

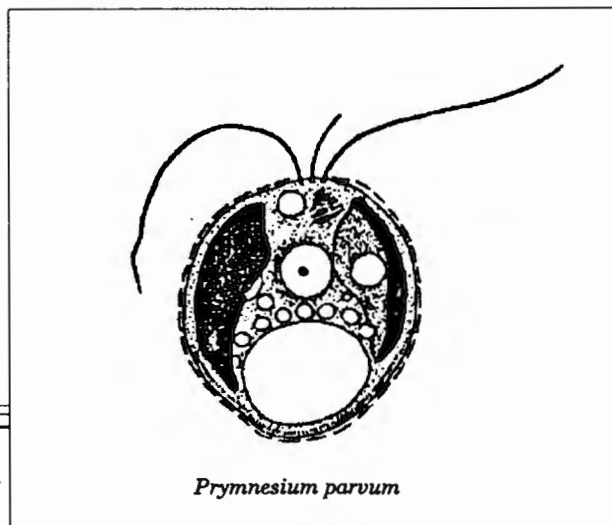
---

---

# TOSSINE ALGALI

---

---



## LA PRIMNESINA

Milena Bruno<sup>(\*)</sup>, Laura Volterra<sup>(\*)</sup>

*Prymnesium parvum* è una piccola Crisoficea unicellulare di 10  $\mu$  di diametro, munita di due flagelli, di un aptonema e una superficie a scaglie. Nelle cellule vive, uno solo dei due flagelli -otticamente identici- presenta fluorescenza su tutta la sua lunghezza (COLEMAN, 1988).

La prima identificazione di *Prymnesium* come agente causale di morie di pesci risale al 1938, in acque salmastre estuariali inglesi (CARTER, 1938); in seguito è stato associato ad episodi di ittiotossicità nel Nord Europa e in Medio Oriente (SHILO, 1970), con conseguenze

tossiche di particolare gravità per l'acquacoltura in Inghilterra (FARROW, 1969; BELL, 1980), Olanda, Danimarca, Bulgaria e Israele (CARMICHAEL, 1986; SHILO, 1971, 1981). In molti di questi paesi, tale specie ha trovato la nicchia ecologica ideale -divenendovi endemica- negli allevamenti ittici con acque marine stagnanti, alta concentrazione di nutrienti e clima mite. In Italia è stata segnalata nel lago di Massaciuccoli in provincia di Lucca (SIMONI, 1977) e a Massa Carrara, in un laghetto di pesca sportiva (SANSONI, 1990), causando morie di pesci, rispettivamente negli anni '70 e '80.

Recentemente nel nord-ovest dell'America, in Sud Africa e in Inghilterra è stata descritta una nuova specie, *Prymnesium patellifera*, che nel 1969 sarebbe stata responsabile di una moria ittica nei laghi di Varna, in Bulgaria.

---

<sup>(\*)</sup> Laboratorio di Igiene Ambientale, Istituto Superiore di Sanità, Roma.

Indirizzo a cui vanno inviate le comunicazioni: Laura Volterra, Laboratorio di Igiene Ambientale, Istituto Superiore di Sanità, Viale Regina Elena, 299 - 00161 Roma

---

Delle sei specie di *Prymnesium* finora descritte (*parvum*, *patellifera*, *annuliferum*, *zebrinum*, *saltans* e *calathiferum*), anche l'ultima è sospettata di produrre ittiotossine.

Ulteriori osservazioni hanno reso necessaria una migliore definizione della tassonomia e della separazione dei generi *Prymnesium* e *Chrysochromulina*, anche quest'ultimo associato nel 1988 ad un vistoso episodio di ittiotossicità nel mar Baltico, con una fioritura di *Ch. polylepis*.

La differenziazione tradizionale tra le Criosoficee tecate *Prymnesium* e *Chrysochromulina* si basa sull'aptonema, avviticchiato o no, e sul tipo di scaglie. Si riteneva infatti che *Chrysochromulina* avesse una teca con più tipi di scaglie e un aptonema lungo, spesso arrotolato, a differenza di *Prymnesium*, con un aptonema corto e non attorcigliato e con un unico tipo di scaglie. Oggi, invece, sono note possibili forme di transizione, tra gli archetipi precedentemente descritti come *Prymnesium* e *Chrysochromulina*, basate sulla lunghezza e l'avvicchiamento dell'aptonema e sul numero e tipo di scaglie non mineralizzate della teca: la differenziazione tassonomica tra i due generi risulta quindi molto confusa. Caratteri fisiologici differenziali tra i due generi -entrambi muniti di corpi muciferi- sono l'estrema delicatezza di *Chrysochromulina*, planctonte esclusivamente marino, contrapposta alla robustezza e longevità in coltura di *Prymnesium*, adattabile ad acque dalle più diverse salinità. Inoltre per *Prymnesium* sono state descritte cisti, per *Chrysochromulina* no (GREEN ET AL., 1982).

*Prymnesium* produce grandi quantità di tossine in coltura, su terreno contenente sali inorganici e glicerolo (PASTER ET AL., 1966). Parte dell'esotossina prodotta dall'alga rimane all'interno della cellula fino alla morte e alla disintegrazione cellulare (SHILO, 1967). La maggiore produzione di tossina avviene durante il tardo stadio di crescita logaritmica, per continuare nella fase stazionaria. Come

per i dinoflagellati e le Cianoficee non c'è una semplice relazione diretta tra concentrazione di cellule algali e quantità di tossina prodotta.

*Prymnesium* non si trova mai in acque che contengano meno dello 0,12% di cloruro di sodio: l'optimum di crescita è tra 0,3 e 5,0% di NaCl e la massima produzione di tossina intorno al 2,0% (COLLINS, 1978). La temperatura dell'acqua non deve eccedere i 30 °C; il verificarsi di fioriture è favorito dalla presenza di vitamina B<sub>12</sub> e tiamina, che non influenzano però la produzione delle tossine (SHILO, 1971).

La produzione dei principi tossici richiede un optimum di condizioni colturali diverso da quello della crescita (DAFNI ET AL., 1972). La sintesi delle tossine subisce una marcata riduzione al buio ed in substrati arricchiti con glicerolo, anche se la moltiplicazione cellulare con questo polialcole continua (SHILO, 1967): l'alga possiede cioè anche un metabolismo eterotrofo.

*P. parvum* ha la capacità di degradare l'anello aromatico della fenilalanina sia al buio sia alla luce ed è in grado di utilizzare metionina ed etionina come unica fonte di azoto. Poiché l'etionina è un antimetabolita, si ritiene che, mediante un meccanismo di de-etilazione, *P. parvum* riesca ad evitare gli effetti antimetabolici di questo aminoacido (RAHAT E HOCHBERG, 1971).

Il glicerolo (0,5-1 M) sembra promuovere la sintesi di glucano (CHENG E ANTIA, 1969) ed è l'unico nutriente che permette la crescita di colture di *P. parvum* al buio. A concentrazioni di 0,05 M consente alle cellule di sopravvivere per 50 giorni su uno stesso substrato di coltura (RAHAT E SPIRA, 1967).

La moltiplicazione al buio in presenza di glicerolo può essere dovuta ad un effetto di permeabilità specifica della membrana di *Prymnesium* per questa sostanza; va ricordato, del resto, che la biosintesi dei polisaccaridi da parte di *Prymnesium* è importante per la sua teca a scaglie, che è di natura polisaccaridica (GOODWAY, 1970).

La deprivazione di fosfati incrementa la produzione di tossine da 10 a 20 volte rispetto al normale livello di coltura (RAHAT E SPIRA, 1967) e induce il rigonfiamento delle cellule, forse per un disturbo del bilancio osmotico o della divisione algale (DAFNI ET AL., 1972; HOLDWAY E WATSON, 1978).

La produzione di questi composti chimici secondari (le biotossine) sembra verificarsi in condizioni di stress (SHILO, 1981). Per far fronte alle carenze di fosforo, e quindi superare uno stress nutrizionale, *P. parvum* possiede una fosfatasi alcalina extracellulare che consente all'alga di metabolizzare anche il fosforo organico presente nell'ambiente (WYNNE E RHEE, 1988).

Le tossine prodotte da *P. parvum* -probabilmente una famiglia con composizione analoga, piuttosto che un singolo composto- hanno essenzialmente 3 azioni: emolitica, ittiotossica, citotossica; si registrano, però, anche effetti antispasmodici, batteriolitici, etc. Condizioni ambientali particolari possono modulare la natura delle tossine sintetizzate. Così il più alto livello di emolisina viene indotto da una salinità del 2,28% (PADILLA, 1970; SHILO, 1981).

### NATURA DELLE TOSSINE

L'estrazione delle tossine comporta un primo trattamento delle cellule con acetone, che allontana i pigmenti cellulari; segue un trattamento con metanolo o etanolo, che fornisce il preparato bruto. Le soluzioni metanoliche e acquose di ittiotossina sono stabili e vengono leggermente attivate dal trattamento con NaOH 0,5 N.

Metodi più recenti di estrazione si basano sulla solubilità differenziale in solventi organici, seguita dalla separazione su colonne di acido silicico. Si ottiene in tal modo un preparato di tossine più attivo (tossine  $\beta$ ). Sono state così identificate su HPLC sei frazioni di tossine, di cui solo 4 emolitiche ed una (la frazione 6) anche ittiotossica in presenza di spermatozoi (KIM

E PADILLA, 1977).

L'estratto tossico bruto, esaminato per cromatografia su strato sottile, produce 6 macchie, tutte con caratteristiche emolitiche, ittiotossiche e citotossiche. Il maggiore componente, la emolisina I, è una miscela di 1'-O-octadecatetraenoil-3'-O-(6-O- $\beta$ -D-galattopiranosil)glicerolo e di 1'-O-octadecapentaenoil-3'-O-(6-O- $\beta$ -D-galattopiranosil)glicerolo (KOZAKAI ET AL., 1982). Le procedure seguite per la purificazione, tipiche dei lipidi, la somiglianza con certi detergenti, la solubilità in acqua e solventi organici, le miscele difasiche indicano la natura lipidica delle tossine di *Prymnesium*.

Le proprietà chimiche dei principi tossici sono simili a quelle dei lipidi acidi polari: come questi, mostrano qualità anfipatiche e formano in acqua micelle di diametro di 250-350 Å con uno spessore di membrana di 50-55 Å (SHILO, 1971).

All'analisi chimica i principi tossici purificati risultano composti dal 20,6% di proteine, con 15 aminoacidi identificati, da acidi grassi non identificati, dallo 0,47% di fosfati e dal 10-12% di zuccheri (ULITZUR E SHILO, 1970). Per composizione quindi le tossine di *P. parvum* somigliano ai proteolipidi. Una frazione di membrana, isolata per centrifugazione in gradiente di densità e contenente il 20% di emolisine, rafforza l'idea che le tossine di *P. parvum* siano miscele eterogenee di proteolipidi. La somiglianza ai componenti della membrana cellulare fa pensare che la tossina, se non è addirittura parte integrante di essa, possa essere il prodotto di un metabolismo sbilanciato della membrana cellulare, poiché la tossicità compare in stati e condizioni in cui i fattori di crescita sono limitati e la moltiplicazione disturbata (DAFNI ET AL., 1972; HOLDWAY E WATSON, 1978).

A pH alcalino e in presenza di ioni monovalenti, le primnesine perdono l'attività emolitica, pur conservando l'ittiotossicità. Tale osservazione -postulando che l'attività emolitica risieda nella parte proteica (la sola de-

naturata dai cofattori ionici ad alto pH) e l'attività ittiotossica nella parte lipidica sembra confermare la natura proteolipidica delle primnesine, sebbene queste, al contrario dei proteolipidi, siano solubili in metanolo e in dimetilsolfossido (ULITZUR E SHILO, 1970). La sensibilità dell'emolisina, ma non della ittiotossina, all'inattivazione enzimatica da parte di un enzima proteolitico come la papaina conferma ulteriormente questa ipotesi (ULITZUR E SHILO, 1970).

Vista la molteplicità di azione delle tossine in vivo e in vitro, si pone il problema se le diverse attività siano espressione di differenti principi tossici. Gli effetti differenziali della temperatura, del pH e della luce sulle diverse attività tossiche delle primnesine avvalorerebbero questa ipotesi. Al fine di ridurre l'inattivazione luminosa dell'ittiotossina in coltura, si consiglia di osservare, durante la coltivazione dell'alga in laboratorio, periodi di alternanza luce/buio (ULITZUR E SHILO, 1970). Il principio ittiotossico, infatti, è inattivato dalla luce visibile (400-510 nm) e da quella UV (255 nm).

L'intossicazione da *P. parvum* coinvolge sia il rilascio di sostanze tossiche durante la crescita e dopo la morte delle cellule algali (come per *Gymnodinium*) sia l'ingestione delle alghe tossigene in toto e la loro concentrazione per meccanismi di filtrazione, come nel caso del PSP.

## EFFETTI TOSSICI

Tutti gli animali acquatici con branchie sono sensibili alle biotossine prodotte da *Prymnesium*. Tra i teleostei sono compresi anche i pesci più resistenti, come *Cyprinus carpio*, *Tilapia galilea*, *Mugil cephalus*, *Gambusia affinis* (quest'ultimo usato nei test di ittiotossicità per la stessa primnesina). Lo sono anche invertebrati bivalvi come *Unio* e *Dreissenia polymorpha*, gli stadi branchiati di anfibi e almeno una specie di echinoderma, *Acanthaster planci* (LUCAS, 1982).

La permoselettività ai cationi della membrana trattata con primnesina e la sua riduzione in concentrazioni crescenti di sali farebbe pensare che la tossina determini sulle membrane la formazione di pori carichi negativamente (Shilo, 1971).

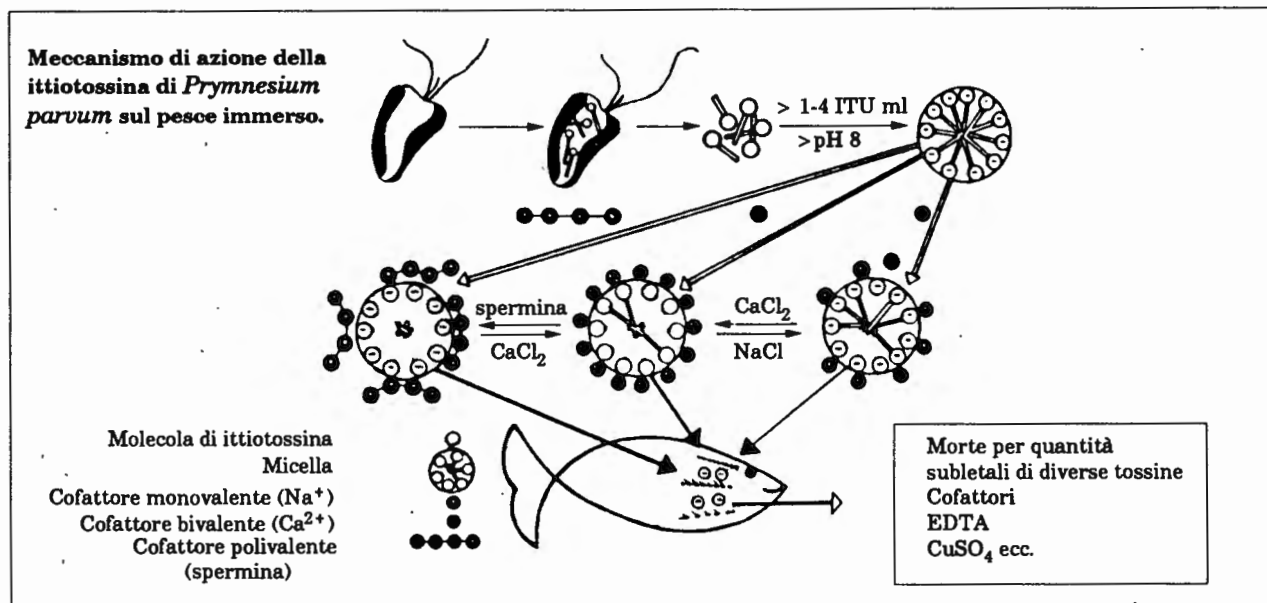
L'aumento della permoselettività cationica causato dalle primnesine è stato saggiato su membrane artificiali al colesterolo ossidato o prodotte da soluzioni di lecitina e colesterolo in metiloleato. Il contatto della tossina con uno solo o con entrambi i lati della membrana causa incrementi lineari di conduttanza, rispettivamente di minore e di maggior rilievo.

I pori generati dalle primnesine sulle membrane possono confluire tra loro, formando pori -carichi negativamente- di maggiori dimensioni che, oltre un certo livello critico, provocano la rottura della membrana (MORAN E ILANI, 1974).

Il meccanismo di danneggiamento delle membrane è stato verificato anche sui liposomi. Questi impaccano la maggior parte degli enzimi cellulari (DNAsi, RNAsi, proteasi, lipasi) che hanno un ruolo specifico nei meccanismi di autofagia associati alla morte cellulare. La primnesina provoca severi danni ai liposomi contenenti colesterolo, indicando che l'interazione principale è sugli steroli di membrana (IMAE E INOUE, 1974); lisa, però, anche sferoplasti o protoplasti batterici -notoriamente privi di colesterolo- se la concentrazione di tossina supera 1000 HU/ml (HU = Hemolytic Unit).

Non solo l'immersione in acque contenenti le tossine, ma anche la somministrazione *i.p.* e *p.o.* causa la morte dei pesci, sebbene a dosi molto più elevate (LD<sub>50</sub> per gambusie di 2,5 g = 30 µg *i.p.* e 4 mg *p.o.*).

La tossicità di *Prymnesium* aumenta in presenza di Ca<sup>++</sup>, Mg<sup>++</sup>, streptomina, poliamine, neomicine, e degli stessi detergenti cationici. Sperimentalmente si è riscontrata l'incorporazione nella ittiotossina di cationi attivi marcati, con conseguente modifica della mobilità elettroforetica.



La formazione del complesso tossina-catione, più attivo dei due elementi separati, dipende dal pH, dalla attivazione specifica tipica di ciascun catione e dalla sua concentrazione (SHILO, 1971).

Per i saggi tossicologici si può misurare la  $\text{LD}_{50}$  dell'estratto algale -privo di cellule e detriti cellulari- su parecchie specie di pesci e sul mollusco *Dreissenia polymorpha*, oppure la  $\text{EC}_{50}$  che determina la perdita di equilibrio in *Gambusia* e la curvatura della coda nei girini di rana.

Poichè la tossicità aumenta con cationi bi- e polivalenti, è inibita da  $\text{Na}^+$  (aggiunto come cloruro) e dipende dal pH, è necessario operare in ben precise condizioni di saggio. Se la tossina è sciolta in alcool si deve esporre il pesce (per immersione) a concentrazioni non superiori all'1% di alcool, dose non tossica per l'animale. Si definisce Unità Ittiotossica (UIT) la minima quantità di tossine/ml che uccide tutti i pesci usati nel test in un periodo di 3 h.

Il fatto che i primi effetti tossici si rilevino dopo 5 minuti dall'immersione suggerisce che l'effetto primario delle primnesine venga espletato su un organo ben esposto, come le branchie.

Questa ipotesi è supportata dall'osservazione che sono sensibili al saggio per immersione tutti gli animali branchiati e che gli anfibi, dopo la metamorfosi, divengono insensibili ad esso.

Il danno alla permeabilità branchiale rende l'organismo, esposto a dosi sub-tossiche di primnesine, più sensibile alla successiva esposizione ad altri tossici quali, ad esempio, i metalli pesanti. Inizialmente si ha un danno reversibile nei tessuti delle lamelle branchiali, che comporta una perdita di permeabilità selettiva e, quindi, la sensibilizzazione del pesce a numerosi tossici eventualmente presenti nel mezzo acquoso; questi ultimi, responsabili dell'effetto letale, comprendono la stessa primnesina la cui tossicità generale per il pesce è indicata dalla letalità anche per somministrazioni *i.p.* o *p.o.*

Le cellule branchiali non sono le uniche sensibili alle biotossine di *Prymnesium*; queste, infatti, esplicano un'ampia attività biologica, che include la lisi di eritrociti nucleati di pesci e uccelli e non nucleati di mammiferi, di epatociti, di cellule amniotiche, delle cellule ascitiche di Erlich, di cellule tumorali: l'azione si estrinseca sulla membrana citoplasmatica e

la sua estrema conseguenza è la lisi (SHILO, 1981).

La tossina agisce sul flusso di ioni attraverso la membrana cellulare. Già dopo 30 sec. di esposizione si assiste alla fuoriuscita di  $K^+$  e all'ingresso di  $Na^+$ ; il primo danno alla membrana cellulare è proprio legato alla perdita di  $K^+$  (DAFNI E GIBERMAN, 1971).

Il pretrattamento con  $\beta$ -emolisina stafilococcica aumenta l'effetto emolitico indotto dalla tossina (BERGMAN E KIDRON, 1966). L'emolisi si misura colorimetricamente; si definisce unità emolitica (HU) la quantità di tossine, sciolta in 0,1 ml di metanolo, che dà il 50% di lisi in 2,9 ml di una sospensione di eritrociti avente assorbanza 1 a 540 nm (MARTIN E PADILLA, 1971).

*P. parvum* è insensibile all'azione citolitica dell'aponina (MOON E MARTIN, 1981), ma la sua emolisina viene inattivata dall'emolisina di *Gymnodinium breve* (DOIG E MARTIN, 1973) per formazione di un complesso che si lega con difficoltà alle membrane degli eritrociti (MARTIN ET AL., 1972).

L'attività emolitica della primnesiotossina è oltre 3000 volte più potente di quella delle digitossine e delle lisolecitine. La cinetica di reazione dell'azione emolitica della primnesina, seguita colorimetricamente, ha mostrato due specifiche costanti, una associata agli stadi prelitici e l'altra a quelli litici (MARTIN E PADILLA, 1971; MARTIN ET AL., 1973).

Le cellule batteriche integre sono resistenti all'azione litica della primnesina. Il pretrattamento con lisozima o EDTA, o la crescita in presenza di penicillina rende invece anche i batteri, come *Escherichia coli*, sensibili all'azione della tossina (ULITZUR E SHILO, 1970).

La resistenza alle tossine da parte dei batteri deve quindi dipendere dalla presenza di una barriera nella parete cellulare, piuttosto che da una particolare stabilità della membrana cellulare procariotica.

La tossina di *Prymnesium*, pur non avendo effetto per immersione sugli organismi non branchiati, lo esplica per via *i.p.* sui vertebrati.

Iniettata *i.p.* in rane e topi ne induce infatti la morte per paralisi respiratoria: la  $DL_{50}$  per i topi è 1,4 mg/kg peso corporeo (SHILO, 1971). La primnesina agisce a livello delle sinapsi, causando paralisi della muscolatura scheletrica per inattivazione della placca motrice (SIMONI, 1977); la tossina opera sulla membrana post-sinaptica, funzionando da agente non depolarizzante e bloccando quindi la trasmissione neuromuscolare (SHIAU-LIN ET AL., 1975).

La primnesina, potente emolitico, è molto meno attiva di altri veleni nel determinare la contrattura dei muscoli scheletrici (SHILO, 1971). L'interesse farmacologico delle tossine di *Prymnesium* risiede nella loro azione sulla permeabilità delle membrane biologiche.

## CONTROLLO

In Israele il controllo di *P. parvum* si effettua usando ammonio solfato commerciale. La lisi delle cellule algali è causata dall'ammoniaca da esso sviluppata: l'effetto è quindi potenziato da un innalzamento del pH -ottenibile con l'aggiunta di idrossido di calcio- che libera ammoniaca indissociata. Il trattamento non è esente da controindicazioni, come la stimolazione della crescita di macrofite, che ostruiscono i canali e devono essere rimosse meccanicamente. Il trattamento ha però i vantaggi dell'economicità e della bassa tossicità verso le altre forme acquatiche, purché non vengano raggiunte concentrazioni elevate di ammoniaca libera, tossiche per i pesci ed altri organismi. Uno svantaggio del controllo con l'ammonio è la sua breve durata: è richiesta quindi una costante vigilanza, ulteriormente complicata dall'apparizione periodica di ittiotossicità.

Una concentrazione di 1 mg/l di solfato d'ammonio, mantenuta per sei giorni consecutivi, può essere usata senza determinare effetti negativi per la vita acquatica (SHILO E ASCHNER, 1953). Il trattamento non consente tuttavia l'eradicazione del *Prymnesium*, che rimane a

livello endemico: è quindi necessario un continuo saggio della ittiotossicità, esaltando la sensibilità del test con l'introduzione di 3'-3'-diaminodipropilammina come attivatore. Si

riescono così ad individuare precocemente livelli subletali di tossine, consentendo veloci ed appropriate misure di prevenzione (ULITZUR E SHILO, 1964).

## BIBLIOGRAFIA

- BELL M.G.W. - 1980. Environmental pressures on inland waters - The Norfolk broads. *Wat. Sci. Technol. Prog. Wat. Technol.*, **13**: 249-264.
- BERGMANN F. AND KIDRON M. - 1966. *J. Gen. Microbiol.*, **44**:233-239.
- CARMICHAEL W.W. - 1986. Algal toxins. *Adv. in Bot. Res.*, **12**: 47-101.
- CARTER N. - 1938. *Arch. Protistendk.*, **90** (1).
- CHENG J.Y. AND ANTIA N.J. - 1970. Enhancement by glycerol of phototrophic growth of marine planktonic algae and its significance to the ecology of glycerol pollution. *J. Fish. Res. Board Can.*, **27**(2): 335-346.
- COLEMAN A.W. - 1988. The autofluorescent flagellum: a new phylogenetic enigma. *J. Phycol.*, **24**: 118-120.
- DAFNI Z. AND GIBERMAN E. - 1972. Nature of initial damage to Ehrlich ascites cells caused by *Prymnesium parvum* toxin. *Biochim. et Biophys. Acta*, **255**: 380-385.
- DAFNI Z., ULITZUR S. AND SHILO M. - 1972. Influence of light and phosphate on toxin production and growth of *Prymnesium parvum*. *J. of Gen. Microbiol.*, **70**: 199-207.
- DOIG M.T. AND MARTIN D.F. - 1973. Anticoagulant properties of a red tide toxin. *Toxicon*, **11**: 351-355.
- FARROW G.A. - 1969. Note on the association of *Prymnesium* with fish mortality. *Wat. Res.*, **3**: 375-379.
- GOODAY G.W. - 1970. Aspects of the carbohydrate metabolism of *Prymnesium parvum*. *Arch. Mikrobiol.*, **72**: 9-15.
- GREEN J.C., HIBBERD D.J. AND PIENAAR R.N. - 1982. The taxonomy of *Prymnesium* (prymnesiophyceae) including a description of a new cosmopolitan species, *P. patellifera* sp. nov., and further observation on *P. parvum* N. Carter. *Br. Phycol. J.*, **17**: 363-382.
- HOLDWAY P.A. AND WATSON R.A. - 1978. Growth and ichthyotoxicity in two strains of *Prymnesium parvum* Carter (Haptophyta) as affected by phosphorus concentration. *Br. Phycol. J.*, **13** (2): 201-202.
- KIM Y.S. AND PADILLA G.M. - 1977. Hemolitically active components from *P. parvum* and *G. breve* toxins. *Life Sci.*, **21**: 1287-1292.
- KOZAKAI H., OSHIMA Y. AND YASUMOTO T. - 1982. Isolation and structural elucidation of hemolysin from the phytoflagellate *Prymnesium parvum*. *Agric. Biol. Chem.*, **46** (1): 233-236.
- IMAI M. AND INOUE K. - 1974. The mechanism of the action of *Prymnesium* toxin on membranes. *Biochim. et Biophys. Acta*, **352**: 344-348.
- LUCAS J.S. - 1982. Quantitative studies of feeding and nutrition during larval development of the coral reef asteroid *Acanthaster planci* (L.). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, **65**: 173-193.
- MARTIN D.F. AND PADILLA G.M. - 1971. Hemolysis induced by *Prymnesium parvum* toxin kinetics and binding. *Biochim. et Biophys. Acta*, **241**: 213-225.

- MARTIN D.F. AND PADILLA G.M. - 1971. Characterization of *Prymnesium parvum* toxin by means of hemolytic kinetics. *Environ. Lett.*, 1 (3): 199-203.
- MARTIN D.F., PADILLA G.M. AND DESSENT T.A. - 1973. Computer-determined rate constants of hemolysis induced by *Prymnesium parvum* toxin. *Analyt. Biochem.*, 51: 32-41.
- MARTIN D.F., PADILLA G.M., HEYL M.G. AND BROWN P.A. - 1972. Effect of *Gymnodinium breve* toxin on hemolysis induced by *Prymnesium parvum* toxin. *Toxicon*, 10: 285-290.
- MOON R.E. AND MARTIN D.F. - 1981. The cytolytic substance aponin on *Prymnesium parvum* and *Ptychodiscus brevis*, a comparative study. *Bot. mar.*, 24: 591-593.
- MORAN A. AND ILANI A. - 1974. The effect of Prymnesin on the electric conductivity of thin lipid membranes. *J. Membrane Biol.*, 16: 237-256.
- PADILLA G.M. - 1970. Growth and toxigenesis of the chryomonad *Prymnesium parvum* as a function of salinity. *J. Protozool.*, 17 (3): 456-462.
- PASTER Z., REICH K., BERGMANN F. AND RAHAT M. - 1966. Studies on the growth of *Prymnesium parvum* Carter (Chryomonadina) and on the formation of its toxin (primnesin). *Experientia (Specialia)*, 22 (12): 790-791.
- RAHAT M. AND HOCHBERG A. - 1971. Ethionine and methionine metabolism by the chryomonad flagellate *Prymnesium parvum*. *J. Protozool.*, 18 (3): 378-382.
- RAHAT M. AND SPIRA Z. - 1967. Specificity of glycerol for dark growth of *Prymnesium parvum*. *J. Protozool.*, 14 (1): 45-48.
- SANSONI G. - 1990. (comunicazione personale).
- SHIAU LIN S.Y., HUANG M.C., TSENG W.C. AND LEE C.Y. - 1975. Comparative studies on the biological activities of cardiotoxin, melittin and prymnesin. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, 287: 349-358.
- SHILO M. - 1981, in «The Water Environment: Algal Toxins and Health». W.W. CARMICHAEL (ed.): 37-48, Plenum, New York.
- SHILO M. - 1970. Toxins of Chrysophyceae. In «Microbial Toxins», vol. VII, «Algal and fungal toxins», cap. 3: 67-103, S. KADIS, A. CIEGLER AND S.J. AJL (eds.), Academic Press, New York.
- SHILO M. - 1967. Formation and mode of action of algal toxins. *Bacteriol. Rev.*, 31: 180-193.
- SHILO M. AND ASCHNER M. - 1953. *J. Gen. Microbiol.*, 8: 333-339.
- SIMONI F. - 1977. Sulle cause della moria dei pesci nel lago di Massaciuccoli negli anni 1972-1977. *Ig. Mod.*, 12: 363-380.
- ULITZUR S. AND SHILO M. - 1964. *J. Gen. Microbiol.*, 36: 161-167.
- ULITZUR S. AND SHILO M. - 1970. Procedure for purification and separation of *Prymnesium parvum* toxins. *Biochim. et Biophys. Acta*, 201: 350-363.
- ULITZUR S. AND SHILO M. - 1970. Effect of *Prymnesium parvum* toxin, cetyltrimethylammonium bromide and sodium dodecyl sulphate on bacteria. *J. Gen. Microbiol.*, 62: 363-370.
- WYNNE D. AND RHEE G.Y. - 1988. Changes in alkaline phosphatase activity and phosphate uptake in P-limited phytoplankton, induced by light intensity and spectral quality. *Hydrobiol.*, 160: 173-178.