

ΜΕΤΡΟΛΟΓΙΚΑ ΠΡΟΒΛΗΜΑΤΑ ΚΑΙ ΠΡΟΤΕΙΝΟΜΕΝΕΣ ΛΥΣΕΙΣ ΣΤΟΥΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥΣ ΚΥΑΝΟΤΟΞΙΝΩΝ ΣΕ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ

Τ. Καλούδης¹, Θ. Τριάντης³, Ι. Δημητρακόπουλος³, Θ. Φωτίου³, Σ. Ζερβού³,
Μ.Γραμμμένου³, Ε. Λύτρας², Φ. Μισκάκη¹, Α. Χισκιά³

¹Υπηρεσία Ελέγχου Ποιότητας, ²Υπηρεσία ΚΕΡΕΦΥΤ –R&D, Ε.ΥΔ.Α.Π. Α.Ε., Ωρωπού 156,
Αθήνα, e-mail: kaloudis@eydap.gr

³Εργαστήριο Περιβαλλοντικών Αναλύσεων, Ινστιτούτο Φυσικοχημείας, ΕΚΕΦΕ
Δημόκριτος, Αγία Παρασκευή Αττικής.

Περίληψη

Οι κυανοτοξίνες είναι τοξικές ενώσεις που παράγονται από ορισμένα είδη κυανοβακτηρίων σε επιφανειακά νερά. Οι ενώσεις αυτές μπορούν να προκαλέσουν σοβαρές βλάβες στην υγεία ανθρώπων και ζώων, ιδιαίτερα όταν τα νερά στα οποία αναπτύσσονται τα κυανοβακτήρια προορίζονται για πόσιμα. Για τον προσδιορισμό και την εκτίμηση της τοξικότητας των κυανοτοξινών χρησιμοποιούνται διάφορες τεχνικές, όπως HPLC, LC-MS/MS, ELISA και βιοδοκιμές. Η εφαρμογή των παραπάνω μεθόδων όπως και η ερμηνεία των αποτελεσμάτων παρουσιάζει αρκετά προβλήματα, που οφείλονται στο μεγάλο αριθμό κυανοτοξινών με παραπλήσια δομή, στη περιορισμένη διαθεσιμότητα προτύπων ουσιών, στον προσδιορισμό της ακριβούς περιεκτικότητας των προτύπων και στην συσχέτιση των αποτελεσμάτων που προέρχονται από διαφορετικές μεθόδους. Στην παρούσα εργασία παρουσιάζονται παραδείγματα από τα παραπάνω μετρολογικά προβλήματα στους προσδιορισμούς κυανοτοξινών σε νερά και προτείνονται τρόποι αντιμετώπισής τους, όπως προκύπτουν από την εμπειρία που έχει ως τώρα αποκτηθεί στα εργαστήριά μας.

Λέξεις-Κλειδιά: Μετρολογία, κυανοβακτήρια, κυανοτοξίνες, νερό, περιβάλλον

Abstract

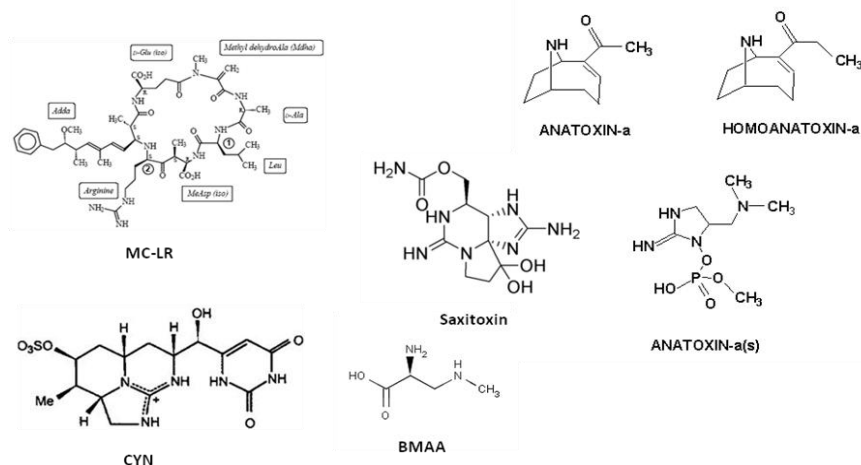
Cyanotoxins are toxic compounds that are produced by certain species of cyanobacteria in surface waters. These toxins can cause adverse health effects on humans and animals, especially when the surface waters serve as drinking water sources. A number of different techniques can be used for the determination and the toxicity assessment of cyanotoxins, including HPLC, LC-MS/MS, ELISA and bioassays. However, there are some concerns in applying these techniques as well as in interpreting the results, due to the large number of analytes with similar structures, the limited availability of standard compounds, the uncertainty in the determination of the exact concentration of standard solutions and the correlation between results derived by diverse methods. The present paper presents examples of the above metrological problems regarding the determination of cyanotoxins in water and proposes practices for their solution according to the experience already gained in our laboratories.

Keywords: Metrology, cyanobacteria, cyanotoxins, water, environment

1. Εισαγωγή

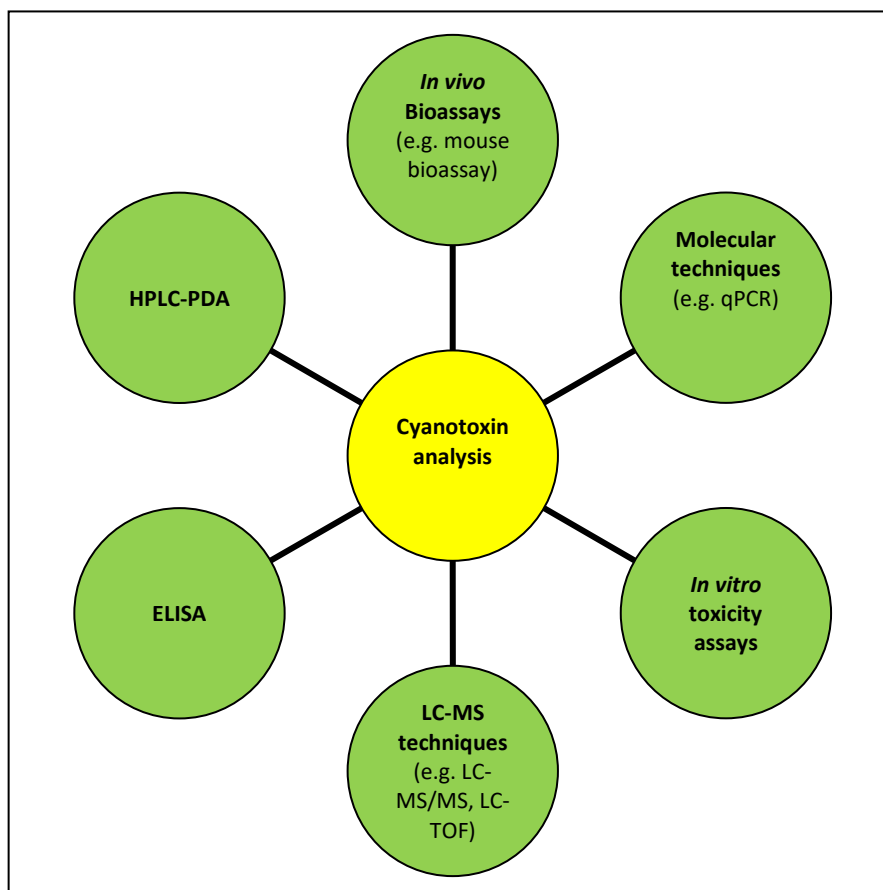
Τα κυανοβακτήρια, γνωστά και ως κυανοφύκη (blue-green algae) είναι αρχαίοι φωτοσυνθετικοί οργανισμοί, ευρέως διαδεδομένοι στη βιόσφαιρα (επιφανειακά νερά, ωκεανοί, εδάφη) (Falconer, 2005). Οι οργανισμοί αυτοί, ως φωτοαυτότροφοι, έχουν γενικά πολύ μικρές απαιτήσεις σε θρεπτικά συστατικά για να επιβιώσουν και να αναπτυχθούν και προσαρμόζονται εύκολα ακόμη και σε ακραίες περιβαλλοντικές συνθήκες (π.χ. σε ακραίες θερμοκρασίες). Όταν επικρατούν ευνοϊκές συνθήκες τα κυανοβακτήρια μπορούν να αναπτυχθούν υπέρμετρα σε επιφανειακά νερά, σχηματίζοντας στρώματα (blooms) στην επιφάνεια των νερών. Ορισμένα είδη και στελέχη κυανοβακτηρίων από τα γένη *Microcystis*, *Anabaena*, *Nostoc*, *Aphanizomenon* κ.ά. παράγουν ως δευτερογενή προϊόντα μεταβολισμού τοξίνες που είναι γνωστές ως κυανοτοξίνες (Codd, 1995). Οι κυανοτοξίνες απελευθερώνονται εν μέρει στο νερό, είτε κατά τη διάρκεια της ζωής των μικροοργανισμών, είτε με το θάνατο και τη λύση της κυτταρικής μεμβράνης. Στην περίπτωση που ένα bloom κυανοβακτηρίων περιέχει τοξικά στελέχη μικροοργανισμών αυτό χαρακτηρίζεται ως “Harmful Algal Bloom – HAB”. Τα HABs είναι υπεύθυνα για πολλά επεισόδια με βλάβες στην υγεία και θανάτους ανθρώπων και ζώων σε όλο τον κόσμο (Pelaez et al., 2010). Για τον άνθρωπο, η έκθεση στις κυανοτοξίνες γίνεται μέσω του πόσιμου νερού, της τροφής (ψάρια, καλλιέργειες που αρδεύονται από τοξικό νερό), και των ψυχαγωγικών δραστηριοτήτων (κολύμβηση, κωπηλασία κλπ).

Οι κυανοτοξίνες (Σχήμα 1) αποτελούν μία πολύ μεγάλη ομάδα ενώσεων με διαφορετικές χημικές δομές (π.χ. κυκλικά πεπτιδικά, αλκαλοειδή, αμινοξέα κ.ά) και τοξικές δράσεις (ηπατοτοξικότητα, νευροτοξικότητα κ.ά) (Apeldoorn et al., 2007). Χαρακτηριστικό τους είναι η συνήθης παρουσία πολλών παραλλαγών (variants) ή ισομερών που μπορεί να έχουν την ίδια τοξική δράση. Για παράδειγμα, η ομάδα των μικροκυστινών (MCs) αποτελείται από περίπου 80 γνωστές μέχρι σήμερα διαφορετικές ενώσεις, που αποτελούν παραλλαγές (variants) ενός κυκλοεπταπεπτιδίου. Ο αριθμός των κυανοτοξινών που ταυτοποιούνται σε περιβαλλοντικά δείγματα αυξάνει συνεχώς και προστίθενται νέες ενώσεις και νέες κατηγορίες τοξινών. Φαινόμενα όπως η κλιματική αλλαγή αλλά και η εξάπλωση κυανοβακτηρίων «εισβολέων» από θερμότερα σε πιο εύκρατα κλίματα ευθύνονται για την αυξανόμενη παρουσία κυανοτοξινών ιδιαίτερα στις Ευρωπαϊκές λίμνες (Kinnear, 2010).



Σχήμα 1: Χημικές δομές των κυριότερων κυανοτοξινών

Οι προσδιορισμοί των κυανοτοξινών μπορούν να γίνουν με πολλές διαφορετικές τεχνικές (Σχήμα 2) (Apeldoorn, 2007). Οι πρώτες ενδείξεις για την ύπαρξη τοξικών ενώσεων σε blooms κυανοβακτηρίων προήλθαν από τη χρήση *in vivo* βιοδοκιμών σε ποντίκια, τεχνική που έχει πρακτικά πλέον εγκαταλειφθεί επειδή είναι δύσχρηστη, χρονοβόρος και υπόκειται σε ηθικούς-δεοντολογικούς περιορισμούς (Falconer & Humpage, 2006). Η Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (HPLC) έδωσε τη δυνατότητα διαχωρισμού και ποσοτικού προσδιορισμού αρκετών τοξινών και η μετεξέλιξή και σύνδεσή της με τεχνικές φασματομετρίας μάζας (LC-MS) αποτελεί σήμερα το πλέον ισχυρό εργαλείο για την ταυτοποίηση και τον ποσοτικό προσδιορισμό των κυανοτοξινών σε πολύ χαμηλά επίπεδα, της τάξης των ppt στα νερά (Meriluoto & Codd, 2005). Παράλληλα, έχουν αναπτυχθεί ανοσοενζυμικές μέθοδοι (ELISA) και *in vitro* δοκιμές τοξικότητας με κύριο σκοπό τη γρήγορη διαλογή (screening) των δειγμάτων. Τέλος, μοριακές τεχνικές όπως η qPCR ανιχνεύουν την ύπαρξη των γονιδίων που ευθύνονται για την παραγωγή τοξινών και είναι πολύ χρήσιμες για την έγκαιρη, σε αρχικό στάδιο ανίχνευση της παρουσίας τοξικών στελεχών κυανοβακτηρίων σε μια λίμνη. Σημειώνεται ότι οι διάφορες μέθοδοι δίνουν συμπληρωματικές πληροφορίες για την παρουσία κυανοτοξινών στο δείγμα και η συνολική ερμηνεία των αποτελεσμάτων απαιτεί πολύ καλή γνώση της επίδοσης και του συσχετισμού των μεθόδων μεταξύ τους.



Σχήμα 2: Οι κυριότερες μέθοδοι προσδιορισμού κυανοτοξινών σε νερά

2. Μετρολογικά προβλήματα και προτεινόμενες λύσεις

2.1. Πρότυπες ουσίες και πρότυπα διαλύματα

Μικρός μόνο αριθμός κυανοτοξινών είναι διαθέσιμες ως πρότυπες ουσίες και αυτό λόγω της δύσκολης απομόνωσης και καθαρισμού από τις καλλιέργειες των κυανοβακτηρίων, της σχετικά μικρής ζήτησης και του αυξημένου κόστους. Οι πρότυπες ουσίες παράγονται και πωλούνται σε πολύ μικρές ποσότητες, συνήθως της τάξης των 10-500 μg. Αυτό σημαίνει ότι δεν είναι δυνατή από το εργαστήριο η παρασκευή προτύπων διαλυμάτων με ζύγιση. Η ακριβής συγκέντρωση υπολογίζεται βάσει του μοριακού συντελεστή απορρόφησης (ϵ) των ουσιών σε καθορισμένα μήκη κύματος, από τιμές της βιβλιογραφίας. Οι τιμές αυτές αρκετές φορές διαφέρουν σημαντικά μεταξύ τους με αποτέλεσμα να υπάρχει αβεβαιότητα ως προς την πραγματική συγκέντρωση των προτύπων διαλυμάτων.

Ένα σχετικό παράδειγμα αποτελεί η περίπτωση της τοξίνης cylindrospermopsin (CYN-Σχήμα 1). Οι τιμές του ϵ (262nm) που αναφέρονταν στη βιβλιογραφία μέχρι το 2008 για τη CYN ήταν 5800 (Ohtani et al., 1992), 5900 (Banker et al., 1997), 6100 (Harada et al., 1994), και 6250 (Banker et al., 2000). Παρ' όλα αυτά, πρόσφατα οι Sano et al. (2008) ανέφεραν τιμή ϵ 9800 που διαφέρει σημαντικά από τις προηγούμενες και η διαφορά αυτή αποδόθηκε στη βελτιωμένη μέθοδο καθαρισμού της CYN. Η τιμή ϵ των Sano *et al.* έχει υιοθετηθεί και από το National Research Council Institute for Marine Biosciences του Καναδά (NRC, 2006), το οποίο παράγει και διανέμει πρότυπα διαλύματα κυανοτοξινών. Η αλλαγή αυτή σημαίνει ότι θα πρέπει να επανεκτιμηθούν ως προς τα ποσοτικά αποτελέσματα όλες οι μελέτες που είχαν γίνει για την CYN μέχρι και το 2008. Από πρακτική άποψη, τα εργαστήρια θα πρέπει να παρακολουθούν τις εξελίξεις στη βιβλιογραφία και σε κάθε περίπτωση να αναφέρουν τον τρόπο υπολογισμού της συγκέντρωσης των προτύπων διαλυμάτων ώστε να είναι δυνατές συγκρίσεις αλλά και μελλοντικές διορθώσεις.

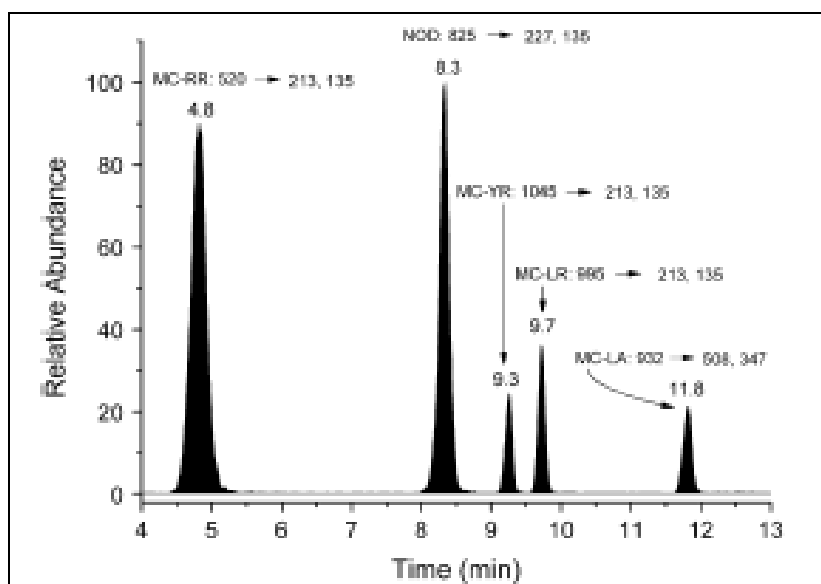
2.2. Προσδιορισμοί σε πραγματικά περιβαλλοντικά δείγματα

Ως προϊόντα μεταβολισμού των κυανοβακτηρίων, οι κυανοτοξίνες παράγονται στο εσωτερικό των κυττάρων από όπου στη συνέχεια μπορούν σε κάποιο βαθμό να απελευθερωθούν στο νερό. Ο βαθμός στον οποίο απελευθερώνονται στο νερό εξαρτάται και από το είδος της τοξίνης. Για παράδειγμα, οι μικροκυστίνες παραμένουν κατά το μεγαλύτερο ποσοστό τους στο εσωτερικό του κυττάρου και απελευθερώνονται στο νερό κυρίως μετά το θάνατο και τη λύση της κυτταρικής μεμβράνης. Σε αντίθεση, η CYN και τα ανάλογά της περνούν κατά το μεγαλύτερο ποσοστό στην υδατική φάση στη διάρκεια ζωής των κυττάρων (Falconer & Humpage, 2006). Μετά την απελευθέρωσή τους στο νερό, οι κυανοτοξίνες μπορούν να παραμείνουν διαλυμένες στο νερό ή να προσροφηθούν σε αιωρούμενα σωματίδια, ιζήματα ή σε άλλους μικροοργανισμούς (Codd et al., 2010). Η μελέτη της κατανομής των κυανοτοξινών στο οικοσύστημα είναι πολύ σημαντική για την εκτίμηση των κινδύνων για τον άνθρωπο και το περιβάλλον και την κατανόηση των λειτουργιών και των μηχανισμών αποικοδόμησης των κυανοτοξινών. Οι προσδιορισμοί των διαφόρων κλασμάτων των κυανοτοξινών είναι δυνατοί μετά από κατάλληλη επεξεργασία και εκχύλιση των δειγμάτων. Οι μέθοδοι αυτές δεν έχουν εναρμονιστεί μεταξύ των εργαστηρίων και επομένως δεν είναι βέβαιο το τι μετράται κάθε φορά. Σημειώνεται ότι μόνο για τις μικροκυστίνες υπάρχει επί του παρόντος πρότυπη διαδικασία προσδιορισμού του ενδοκυτταρικού κλάσματος (ISO 20179).

2.3. Παρεμποδίσσεις - σφάλματα

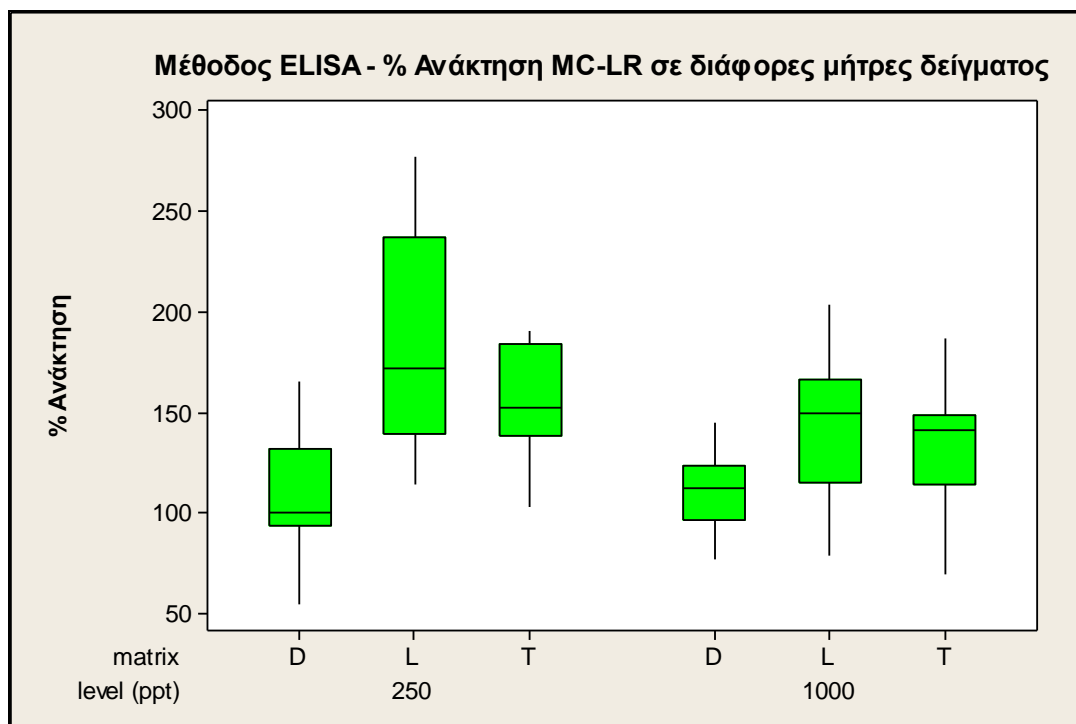
Η εξέλιξη της τεχνικής LC-MS/MS με την τεχνολογία τριπλού τετραπόλου έχει οδηγήσει σήμερα στην αποδοχή της ως το πλέον αξιόπιστο εργαλείο για την ταυτοποίηση και τον ποσοτικό προσδιορισμό των κυανοτοξινών. Η δυνατότητα παρακολούθησης των μεταπτώσεων από μητρικά σε θυγατρικά ιόντα με την τεχνική MS/MS προσφέρει τέτοια εκλεκτικότητα και ευαισθησία που μπορεί να οδηγήσει στην εκτίμηση ότι δεν είναι απαραίτητος ο χρωματογραφικός διαχωρισμός (Meriluoto, 2005). Η λογική αυτή μπορεί να οδηγήσει σε σφάλματα, ιδιαίτερα όταν συνυπάρχουν πολλές διαφορετικές τοξίνες με παραπλήσια δομή.

Ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η κατηγορία των μικροκυστινών. Η κατηγορία αυτή αποτελείται από 80 γνωστές μέχρι σήμερα ουσίες, για 10 από τις οποίες υπάρχει διαθέσιμο αναλυτικό πρότυπο. Η δομή όλων των μικροκυστινών είναι κυκλοεπταπεπτιδική και σε όλες τις μικροκυστίνες υπάρχει το χαρακτηριστικό αμινοξύ ADDA. Για τις περισσότερες μικροκυστίνες, ο ιονισμός και η θραυσματοποίηση στο τριπλό τετράπολο οδηγούν στη μετάπτωση Μητρικό ιόν → ADDA και τελικώς μετράται το ιόν με μάζα 135.0 (m/z του ADDA). Αυτό σημαίνει ότι όταν δεν υπάρχει διαχωρισμός των μικροκυστινών στη στήλη (Σχήμα 3), υπάρχει ο κίνδυνος ο φασματογράφος μάζας να μην μπορεί να διακρίνει το σήμα (m/z 135.0) που προέρχεται από διαφορετικά μητρικά ιόντα (διαφορετικές μικροκυστίνες). Σε πειράματα που έχουν πραγματοποιηθεί στα εργαστήριά μας έχει βρεθεί ότι όταν δεν επιτυγχάνεται διαχωρισμός παρατηρείται ψευδής ανίχνευση μικροκυστινών σε χαμηλά επίπεδα (έως και μερικά ppt). Τα σφάλματα αυτά, παρότι μικρά από ποσοτικής άποψη, μπορεί να έχουν μεγάλη σημασία όταν οι μετρήσεις γίνονται για ανίχνευση των κυανοτοξινών στα πρώτα στάδια ανάπτυξης του bloom. Σημειώνεται, ότι ακόμη και όταν επιτυγχάνεται διαχωρισμός, υπάρχουν πολλές (~70) μικροκυστίνες για τις οποίες δεν υπάρχει πρότυπη ουσία και που επομένως πιθανώς να συνεκλούνται με τις υπό προσδιορισμό ουσίες. Για τους παραπάνω λόγους θα πρέπει να επιτυγχάνεται επαρκής διαχωρισμός όπου αυτό είναι δυνατό και να ρυθμίζονται οι παράμετροι του φασματογράφου μάζας έτσι ώστε να ελαχιστοποιούνται οι παρεμβολές.



Σχήμα 3: Διαχωρισμός 5 μικροκυστινών και προσδιορισμός τους με LC-MS/MS (Triantis et al., 2010).

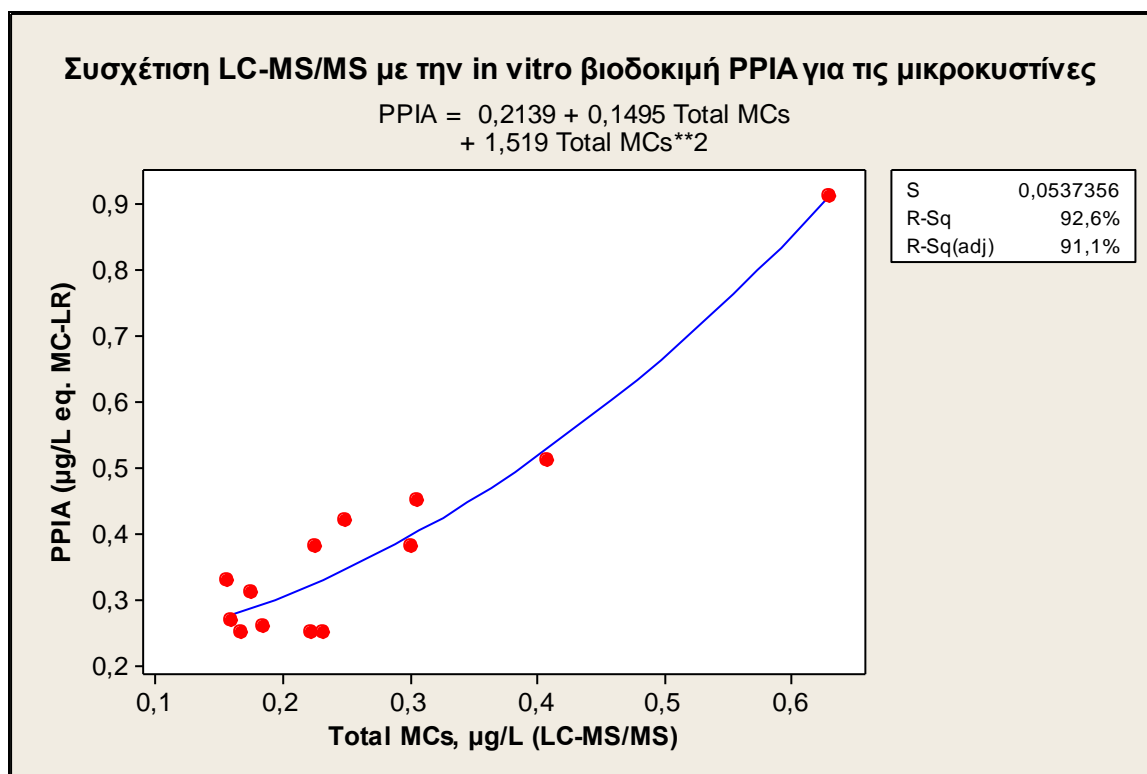
Πολύ σημαντικές για όλες τις μεθόδους είναι οι επιδράσεις της μήτρας του δείγματος. Ακόμη και στην τεχνική LC-MS/MS έχει δειχθεί ότι συστατικά του δείγματος μπορεί να προκαλέσουν καταστολή ή ενίσχυση του σήματος (Sproof, 2005). Σε μεθόδους όπως η ELISA, τα φαινόμενα μήτρας μπορεί να οδηγήσουν σε δραματικές μεταβολές των αποτελεσμάτων (Σχήμα 4). Είναι σήμερα αποδεκτό ότι όλες οι μέθοδοι προσδιορισμού κυανοτοξινών θα πρέπει να επικυρώνονται και ως προς τις επιδράσεις μήτρας δείγματος.



Σχήμα 4: Μέθοδος ELISA - % Ανακτήσεις Μικροκυστίνης-LR (MC-LR) σε δείγματα D: απεσταγμένου νερού, L: λίμνης και T: νερού βρύσης.

2.4 Συσχέτιση και ερμηνεία αποτελεσμάτων

Τα αποτελέσματα που λαμβάνονται από τις διάφορες μεθόδους (Σχήμα 1) θα πρέπει να συσχετιστούν και να αλληλοσυμπληρωθούν ώστε να υπάρχει μία ενιαία και συνολική ερμηνεία. Αυτό δεν είναι πάντα εύκολο, ιδιαίτερα όταν συσχετίζονται βιοδοκιμές με μικρή εκλεκτικότητα με μεθόδους υψηλής ακρίβειας και εκλεκτικότητας όπως οι τεχνικές LC-MS. Για την ορθή ερμηνεία θα πρέπει να λαμβάνονται υπόψη η επίδοση και η αβεβαιότητα των μεθόδων όπως προκύπτουν από την επικύρωση, το είδος των δειγμάτων, οι πιθανές παρεμποδίσεις καθώς και συμπληρωματικά δεδομένα από την ταυτοποίηση των κυανοβακτηρίων. Είναι καλό ένα εργαστήριο που χρησιμοποιεί πολλές μεθοδολογίες να διερευνά τη συσχέτισή τους ώστε να είναι σε θέση να επιβεβαιώνει τα αποτελέσματα ή να ανιχνεύει σημαντικές αποκλίσεις και να λαμβάνει τις ανάλογες ενέργειες. Η προτιμότερη πρακτική είναι η σύγκριση όλων των μεθόδων με τη μέθοδο LC-MS/MS που γενικά υπερέχει σε ευαισθησία, εκλεκτικότητα, ακρίβεια και πιστότητα. Στο παράδειγμα που ακολουθεί (Σχήμα 5) φαίνεται η δημιουργία σχέσης μεταξύ της *in vitro* βιοδοκιμής της αναστολής της πρωτεϊνικής φωσφατάσης (PPIA) και της μεθόδου LC-MS/MS για τις μικροκυστίνες (MCs) σε πραγματικά δείγματα επιφανειακών νερών. Η σχέση αυτή μπορεί να χρησιμοποιηθεί ώστε να πραγματοποιείται διαλογή (screening) των δειγμάτων με τη γρήγορη μέθοδο PPIA.



Σχήμα 5: Συσχέτιση αποτελεσμάτων LC-MS/MS με την in vitro δοκιμή PPIA σε πραγματικά δείγματα επιφανειακών νερών.

2.5. Τυποποίηση των μεθόδων και διεργαστηριακές συγκρίσεις

Η τυποποίηση των μεθόδων προσδιορισμού κυανοτοξινών σε νερά δεν έχει μέχρι σήμερα επεκταθεί σε ουσίες πέραν των μικροκυστινών, για τις οποίες υπάρχει η πρότυπη μέθοδος ISO 20179:2005. Αυτό σημαίνει ότι δεν υπάρχει εναρμόνιση στις μεθόδους που χρησιμοποιούν τα εργαστήρια τόσο για την επεξεργασία των δειγμάτων όσο και για την ταυτοποίηση και τον ποσοτικό προσδιορισμό. Μία σημαντική προσπάθεια στον τομέα αυτό αποτέλεσε το Ευρωπαϊκό Πρόγραμμα TOXIC (2005), το οποίο ως παραδοτέο είχε πρότυπες διαδικασίες για τον προσδιορισμό κυανοτοξινών (μικροκυστινών, anatoxin-a, cylindrospermopsin) σε νερά.

Υλικά αναφοράς (CRMs) όπως π.χ. αφυδατωμένες καλλιέργειες τοξικών στελεχών με πιστοποιημένες συγκεντρώσεις τοξινών δεν είναι μέχρι τώρα διαθέσιμα. Τα υλικά αυτά θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν στις επικυρώσεις αλλά και στον έλεγχο ποιότητας των μεθόδων. Το Εθνικό Συμβούλιο Έρευνας του Καναδά (NRC, 2006) διαθέτει περιορισμένο αριθμό από πιστοποιημένα πρότυπα διαλύματα βαθμονόμησης για μικρό αριθμό κυανοτοξινών.

Τέλος, δεν υπάρχουν «ανοικτά» διεργαστηριακά σχήματα σε συστηματική βάση και οι λίγες διεργαστηριακές συγκρίσεις που έχουν πραγματοποιηθεί έχουν γίνει στα πλαίσια ερευνητικών κυρίως προγραμμάτων.

3. Συμπεράσματα

Οι προσδιορισμοί κυανοτοξινών σε νερά έχουν μεγάλη σημασία για τη δημόσια υγεία καθώς και για την προστασία υδατοκαλλιεργειών και επιχειρήσεων αναψυχής παγκοσμίως. Το μεγάλο πλήθος ουσιών διαφορετικής χημικής δομής και τοξικολογικής δράσης, η ποικιλία μεθόδων προσδιορισμού (χημικές, βιολογικές), η μη διαθεσιμότητα

αρκετών προτύπων ουσιών και υλικών αναφοράς και το χαμηλό επίπεδο τυποποίησης των μεθόδων αποτελούν σημαντικά προβλήματα στην εναρμόνιση των μεθοδολογιών και στην αξιοπιστία των μετρήσεων που απαιτείται για την εκτίμηση των κινδύνων. Η βελτίωση της παρούσας κατάστασης απαιτεί συνεργασία σε διεθνές επίπεδο μεταξύ των εργαστηρίων (χημικών, βιολογικών, τοξικολογικών) που ασχολούνται με τους προσδιορισμούς αυτούς.

Σημειώνεται ότι στα πλαίσια της Ευρωπαϊκής Δράσης COST που συντονίζεται από την ΕΥΔΑΠ με θέμα “Cyanobacterial blooms and toxins in water resources: Occurrence, impacts and management” ειδική Ομάδα Εργασίας από ευρωπαϊκά εργαστήρια θα ασχοληθεί με την επεξεργασία των παραπάνω θεμάτων.

Αναφορές

- Apeldoorn, M.E., Egmond, H.P., Gerrit J. A. Speijers, G.J.A., Bakker, G.J.I. (2007) “Toxins of Cyanobacteria” *Mol. Nutr. Food Res.*, 51, 7 – 60.
- Banker, R., Carmeli, S., Hadas, O., Teltsch, B., Porat, R., Sukenik, A., (1997) “Identification of cylindrospermopsin in *Aphanizomenon ovalisporum* (Cyanophyceae) isolated from Lake Kinneret”, *Israel. J. Phycol.* 33 (4), 613–616.
- Banker, R., Teltsch, B., Sukenik, A., Carmeli, S., (2000), “7-Epicylindrospermopsin, a toxic minor metabolite of the cyanobacterium *Aphanizomenon ovalisporum* from Lake Kinneret”, *Israel. J. Nat. Prod.* 63 (3), 387–389.
- Codd, G.A. (1995) “Cyanobacterial toxins: Occurrence, properties and biological significance”, *Water Sci. & Technol.*, 32, 149-156.
- Codd, G.A., Meikleham, L.F., Young, F.M., Menzel, D., Wojnicz, A., (2010) “Intracellular and Extracellular Cyanotoxins: Implications for their Environmental Significance and Health Risk Management” *Presentation in the final B-BLOOMS-2 Seminar*, Brussels, 2010.
- Falconer, I.R. (2005), “Cyanobacterial toxins of drinking water supplies”. Boca Raton, Florida: CRC Press.
- Falconer, I.R. and Humpage, A.R. (2006). Cyanobacterial (blue-green algal) toxins in water supplies: cylindrospermopsins. *Environ. Toxicol.* **21**, 299-304.
- Harada, K., Ohtani, I., Iwamoto, K., Suzuki, M., Watanabe, M.F., Watanabe, M., Terao, K., (1994), “Isolation of cylindrospermopsin from a cyanobacterium *Umezakia natans* and its screening method”, *Toxicon* 32 (1), 73–84.
- Kinnear, S. (2010) “Cylindrospermopsin: A decade of progress on bioaccumulation research”. *Marine Drugs* **8**, 542-564.
- Meriluoto, J., Codd, G.A. (2005), “TOXIC: Cyanobacterial Monitoring and Cyanotoxin Analysis”, Abo Akademi University Press.

- Meriluoto, J. (2005), "Selection of Analytical Methodology", in TOXIC: Cyanobacterial Monitoring and Cyanotoxin Analysis", Abo Akademi University Press.
- NRC (2006), CRM-CYN Catalogue, 2006. NRC Institute for Marine Biosciences, Halifax, Canada.
- Ohtani, I., Moore, R.E., Runnegar, M.T.C. (1992) "Cylindrospermopsin: a potent hepatotoxin from the blue-green alga *Cylindrospermopsis raciborskii*". *J. Am. Chem. Soc.* 114 (20), 7941–7942.
- Sano, T., Kikuchi, S., Kubo, T., Takagi, H., Hosoya, K., Kaya, K. (2008), "New values of molecular extinction coefficient and specific rotation for cyanobacterial toxin cylindrospermopsin", *Toxicon* 51, 717-719.
- Spoof, L. (2005), "Microcystins and Nodularins", in TOXIC: Cyanobacterial Monitoring and Cyanotoxin Analysis", Abo Akademi University Press.
- Triantis, T., Tsimeli, K., Kaloudis, T., Thanassoulas, N., Lytras, E., Hiskia, A. (2010), "Development of an integrated laboratory system for the monitoring of cyanotoxins in surface and drinking waters", *Toxicon* 55:979–989.
- Pelaez, M., Antoniou, M.G. He X., Dionysiou, D.D., De La Cruz, A.A., Tsimeli, K., Triantis, T., Hiskia, A., Kaloudis, T., Williams, C., Aubel, M., Chapman, A., Foss, A., Khan, U., O'Shea, K.E., Westrick, J. (2010) Sources and Occurrence of Cyanotoxins Worldwide, in: D. Fatta-Kassinos, K. Bester, K. Kümmerer (Eds.) *Xenobiotics in the Urban Water Cycle*, Springer Netherlands, 2010, pp. 101- 127.