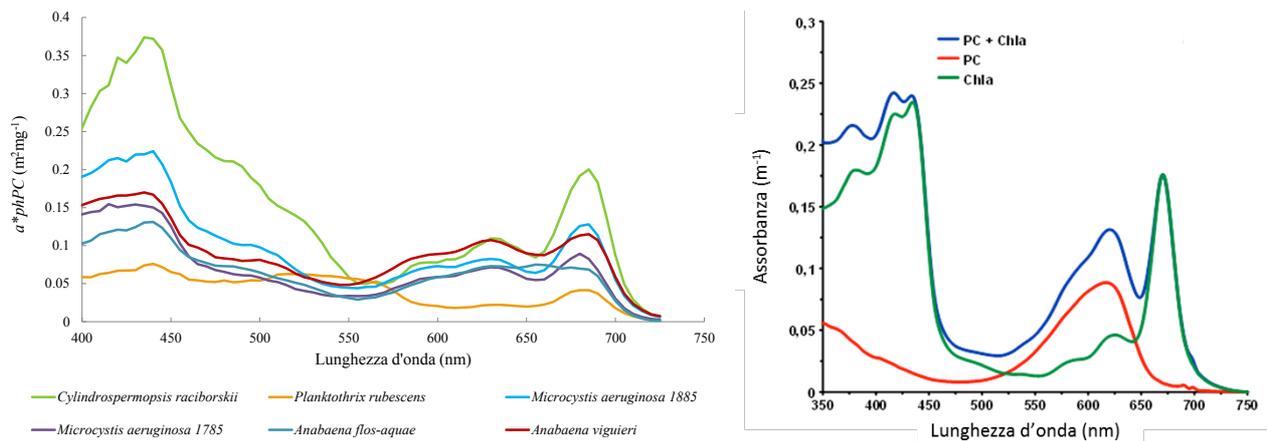


Figura 1: a) assorbimenti specifici di differenti specie di cianobatteri estratti con acetone al 90% e ottenuti tramite filter path technique; b) valori di assorbanza dei differenti pigmenti di *Microcystis aeruginosa* in tampone fosfato.

Gli assorbimenti specifici saranno utilizzati su differenti tipologie d'immagini satellitari tramite l'utilizzo del tool BOMBER (Giardino et al., 2012).

L'analisi di sensibilità dei modelli bio-ottici ha evidenziato come l'interazione è molto elevata nella regione in cui è presente la Chl-a, oltre il 20% nella regione compresa tra i 500 e i 550 nm e circa del 45% attorno ai 700 nm, pigmento presente in tutti i differenti gruppi di fitoplancton. In queste regioni risulta difficile poter discriminare il contributo dei differenti gruppi algali. L'interazione diminuisce (circa del 10%) nel range compreso tra i 580 e 650 nm, regione d'interesse dei cianobatteri. Questi risultati testimoniano come i pigmenti secondari dei cianobatteri possano essere discriminati e quantificati tramite l'analisi spettrale. Per fare questo però è necessario che i sensori abbiano una caratteristica spettrale adeguata.

L'analisi di simulazione delle firme spettrali, associata alle firme acquisite in laboratorio (Fig. 2), tutte ri-campionate secondo le caratteristiche radiometriche e spettrali dei sensori satellitari L-8 e S-2 e S-3, ha permesso di evidenziare come il Sentinel-3 sia idoneo per la caratterizzazione dei pigmenti dei cianobatteri. Il Sentinel-2 invece permette la discriminazione della Chl-a e solo in modo indiretto la presenza degli altri pigmenti fotosintetici secondari.

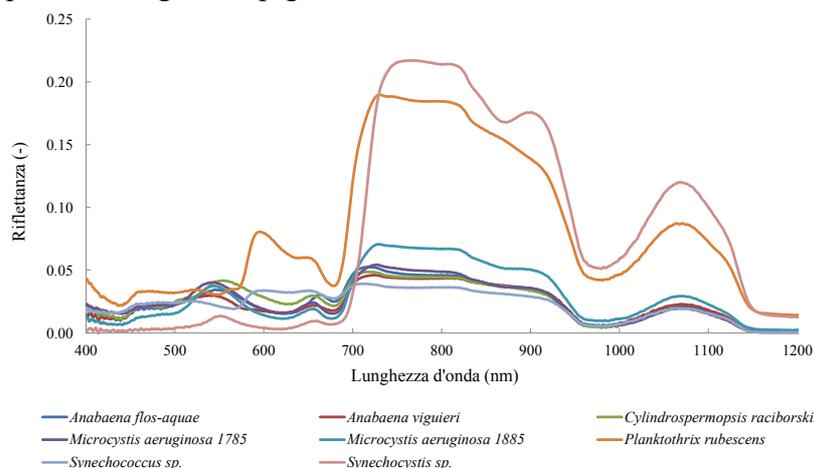


Figura 2. Firme spettrali acquisite su differenti specie di cianobatteri.

L'analisi delle firme spettrali di laboratorio ha evidenziato la variabilità per le ficocianine e le alloficocianine dei picchi di massimo assorbimento (620-635 nm), dell'emissione in fluorescenza (653-660 nm) e di riflettanza (650-662 nm) in funzione delle diverse specie e delle diverse concentrazioni. Il massimo di riflettanza dovuto alla presenza di Chl-a e al backscattering delle

particelle fitoplanctoniche nella regione attorno ai 700 nm si sposta verso lunghezze d'onda maggiori con l'aumentare della concentrazione delle colture di cianobatteri (Fig. 3).

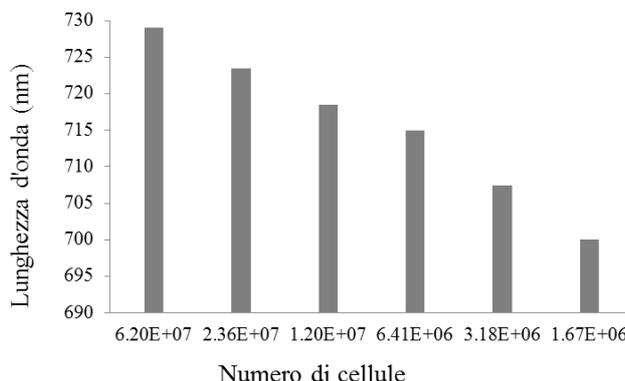


Figura 3. La lunghezza d'onda in cui si ha il massimo della riflettanza nella regione d'interesse della Clorofilla-a si sposta a lunghezze maggiori all'aumentare del numero di cellule di cianobatteri.

La capacità di discriminare le differenti specie di cianobatteri sulla base delle loro proprietà spettrali è stata valutata anche sul data-set raccolto con la tecnica dell'autofluorescenza. Tramite l'analisi delle componenti principali (PCA) è stata possibile una separazione tra le varie specie di cianobatteri o di altri rappresentanti tipici della flora batterica lacustre come mostrato in Figura 4.

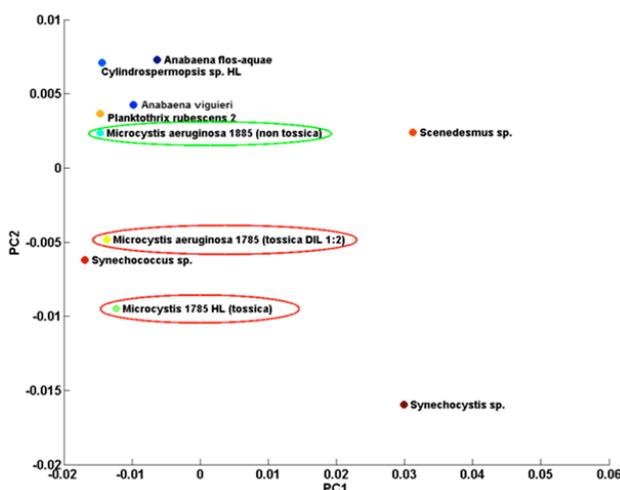


Figura 4. Risultati dell'analisi in componenti principali (PCA). In particolare, sono evidenziate le *Microcystis aeruginosa* di tipo tossico e non tossico per mostrare la possibilità di una loro discriminazione.

Il data-set ha permesso la parametrizzazione di modelli bio-ottici dedicati ai differenti pigmenti fotosintetici (ficocianine, alloficocianine e ficoeritrine) e la creazione di algoritmi semi-empirici applicabili ad immagini di sensori di Osservazione della Terra.

La possibilità di conoscere la variabilità dei massimi e minimi dei differenti pigmenti ha permesso di rendere gli algoritmi adattivi, con un aumento di oltre il 10% dell'accuratezza nella stima della concentrazione dei pigmenti.

In figura 5 si mostra la regressione lineare tra la concentrazione di PC e APC e il rapporto di banda adattivo del massimo di riflettanza e massimo di assorbimento nella regione d'interesse dei cianobatteri con ficocianina. L'algoritmo implementato può essere utilizzato con buona accuratezza

per poter quantificare la concentrazione di cianobatteri presenti in elevata quantità nelle acque superficiali.

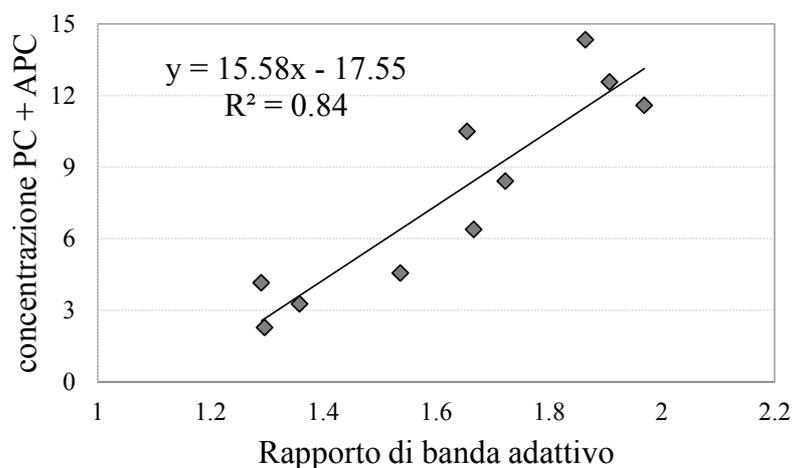


Figura 5. Algoritmo semi-empirico ottenuto tramite regressione tra il rapporto di bande spettrali e le concentrazioni di PC e APC per le colture di cianobatteri analizzate in laboratorio.

L'analisi relativa agli stress luminosi ha permesso di valutare come per *Anabaena lemmermannii* l'aumento d'intensità luminosa determini differenti capacità di crescita e di efficienza fotosintetica visibili nella risposta spettrale. Nella coltura mantenuta a intensità luminosa maggiore è notevolmente aumentata la riflettanza nella regione dell'infrarosso, circa il 20% in più della riflettanza del picco della clorofilla-a (~712 nm), mentre nella regione delle ficocianine (~650 nm) si è registrata una riduzione di circa il 10% della riflettanza (Fig. 6).

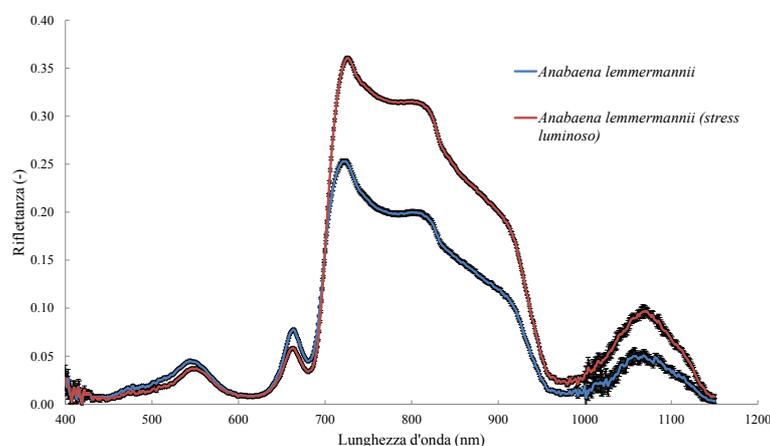


Figura 6. Firme spettrali acquisite su colture di *Anabaena lemmermannii* mantenute in differenti condizioni di luminosità.

## Conclusioni

Le misure di laboratorio ad oggi effettuate hanno permesso la compilazione di un set di dati di proprietà ottiche di specie di cianobatteri tipici dei laghi italiani.

L'analisi dei dati ha permesso di caratterizzare otticamente le differenti specie di cianobatteri ed è stato possibile sviluppare algoritmi specifici per identificare e quantificare i cianobatteri. Questi risultati potranno permettere in real-time di riconoscere, con diversi strumenti (spetttroradiometro, fluorimetro), la presenza dei cianobatteri e di determinarne la concentrazione.

Nel prosieguo delle attività progettuali, particolare importanza sarà data alla possibilità di identificazione e separazione delle specie produttrici di tossine rispetto a quelle che non le producono.

Inoltre gli algoritmi e modelli implementati saranno applicati a differenti tipologie d'immagini satellitari (in particolare Sentinel-3 e Sentinel-2) al fine di poter valutare le caratteristiche spaziali e temporali dei fenomeni di fioritura dei cianobatteri nei laghi del nord Italia.

### Ringraziamenti

Il progetto BLASCO è finanziato dalla Fondazione CARIPLO (CARIPLO Rif. 2014-2019).

### Riferimenti bibliografici

- Golbeck J H, Bryant D A. (1991), *Photosystem I. In Current Topics in Bioenergetics, Light Driven Reactions in Bioenergetics*; Lee, C.P., Ed.; Academic Press: New York, NY, USA, 83-177.
- Simis S, Peters S, Gons H. (2005), "Remote sensing of the cyanobacterial pigment phycocyanin in turbid inland water", *Limnology and Oceanography*, 50: 237-245.
- Schalles J, Yacobi Y. (2000). "Remote detection and seasonal patterns of phycocyanin, carotenoid and Chl-a pigments in eutrophic waters". *Ergebnisse Der Limnologie*, 55: 153-168.
- Dekker A G. (1993), *Detection of the Optical Water Quality Parameters for Eutrophic Waters by High Resolution Remote Sensing*. Ph.D. Thesis. Free University: Amsterdam, The Netherlands.
- Sathyendranath S, Lazzara L, Prieur L. (1987), "Variations in the spectral values of specific absorption of phytoplankton", *Limnology and Oceanography*, 32: 403-415.
- Mishra S, Mishra D R, Schluchter W M. (2009), "A novel algorithm for predicting phycocyanin concentrations in cyanobacteria: A proximal hyperspectral remote sensing approach", *Remote Sensing*, 1(4): 758-775.
- Ibelings B W, Kroon B M A, Mur L R, (1994), "Acclimation of photosystem II in a cyanobacterium and a eukaryotic green alga to high and fluctuating photosynthetic photon flux densities, simulating light regimes induced by mixing in lakes", *New Phytology*, 128: 407-424.
- Matthews M W, Bernard S. (2013), "Using a two-layered sphere model to investigate the impact of gas vacuoles on the inherent optical properties of *M. aeruginosa*" *Biogeoscience Discussion*, 10(6): 10531-10579.
- Jupp D L B, Kirk J T O, Harris G P, (1994), "Detection, identification and mapping of cyanobacteria using remote-sensing to measure the optical-quality of turbid inland waters", *Australian Journal of Marine and Freshwater Research*, 45: 801-828.
- Song K, Li L, Li Z, Tedesco L, Hall B, Shi K. (2013), "Remote detection of cyanobacteria through phycocyanin for water supply source using three-band model", *Ecological informatics*, 15: 22-33.
- Utermöhl H. (1958), "Zur Vervollkommung der quantitative Phytoplankton Methodik", *Mitteilungen Internationale Vereinigung für Theoretische und Angewandte Limnologie*, 9: 1-38.
- Lorenzen C J. (1967), "Determination of chlorophyll and phaeo-pigments: spectrophotometric equations", *Limnology and Oceanography*, 12: 343-346.
- Hommersom A, Kratzer S, Laanen M, Ansko I, Ligi M, Bresciani M, Giardino C, Beltrán-Abaunza JM, Moore G, Wernand M, Peters S. (2012), "Intercomparison in the field between the new WISP-3 and other radiometers (TriOS Ramses, ASD FieldSpec, and TACCS)", *Journal of Applied Remote Sensing*, 6:063615-063615.
- Guilizzoni P, Marchetto A, Lami A, Gerli S, Musazzi S. (2011), "Use of sedimentary pigments to infer past phosphorus concentration in lakes", *Journal of Paleolimnology*, 45: 433-445.
- Bennett A, Bogorad L. (1973), "Complementary chromatic adaptation in a filamentous blue-green alga", *The journal of cell biology*, 58.2: 419-435.
- Fargion G S, Mueller J L. (2000), "Ocean Optics Protocols for Satellite OceanColor Sensor Validation. Revision 2". NASA Technical Memo. 2000-209966. (NASA Goddard Space Flight Center: Greenbelt, MD, USA)

- Brando V E, Braga F, Zaggia L, Giardino C, Bresciani M, Bellafiore D, Ferrarin C, Maicu F, Benetazzo A, Bonaldo D, Falcieri F M, Coluccelli A, Russo A, Carniel S. (2015), “High resolution satellite turbidity and sea surface temperature observations of river plume interactions during a significant flood event”, *Ocean Science Discussions*, 12(4): 1669-1692.
- Kutser T. (2004), “Quantitative detection of chlorophyll in cyanobacterial blooms by satellite remote sensing”, *Limnology and Oceanography*, 49(6): 2179-2189.
- Bresciani M, Giardino C, Lauceri R, Matta E, Cazzaniga I, Pinardi M, Lami A, Austoni M, Viaggiu E, Congestri R, Morabito G. (2016), “Earth observation for monitoring and mapping of cyanobacteria blooms. Case studies on five Italian lakes”, *Journal of Limnology*, doi: 10.4081/jlimnol.2016.1565.
- Kishino M, Takahashi M, Okami N, Ichimura S. (1985), “Estimation of the spectral absorption coefficients of phytoplankton in the sea”, *Bulletin of Marine Science*, 37: 634-642.
- Manzo C, Bresciani M, Giardino C, Braga F, Bassani C. (2015), “Sensitivity analysis of a bio-optical model for Italian lakes focused on Landsat-8, Sentinel-2 and Sentinel-3”, *European Journal of Remote Sensing*, 48: 17-32.
- Giardino C, Candiani G, Bresciani M, Lee Z, Gagliano S, Pepe M. (2012), “BOMBER: A tool for estimate water quality and bottom properties from remote sensing images”, *Computers & Geosciences*, 45: 313-318.