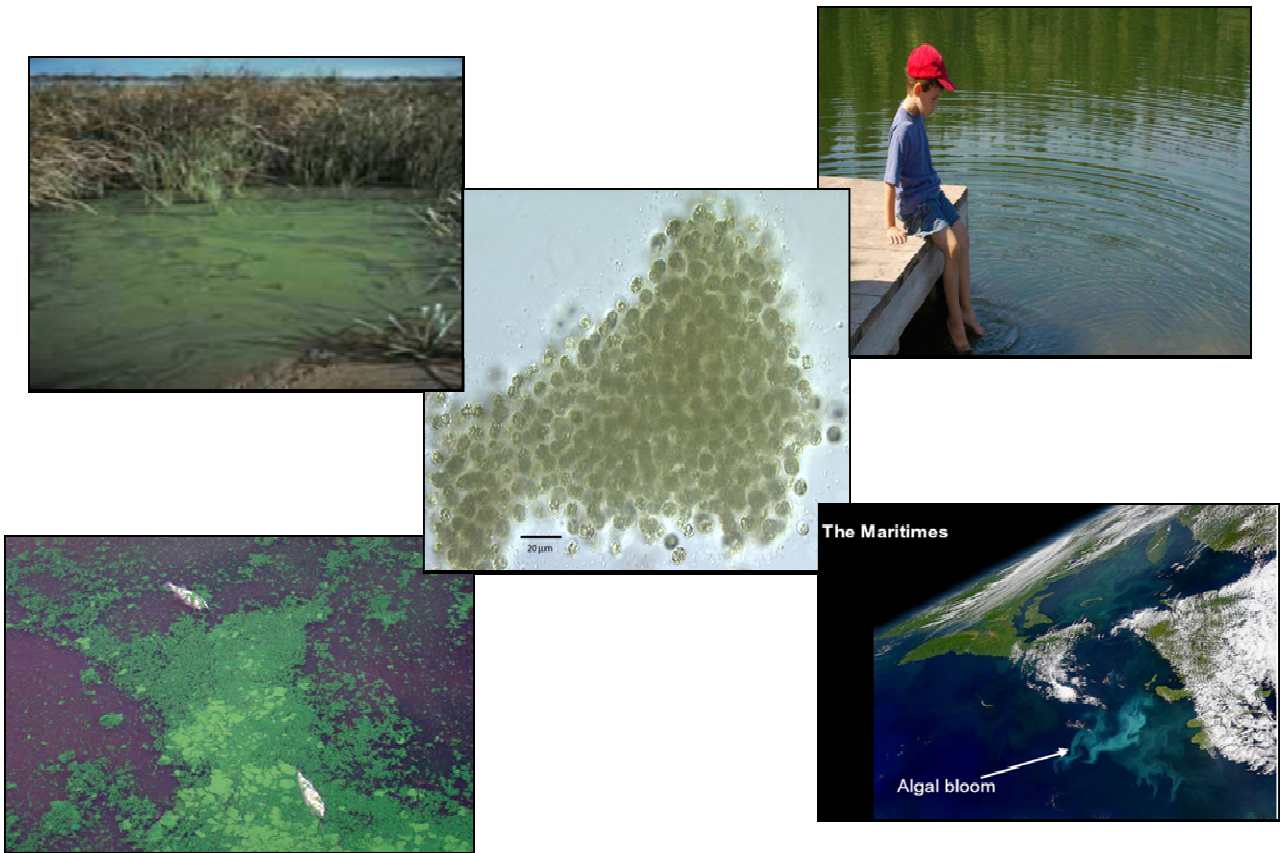


ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΕΦΑΡΜΟΓΩΝ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΩΝ

ΠΑΠΑΔΗΜΗΤΡΙΟΥ ΘΕΟΔΩΤΗ
ΒΙΟΛΟΓΟΣ
ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

**Επιπτώσεις των συγκεντρώσεων των μικροκυστινών σε
υδρόβιους ζωικούς οργανισμούς**



ΙΩΑΝΝΙΝΑ ΝΟΕΜΒΡΙΟΣ 2010

ΕΚΠΟΝΗΣΗ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ

Τόπος

Τμήμα Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

Χρόνος

2005-2010

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή

(απόφαση Γ.Σ.Ε.Σ. αρ 69/16-12-2005, Τμήμα Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων)

Λεονάρδος Ιωάννης, Αναπληρωτής Καθηγητής, Τμήμα Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων (επιβλέπων)

Πηλίδης Γεώργιος, Καθηγητής, Τμήμα Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

Σταλίκας Κωνσταντίνος, Αναπληρωτής Καθηγητής, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

Ορισμός Θέματος

(απόφαση Γ.Σ.Ε.Σ. αρ 69/16-12-2005, Τμήμα Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων)

Εξεταστική Επιτροπή

(απόφαση Γ.Σ.Ε.Σ. αρ. 159/6-7-2010, Τμήμα Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων)

Αλμπάνης Τριαντάφυλλος, Καθηγητής Τμήματος Χημείας, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

Πηλίδης Γεώργιος, Καθηγητής Τμήματος Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

Αθανασοπούλου Φωτεινή, Καθηγήτρια Τμήματος Κτηνιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Λεονάρδος Ιωάννης, Αναπληρωτής Καθηγητής Τμήματος Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

Σταλίκας Κωνσταντίνος, Αναπληρωτής Καθηγητής Τμήματος Χημείας, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

Κάγκαλου Ιφιγένεια, Επίκουρος Καθηγήτρια Τμήματος Γεωπονίας, Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Γκέλης Σπυρίδων, Λέκτορας Τμήματος Βιολογίας, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης

«Η έγκριση της παρούσας Διδακτορικής Διατριβής από το Τμήμα Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνώμων του συγγραφέως» (Ν. 5343/1932, άρθρο 202, _αρ. 2)

Στην οικογένεια μου

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	- 10 -
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΩΝ	- 12 -
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1- ΕΙΣΑΓΩΓΗ	- 13 -
1.1 ΚΥΑΝΟΒΑΚΤΗΡΙΑ	- 14 -
1.1.1 Χαρακτηριστικά των κυανοβακτηρίων	- 14 -
1.1.2 Άνθηση κυανοβακτηρίων-Ευτροφισμός.....	- 19 -
1.1.3 Χωρική και χρονική κατανομή των κυανοβακτηρίων.....	- 20 -
1.2 ΚΥΑΝΟΤΟΞΙΝΕΣ	- 22 -
1.2.1 Ηπατοτοξικά κυκλικά πεπτίδια.....	- 24 -
1.2.2 Νευροτοξικές αλκαλοειδείς ενώσεις.....	- 27 -
1.2.3 Κυτοτοξικές αλκαλοειδείς ενώσεις.....	- 30 -
1.2.4 Ερεθιστικές ενδοτοξίνες.....	- 31 -
1.3 ΤΟΞΙΚΗ ΔΡΑΣΗ ΜΙΚΡΟΚΥΣΤΙΝΩΝ	- 32 -
1.4 ΒΙΟΣΥΣΣΩΡΕΥΣΗ ΤΩΝ ΜΙΚΡΟΚΥΣΤΙΝΩΝ	- 34 -
1.4.1 Συσσώρευση μικροκυστινών στο ζωοπλαγκτόν.....	- 35 -
1.4.2 Συσσώρευση μικροκυστινών στα μαλάκια και στα καρκινοειδή.....	- 35 -
1.4.3.Συσσώρευση μικροκυστινών στους ιχθύες.....	- 36 -
1.4.4 Συσσώρευση μικροκυστινών στον ανθρώπινο πληθυσμό.....	- 37 -
1.5 ΜΙΚΡΟΚΥΣΤΙΝΕΣ ΣΤΑ ΕΣΩΤΕΡΙΚΑ ΥΔΑΤΑ ΤΗΣ ΕΛΛΑΔΟΣ	- 39 -
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2	- 41 -
ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ	- 41 -
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3	- 43 -
Εποχιακή διακύμανση της συγκέντρωσης των μικροκυστινών στη Λίμνη Παμβώτιδα και εκτίμηση των περιβαλλοντικών παραγόντων που τη διαμορφώνουν	- 43 -
3.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ	- 44 -
3.2 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	- 45 -

3.2.1 Περιοχή μελέτης.....	45 -
3.2.2 Περιγραφή δειγματοληψίας.....	47 -
3.2.3. Ποσοτικός προσδιορισμός των ανόργανων θρεπτικών ενώσεων του νερού ...	48 -
3.2.4. Ποσοτικός προσδιορισμός χλωροφύλλης-α.....	49 -
3.2.5. Ποσοτικός προσδιορισμός φυκοκυανίνης.....	50 -
3.2.6 Ποσοτικός προσδιορισμός μικροκυστινών.....	51 -
3.2.6.1 Επεξεργασία και αποθήκευση.....	51 -
3.2.6.2 Εκχύλιση μικροκυστινών.....	52 -
3.2.6.3 Ενζυμοσυνδεδεμένος ανοσοπροσοροφητικός προσδιορισμός (ELISA).....	52 -
3.3 ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ.....	55 -
3.4 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	55 -
3.4.1 Περιβαλλοντικές και βιολογικές παράμετροι της Λίμνης Παμβώτιδας.....	55 -
3.4.2 Συγκεντρώσεις μικροκυστινών και συσχέτιση τους με τις περιβαλλοντικές παραμέτρους του νερού.....	63 -
3.5 ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	71
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4.....	79
Συσσώρευση μικροκυστινών στο νερό και τους ιστούς του ιχθύος <i>Carassius gibelio</i>, δεκατριών εσωτερικών υδάτινων οικοσυστημάτων της Ελλάδος.....	79
4.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	80
4.2 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	80
4.2.1 Υδάτινα οικοσυστήματα μελέτης.....	80
4.2.2 Χαρακτηριστικά του ιχθύος <i>Carassius gibelio</i>	92
4.2.3 Συλλογή δειγμάτων νερού και ιχθύων.....	94
4.2.4 Επεξεργασία και αποθήκευση δειγμάτων.....	94
4.2.5 Εκχύλιση μικροκυστινών.....	95
4.2.5.1 Δείγματα νερού.....	95
4.2.5.2 Δείγματα ιστών του ιχθύος <i>Carassius gibelio</i>	95
4.3. ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ.....	97
4.4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	97

4.4.1 Συγκεντρώσεις μικροκυστινών των υδάτινων οικοσυστημάτων.....	97
4.4.2 Συγκέντρωση μικροκυστινών στους ιστούς του ιχθύος <i>C. gibelio</i>	99
4.5 ΣΥΖΗΤΗΣΗ	104
4.5.1 Παρουσία μικροκυστινών στα εσωτερικά υδάτινα οικοσυστήματα της Ελλάδος	104
4.5.2 Συγκεντρώσεις μικροκυστινών στους ιστούς του ιχθύος <i>C. gibelio</i>	107
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5	112
Υπάρχει συσχέτιση της συγκέντρωσης των μικροκυστινών στους ιστούς ενός ιχθύος των εσωτερικών υδάτων, με το μήκος σώματος του οργανισμού;	112
5.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ	113
5.2 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	114
5.2.1 Χαρακτηριστικά του είδους <i>Rutilus rutilus</i>	114
5.2.2 Συλλογή δειγμάτων ιχθύων.....	116
5.2.3 Επεξεργασία και αποθήκευση δειγμάτων	116
5.2.4 Εκχύλιση και ποσοτικός προσδιορισμός των μικροκυστινών από τους ιστούς των ιχθύων.....	117
5.3. ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ	119
5.4 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	119
5.5 ΣΥΖΗΤΗΣΗ	122
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6	126
Δυναμική των συγκεντρώσεων των μικροκυστινών στους υδρόβιους οργανισμούς της Λίμνης Παμβώτιδας.	126
6.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ	127
6.2 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	128
6.2.1. Περιοχή μελέτης.....	128
6.2.2. Περιγραφή δειγματοληψιών.....	128
6.2.2.1 Συλλογή φυτοπλαγκτού και επιπολασμών κυανοβακτηρίων.....	129
6.2.2.2 Συλλογή ζωοπλαγκτού.....	129
6.2.2.2.1 Ποιοτικός προσδιορισμός ζωοπλαγκτού.....	130
6.2.2.2.2 Διαχωρισμός ζωοπλαγκτού από το φυτοπλαγκτό.....	130

6.2.2.3 Συλλογή μακροασπόνδυλων οργανισμών	131
6.2.2.4 Συλλογή ιχθύων και αμφιβίων	133
6.2.3 Εκχύλιση και ποσοτικός προσδιορισμός μικροκυστινών	135
6.3 ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ	136
6.4 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	137
6.4.1 Κυρίαρχοι φυτοπλαγκτονικοί και ζωοπλαγκτονικοί οργανισμοί και συγκέντρωση μικροκυστινών στο φυτοπλαγκτόν και στο ζωοπλαγκτόν της Λίμνης Παμβώτιδας....	137
6.4.2 Συγκεντρώσεις μικροκυστινών στους μακροασπόνδουλους οργανισμούς	139
6.4.3 Συγκεντρώσεις μικροκυστινών στους ιχθύες και τα αμφίβια	144
6.4.4 Βιομεγέθυνση των μικροκυστινών	148
6.5 ΣΥΖΗΤΗΣΗ	151
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7.....	160
Εκτίμηση της τοξικότητας της κυανοβακτηριακής άνθησης στη Λίμνη Παμβώτιδα με τη χρήση βιοδοκιμών με διαφορετικά είδη οργανισμών.....	160
7.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ	161
7.2 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	162
7.2.1 Συλλογή δειγμάτων με επιπολασμούς κυανοβακτηρίων	162
7.2.2 Εκχύλιση μικροκυστινών	163
7.2.3 Ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός της μικροκυστινης- LR του κυανοβακτηριακού εκχυλίσματος με τη χρήση Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Πιέσεως (HPLC).	163
7.2.4 Βιοδοκιμή με επίμυες.....	166
7.2.5 Βιοδοκιμή με ιχθύες του είδους <i>Danio rerio</i>	167
7.2.5.1 Χαρακτηριστικά του είδους <i>Danio rerio</i>	167
7.2.5.2 Περίληψη οντογένεσης του ιχθύος <i>Danio rerio</i>	169
7.2.5.3 Αναπαραγωγή του <i>Danio rerio</i>	176
7.2.5.4 Έκθεση εμβρύων και λαρβών του <i>Danio rerio</i> στο κυανοβακτηριακό εκχύλισμα.....	178
7.3 ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ	179
7.4 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	180

7.4.1 Βιοδοκιμή σε επίμυες	180
7.4.2 Βιοδοκιμή σε ιχθύες του είδους <i>Danio rerio</i>	183
7.5 ΣΥΖΗΤΗΣΗ	190
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8	196
Διερεύνηση της πιθανής απειλής της δημόσιας υγείας από την παρουσία των μικροκυστινών στα ελληνικά εσωτερικά υδάτινα οικοσυστήματα	196
8.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ-ΣΚΟΠΟΣ	197
8.2. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ	205
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 9	214
ΓΕΝΙΚΑ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ	214
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	222
ABSTRACT	228
ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	232
ΔΙΕΘΝΗΣ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	232
ΕΙΣΑΓΩΓΙΚΕΣ ΕΙΚΟΝΕΣ	283

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Το χρονικό διάστημα που έλαβε χώρα η παρούσα διατριβή, υπήρξε πολύτιμο διότι συνέβαλε στην ωρίμανσή μου ως επιστήμονα, αλλά και ως ανθρώπου. Οφείλω ένα μεγάλο ευχαριστώ σε δυο ανθρώπους που στάθηκαν αρωγοί μου στην παραπάνω διαδικασία. Ευχαριστώ λοιπόν τον επιβλέποντα καθηγητή μου, κύριο Ιωάννη Λεονάρδο, Αναπληρωτή Καθηγητή, για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε, για τη συμπαράστασή του αλλά και για την καθοδήγησή του. Ευχαριστώ την Επίκουρο Καθηγήτρια κυρία Ιφιγένεια Κάγκαλου γιατί πάντοτε στέκεται δίπλα μου ως φύλακας-άγγελος, εντός και εκτός πανεπιστημίου.

Ευχαριστώ επίσης από καρδιάς:

Τον Καθηγητή κ. Πηλίδη Γεώργιο για την τιμή που μου έκανε να συμμετέχει στην τριμελή επιτροπή, αλλά και για τις διορθώσεις του.

Τον Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Σταλικά Κωνσταντίνο για την υπομονή και επιμονή του, καθώς και γιατί με ώθησε να αγαπήσω ακόμα πιο πολύ τη Χημεία.

Τον Καθηγητή κ. Αλμπάνη Τριαντάφυλλο, την Καθηγήτρια κα. Αθανασσοπούλου Φωτεινή και τον Λέκτορα κ. Γκέλη Σπύρο για τη συμμετοχή τους στην επταμελή εξεταστική επιτροπή, για τις διορθώσεις και τις υποδείξεις τους.

Τον Επίκουρο Καθηγητή κ. Μπακόπουλο Βασίλη, για τις εύστοχες υποδείξεις του σχετικά με την πειραματική πορεία και τη συνεργασία του.

Την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια κα Μούτου Κατερίνα, για την πρόθυμη συνεργασία της.

Τη Λέκτορα κα. Καραγιάννη Ήρα για την πολύτιμη βοήθεια της σχετικά με την φυτοπλαγκτονική παρατήρηση.

Τον Διδάκτορα κ. Καραταπάνη Ανδρέα και τον Διδάκτορα κ. Οικονόμου Ευάγγελο για τη βοήθεια τους και την υπομονή τους.

Τον Διδάκτορα κ. Λιάσκο Ρωμάν για τις πολύτιμες συμβουλές του πάνω στη στατιστική επεξεργασία, αλλά και για το γεγονός ότι πάντοτε μου υπενθύμιζε ότι τίποτα στη ζωή δεν είναι δεδομένο.

Την Διδάκτορα κα. Αναστασιάδου Χρύσα γιατί ήταν πάντοτε πρόθυμη να με βοηθήσει σε κάθε δυσκολία, αλλά και για τις επικοινωνητικές συζητήσεις περί επιστήμης και ζωής...

Την Υποψήφια Διδάκτορα κα. Τσουμάνη Μιράντα για τη βοήθεια της στην πειραματική διαδικασία, αλλά και γιατί μου έδειξε πόση δύναμη και θέληση μπορεί να κρύβει κάποιος μέσα του...

Την Υποψήφια Διδάκτορα κα. Λούσια Βέρα γιατί στάθηκε δίπλα μου τις δύσκολες στιγμές με τον καλύτερο τρόπο...

Τον Μεταπτυχιακό φοιτητή κ. Ντάκη Αλέξανδρο για τη βοήθεια του, και για την ικανότητα του να με 'ελευθερώνει' από το άγχος μου...

Το Βιολόγο κ. Αντωνόπουλο Αντώνη για τη βοήθεια του στον προσδιορισμό του ζωοπλαγκτού αλλά και για την ουσιαστική υποστήριξή του καθόλη τη διάρκεια της διατριβής.

Την Υποψήφια Διδάκτορα κα. Βραζέλη Εύη, την Μεταπτυχιακή φοιτήτρια κα. Παπιγγιώτη Όλγα, τη Βιολόγο κα. Μανδάνη Μαργαρίτα και τον Υποψήφιο Διδάκτορα κ. Γκένα Χρήστο για την υποστήριξη τους.

Τη Βιολόγο κα. Τσολάκου Θεοδοσία και τη Βιολόγο κα. Αρμένη Έφη για τη βοήθεια τους και για την εμπιστοσύνη που μου έδειξαν...

Την κα. Παπάζογλου Έλσα και τη κα. Παπαδοπούλου Νίκη γιατί ήταν και είναι δίπλα μου, όπως κανείς άλλος δε θα μπορούσε...

Τον θείο μου Σγούρα Κωνσταντίνο για την ενθάρρυνση του, τις συμβουλές του και την αγάπη που πάντοτε μου προσφέρει.

Τον άνθρωπο που ίσως ταλαιπώρησα πιο πολύ καθόλη τη διάρκεια της παρούσας διατριβής και δεν είναι άλλος από την αδερφή μου. Σε ευχαριστώ που είσαι πάντα δίπλα μου...

Τους γονείς μου, γιατί είναι η αφετηρία κάθε προσπάθειάς μου και γιατί στολίζουν με απέραντη αγάπη κάθε σημαντικό κεφάλαιο της ζωής μου, όπως αυτό της διατριβής μου, η οποία δικαιοματικά τους αφιερώνεται.

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΩΝ

Ορισμένα από τα αποτελέσματα της Διδακτορικής Διατριβής ανακοινώθηκαν σε εθνικά και διεθνή συνέδρια, δημοσιεύθηκαν σε διεθνή περιοδικά και παραθέτονται ακολούθως:

ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ ΣΕ ΣΥΝΕΔΡΙΑ

- 1.Theodoti Papadimitriou, Ifigenia Kagalou, Vasilios Bakopoulos, Leonardos Ioannis
Occurrence of Microcystins in Lake Pamvotis (Greece) and tissue distribution in the fish species, *Carassius gibelio* (Bloch.), *SYMPOSIUM FOR EUROPEAN FRESHWATER SCIENSES*, 2007, Italy
- 2.Θεοδότη Παπαδημητρίου, Ιφιγένεια Κάγκαλου και Ιωάννης Λεονάρδος
Μελέτη της συγκέντρωσης των μικροκυστινών σε ιστούς του είδους *Carassius gibelio* σε δεκατρείς λίμνες της Ελλάδος, διαφορετικού βαθμού ευτροφισμού, *Συνέδριο Πανελληνίας Ένωσης Βιολόγων με θέμα: Περιβάλλον και Δημόσια Υγεία*, 2008, Θεσσαλονίκη
- 3.Θεοδότη Παπαδημητρίου, Ιφιγένεια Κάγκαλου και Ιωάννης Λεονάρδος
Υπολογισμός της φυκοκυανίνης σε μια εύτροφη λίμνη. Μπορεί η φυκοκυανίνη να χρησιμοποιηθεί ως εργαλείο εκτίμησης της παρουσίας των κυανοβακτηρίων; *31^ο Επιστημονικό Συνέδριο της Ελληνικής Εταιρείας Βιολογικών Επιστημών, Πάτρα*, 2009.
- 4.Papadimitriou Theodoti, Armeni Euthimia, Kagalou Ifigenia, Leonardos Ioannis
Case study on toxicity of crude extract of Cyanobacteria on embryos and larvae of fish, *11th International Congress on the Zoogeography and Ecology of Greece and Adjacent Regions, Crete*, 2009
- 5.Theodoti Papadimitriou, Ioannis Leonardos, Maria Tsoumani and Ifigenia Kagalou
Microcystin occurrence and distribution along Greek lakes with different environmental condition, *Protection and Restoration of the Environment X, Corfu (Ionian Sea)*, 2010.
- 6.Theodoti Papadimitriou, Ioannis Leonardos, Ifigenia Kagalou
Seasonal variation of microcystins and phycocyanin concentrations in a Mediterranean shallow lake: link with environmental factors, *8th International Conference on Toxic Cyanobacteria (ICTC8), Turkey*, 2010
- 7.T. Papadimitriou, S. Tsikogias, S. Georgiou, I.Leonardos, I.Kagalou, K.Moutou
Responses of antioxidant systems of common carp (*Cyprinus carpio* L.) to natural yearly exposure of microcystins, *8th International Conference on Toxic Cyanobacteria (ICTC8), Turkey*, 2010

ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ ΣΕ ΔΙΕΘΝΗ ΠΕΡΙΟΔΙΚΑ

1.Papadimitriou, T., Kagalou, I., Bacopoulos, V., & Leonardos, I. (2009). Accumulation of microcystins in water and fish tissues: An estimation of risks associated with microcystins in most of the Greek lakes. *Environmental Toxicology*, 25, (4), 418-427.

2.Papadimitriou Theodoti, Ifigenia Kagalou, Ioannis D. Leonardos. Measurement of microcystin concentrations in the tissues of a protected fish species (*Rutilus panosi*) from a Mediterranean shallow lake. (Υποβλήθηκε σε κρίση)

3.Papadimitriou Theodoti, Ethimia Armeni, Ifigenia Kagalou, Constantine D. Stalikas and Ioannis.D. Leonardos. Detection of microcystins in Pamvotis lake water and assessment of cyanobacterial bloom toxicity. (Υποβλήθηκε σε κρίση)

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1- ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 ΚΥΑΝΟΒΑΚΤΗΡΙΑ

1.1.1 Χαρακτηριστικά των κυανοβακτηρίων

Η παρουσία των κυανοβακτηρίων ήταν ήδη γνωστή στην ανθρωπότητα εδώ και δύο χιλιάδες χρόνια, όπως μαρτυρούν περιστασιακές περιγραφές από ταξιδιώτες, ιστορικούς και σεναριογράφους όπως ο Shakespeare (Fogg et al., 1973; Codd & Beattie, 1991). Η περιγραφή της λίμνης Llangrose της Ουαλίας, από τον Geraldus Cambrensis το 1188 σύμφωνα με τους Codd&Beattie,(1991), «μαρτυρά» την ύπαρξη επιπλέοντων κυανοβακτηρίων: *«Η λίμνη έχει υπερφυσικές ικανότητες αφού κάποιες φορές χρωματίζεται με ανοικτό πράσινο, ενώ άλλες φορές χρωματίζεται κόκκινη σε κάποια σημεία της λης και το νερό της κινείται σε ρεύματα και στροβίλους»*. Η παραπάνω περιγραφή της λίμνης, ταιριάζει με την εικόνα αρκετών ελληνικών λιμνών που χαρακτηρίζονται από την παρουσία των κυανοβακτηρίων (Εικόνα 1.1). Επιπλέον, υπάρχουν αποδείξεις ότι η τοξικότητα των κυανοβακτηρίων ήταν ήδη γνωστή στους ιθαγενείς της Βόρειας Αμερικής, της Αφρικής και της Αυστραλίας (Hayman, 1992). Σε επιστημονικό επίπεδο, τα κυανοβακτήρια ήρθαν στο επίκεντρο του ενδιαφέροντος το 1970, στο πρώτο διεθνές συνέδριο των φωτοσυνθετικών προκαρυωτικών οργανισμών χωρίς όμως να γίνεται ιδιαίτερη αναφορά στην τοξικότητα τους ή στις επικίνδυνες επιδράσεις τους στην ανθρώπινη υγεία (Codd et al., 2005).



Εικόνα 1.1 Α) Χαρακτηριστική εικόνα της άνθησης του κυανοβακτηρίου *Planktothrix* sp. στη Λίμνη Ζηρού, όπου η λίμνη μοιάζει να «ματώνει». Β) Χαρακτηριστική εικόνα κυανοβακτηριακής άνθησης στη Λίμνη Παμβώτιδα, όπου η λίμνη χρωματίζεται κυανοπράσινη (από Vareli et al., 2009; Ντάκης Αλέξανδρος)

Figure 1.1 A) Presence of *Planktothrix* sp. in Lake Zirou. The lake seems to “bleed”. B) Cyanobacterial bloom in Lake Pamvotis. The colour of the lake is blue-green (from Vareli et al., 2009; Ntakis Alexandros)

Από πολλές μελέτες αποδείχθηκε ότι αυτοί οι οργανισμοί μοιάζουν περισσότερο με τους προκαρυωτικούς οργανισμούς, παρά με τους ευκαρυωτικούς και γι’ αυτό το λόγο ονομάστηκαν κυανοβακτήρια και κατατάσσονται στο Βασίλειο των Βακτηρίων (Van Den Hoek et al., 1995; Castenholz, 2001). Η ταξινόμηση των κυανοβακτηρίων παραμένει σύνθετη. Τα κυανοβακτήρια ταξινομούνται σύμφωνα με δύο ταξινομικά συστήματα: Το «Βοτανικό σύστημα ταξινόμησης» (Komárek & Anagnostidis, 1989; 1999; 2005; Anagnostidis & Komárek, 1991) και το «Βακτηριολογικό σύστημα ταξινόμησης» (Castenholz, 2001) (Πίνακας 1.1). Το φύλο των κυανοβακτηρίων περιλαμβάνει περίπου 150 γένη και 2000 είδη (Carmichael, 2001). Από τα παραπάνω γένη περίπου τα 40 είναι τοξικά, σημαντικότερα των οποίων είναι τα γένη: *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Cylindrospermopsis*, *Lyngbya*, *Microcystis*, *Nostoc*, *Oscillatoria* και *Planktothrix* (Carmichael, 2001) (Εικόνα 1.2). Η μορφολογία των κυανοβακτηρίων περιλαμβάνει μονοκύτταρες και πολυκύτταρες μορφές που σχηματίζουν αποικίες και νημάτια (Fay & Van Baalen, 1987; Bryant, 1994). Σε αντίθεση με τα ευκαρυωτικά μικροφύκη,

δεν έχουν μεμβρανικά υποκυτταρικά οργανίδια, ούτε διακριτό πυρήνα (Fay & Van Baalen, 1987).

Πίνακας 1.1. Διαφορετικές τάξεις της «Βοτανικής ταξινόμησης» των κυανοβακτηρίων, συσχέτιση τους με τις υποδιαιρέσεις της «Βακτηριολογικής ταξινόμησης» και περιγραφή των κύριων μορφολογικών χαρακτηριστικών των κυανοβακτηρίων (Komárek and Anagnostidis, 1989; 1999; 2005; Castenholz, 2001).

Table 1.1. The different orders of the botanical classification of cyanobacteria and their correspondence to the subsections of the bacterial classification and a short description of main morphological features and the occurrence in the environment (Komárek and Anagnostidis, 1989; 1999; 2005; Castenholz, 2001).

Βοτανική Ταξινόμηση	Βακτηριολογική Ταξινόμηση	Κύρια μορφολογικά χαρακτηριστικά, παρουσία στο περιβάλλον και τυπικά είδη
Τάξη: Chroococcales	Υποδιάρση I	Μονοκύτταρα κυανοβακτήρια, αναπαράγονται με δυαδική σχάση, δημιουργούν αποικίες και έχουν αεροτόπια, ζουν στα εσωτερικά και θαλάσσια ύδατα, τυπικά γένη είναι: <i>Microcystis, Synechocystis</i>
	Υποδιάρση II	Αναπαράγονται με μικρά, σφαιρικά κύτταρα, τα οποία προέρχονται από πολλαπλές διαιρέσεις των μητρικών κυττάρων, αναπτύσσονται στα υδάτινα περιβάλλοντα, τυπικό γένος: <i>Pleurocapsa</i>
Τάξη: Oscillatoriales	Υποδιάρση III	Νηματοειδή κυανοβακτήρια, χωρίς ειδικά κύτταρα, το τρίχωμα έχει θήκη και πολλά είδη έχουν αεροτόπια, ζουν στα εσωτερικά και θαλάσσια ύδατα, τυπικά γένη: <i>Oscillatoria, Planktothrix, Spirulina</i>
Τάξη: Nostocales	Υποδιάρση IV	Νηματοειδή κυανοβακτήρια με ειδικά κύτταρα (ετεροκύττα και ακινέτια), δημιουργούν ορμολόγια και έχουν αεροτόπια, ζουν σε εσωτερικά και θαλάσσια ύδατα αλλά και στη χέρσο, τυπικά γένη: <i>Anabaena, Aphanizomenon, Nodularia</i>
Τάξη: Stigonematales	Υποδιάρση V	Νηματοειδή κυανοβακτήρια με ειδικά κύτταρα (ετεροκύττα και ακινέτια), δημιουργούν ορμολόγια, ζουν σε εσωτερικά και θαλάσσια ύδατα αλλά και στη χέρσο, αλλά όχι ως πλαγκτόν, τυπικό γένος: <i>Fischerella</i>



Εικόνα 1.2. Γένη τοξικών κυανοβακτηριίων: A) *Anabaena*, B) *Aphanizomenon*, Γ) *Cylindrospermopsis*, Δ) *Lyngbya*, E) *Microcystis*, Z) *Nostoc*, H) *Oscillatoria*, Θ) *Planktothrix* (από <http://www-cyanosite.bio.purdue.edu/images/images.html>)

Figure 1.2. Toxic genera of Cyanobacteria: A) *Anabaena*, B) *Aphanizomenon*, Γ) *Cylindrospermopsis*, Δ) *Lyngbya*, E) *Microcystis*, Z) *Nostoc*, H) *Oscillatoria*, Θ) *Planktothrix* (from <http://www-cyanosite.bio.purdue.edu/images/images.html>)

Τα κυανοβακτήρια αποτελούν φυσικό κομμάτι του γήινου οικοσυστήματος, εδώ και 3 δισεκατομμύρια χρόνια (Golubic et al., 1995). Αποτελούν τους πρώτους οργανισμούς που εκμεταλλεύτηκαν την ηλιακή ενέργεια μέσω της φωτοσύνθεσης και η παρουσία τους ήταν καθοριστική για τον εμπλουτισμό της ατμόσφαιρας με οξυγόνο (Schopf, 1993). Εξαιτίας της ικανότητάς τους για αερόβια και αναερόβια φωτοσύνθεση, μπορούν να αναπτυχθούν σε πολλά διαφορετικά περιβάλλοντα, υδάτινα και χερσαία και πολλές φορές κάτω από ακραίες συνθήκες (Pearl, 1996). Εσωτερικά ύδατα με ποικίλα τροφικά επίπεδα αποτελούν τα συνηθέστερα ενδιαίτηματα των κυανοβακτηριίων (Huisman et al., 2005). Πολλά είδη κατοικούν και σε επιφανειακά επιλίμνια αλλά και σε βαθιά υπολίμνια

ευτροφικά νερά (Whitton, 1973). Εκεί έχουν μια ταχύτατη ανάπτυξη, λόγω της μεγάλης εισροής θρεπτικών ενώσεων φωσφόρου και αζώτου (Wiegand & Pflugmacher, 2005).

Η μαζική παρουσία των τοξικών κυανοβακτηρίων σε εσωτερικά ύδατα πολλών χωρών είναι πλέον αντικείμενο ανησυχίας πολλών επιστημόνων (Dietrich & Hoeger, 2005; Hitzfeld et al., 2000). Πολλές χώρες πραγματοποιούν προγράμματα παρακολούθησης της αφθονίας των κυανοβακτηρίων, αλλά και της συγκέντρωσης των κυανοτοξινών τους στα υδάτινα οικοσυστήματα. Σκοπός αυτών των προγραμμάτων είναι η διασφάλιση της ποιότητας των υδάτων, η προάσπιση της σωστής λειτουργίας των υδάτινων οικοσυστημάτων, αλλά και η μείωση των κινδύνων που σχετίζονται με τη δημόσια υγεία (Graham et al., 2004).

1.1.2 Άνθηση κυανοβακτηρίων-Ευτροφισμός

Η παρουσία των κυανοβακτηρίων στα υδάτινα οικοσυστήματα είναι συνυφασμένη με τον ευτροφισμό των παραπάνω οικοσυστημάτων, καθώς αυτοί οι οργανισμοί αποτελούν την πιο γνωστή ταξινομική ομάδα που αναπτύσσεται κάτω από ευτροφικές συνθήκες (Codd, 2000). Στη σύγχρονη κοινωνία, οι ανθρωπογενείς επιδράσεις όπως η μη σωστή διαχείριση των οικιακών και βιομηχανικών αποβλήτων και οι αυξανόμενες γεωργικές δραστηριότητες (λιπάσματα και φυτοφάρμακα) οδηγούν στην απότομη αύξηση της αφθονίας των κυανοβακτηρίων των εσωτερικών υδάτων, η οποία ονομάζεται και άνθηση των κυανοβακτηρίων (cyanobacterial bloom or water bloom) (Whitton & Potts, 2000). Η άνθηση των κυανοβακτηρίων στα εσωτερικά ύδατα θεωρείται η τελική φάση του ευτροφισμού (Dokulil & Teubner, 2000).

Ο ευτροφισμός των λιμνών και κατά συνέπεια η άνθηση των κυανοβακτηρίων είναι υπεύθυνες για μια σειρά δυσάρεστων γεγονότων που διαταράσσουν την ισορροπία των λιμναιών οικοσυστημάτων (Wetzel, 2001). Τα πιο σημαντικά από αυτά είναι η μείωση της διαφάνειας του νερού, οι ανοξικές συνθήκες κατά τη διάρκεια της νύχτας, οι μεγάλες διακυμάνσεις του pH του νερού (Klapper, 1991) και η παραγωγή τοξικών ενώσεων, των κυανοτοξινών (Codd, 2005).

Στον ελληνικό χώρο φαινόμενα ευτροφισμού άρχισαν να παρατηρούνται τη δεκαετία του '60 και μέχρι σήμερα οι περισσότερες λίμνες της Ελλάδος χαρακτηρίζονται ως εύτροφες, ενώ μόνο οι βαθύτερες λίμνες, όπως η Τριχωνίδα, χαρακτηρίζονται ως ολιγομεσότροφες (Zacharias et al., 2002). Οι εύτροφες λίμνες της Ελλάδος, χαρακτηρίζονται από τη μαζική παρουσία των κυανοβακτηρίων και τις υψηλές συγκεντρώσεις των μικροκυστινών (Gkelis et al., 2005). Επομένως, γίνεται φανερή η σημασία της παρακολούθησης των ελληνικών υδάτινων συστημάτων που χαρακτηρίζονται από ευτροφικές συνθήκες και από την παρουσία των κυανοβακτηρίων.

1.1.3 Χωρική και χρονική κατανομή των κυανοβακτηρίων

Η γνώση της κατανομής των κυανοβακτηρίων στους διάφορους τύπους λιμνών είναι σημαντική προκειμένου να πραγματοποιηθεί η σωστή παρακολούθηση της παρουσίας όπως και των συνεπειών τους. Η χωρική και χρονική κατανομή των κυανοβακτηρίων είναι ευρεία και εξαρτάται από τα χαρακτηριστικά των λιμνών, όπως ο βαθμός διαστρωμάτωσης, η θολερότητα και η επάρκεια των θρεπτικών συστατικών (Tsujimura et al., 2000; Ishikawa et al., 2002). Επιπλέον, σημαντικό ρόλο στην ευρεία εξάπλωσή τους έχουν σημαντικά φυσιολογικά και μορφολογικά χαρακτηριστικά των κυανοβακτηρίων, όπως η ύπαρξη αεροτοπιών για τη μεταβολή της πλευστότητάς τους καθώς και η παρουσία των ετεροκυτίων, στα κυανοβακτήρια που μπορούν να δεσμεύουν ατμοσφαιρικό άζωτο (Blomqvist, 1994).

Στις βαθιές, μονομικτικές, εύκρατες λίμνες, το έντονο εποχιακό κλιματικό πρότυπο έχει ως συνέπεια τη διαδοχή των φυτοπλαγκτικών ειδών από τα διάτομα που κυριαρχούν στις αρχές της άνοιξης μέχρι τα κυανοβακτήρια που κυριαρχούν το καλοκαίρι και το φθινόπωρο (Abbott et al., 1982; Walsby & Schanz 2002). Με την έναρξη της θερμικής διαστρωμάτωσης, γίνεται έντονη η παρουσία των ευκαρυωτικών φυκών, ενώ το καλοκαίρι, καθώς εξελίσσεται η θερμική διαστρωμάτωση, κυριαρχούν τα κυανοβακτήρια (Walsby & Schanz, 2002). Οι δύο κυριότεροι περιβαλλοντικοί παράγοντες που συνεισφέρουν σε αυτή τη

διαδοχή, είναι η σταθερότητα της διαστρωμάτωσης και η βαθμιαία μείωση της διαθεσιμότητας των θρεπτικών συστατικών (Reynolds, 1984). Καθώς ο βαθμός της διαστρωμάτωσης αυξάνεται τους καλοκαιρινούς μήνες, οπότε και η ένταση της ανάμιξης των νερών είναι ανεπαρκής, το ογκωδέστερο φυτοπλαγκτόν, όπως τα διάτομα δεν μπορεί να επιβιώσει (Wetzel, 2001). Ο διαχωρισμός της στήλης του νερού στο επιλίμνιο, όπου η ένταση του φωτός είναι αρκετή για να στηρίξει την ανάπτυξη του φυτοπλαγκτού, και στο σκοτεινό υπολίμνιο, οδηγεί στη μείωση των θρεπτικών συστατικών στο επιφανειακό τμήμα του νερού (Wetzel, 2001). Κάτω από αυτές τις συνθήκες, τα κυανοβακτήρια είναι από τους λίγους φυτοπλαγκτονικούς οργανισμούς που μπορούν να αναπτυχθούν και να κυριαρχήσουν στα επιφανειακά στρώματα κατά τη διάρκεια των θερμών μηνών (Watanabe et al., 1996).

Στις ρηχές, εύτροφες λίμνες, με καλό βαθμό ανάμειξης, που βρίσκονται στο εύκρατο βόρειο ημισφαίριο, τα κυανοβακτήρια που επικρατούν τους καλοκαιρινούς μήνες ανήκουν κυρίως στα γένη *Limnothrix* και *Planktothrix* (Teubner, 1996). Γενικά, στις εύτροφες λίμνες επικρατούν κυανοβακτηριακά είδη που διαθέτουν αέρια κυστιδία (Dokulil & Teubner, 2000). Αυτές οι λίμνες χαρακτηρίζονται από μεγάλο βαθμό θολερότητας και όταν ο χειμώνας δεν είναι πολύ ψυχρός, τα κυανοβακτήρια μπορούν να επικρατούν ακόμη και όλη τη διάρκεια του χρόνου (Scheffer et al., 1997).

Στις ολιγότροφες, εύκρατες λίμνες όπου το φως διαπερνά το επιλίμνιο, κυανοβακτηριακά είδη όπως το *Aphanizomenon flos-aquae* και το *Oscillatoria agardhii* μπορούν να αναπτύξουν μεταλιμνιτικούς πληθυσμούς μεμονωμένων νηματιδίων (Koopka, 1982). Όταν οι συνθήκες στο επιλίμνιο δεν είναι ευνοϊκές, τότε τα παραπάνω κυανοβακτήρια αθροίζονται και μετακινούνται στην επιφάνεια (Walsby et al., 1983).

Στις λίμνες των τροπικών ζωνών τα κυανοβακτήρια επικρατούν όλη τη διάρκεια του έτους, καθώς η ηλιακή ενέργεια και η θερμοκρασία του αέρα είναι σταθερές (Gras et al., 1971).

1.2 ΚΥΑΝΟΤΟΞΙΝΕΣ

Η ευρεία εξάπλωση των κυανοβακτηρίων σε πολλά διαφορετικά περιβάλλοντα όπως αναφέρθηκε παραπάνω, σχετίζεται επίσης με την ικανότητα τους να παράγουν τοξίνες, τις κυανοτοξίνες (Codd et al., 1989,1999; Namikoshi & Rinehart, 1996; Carmichael, 2001). Οι κυανοτοξίνες είναι μια ομάδα φυσικών τοξινών που εμφανίζει μεγάλη ποικιλομορφία ως προς τη χημική δομή και ως προς την τοξικολογική τους δράση (Duy et al., 2000; Sivonen & Jones, 1999). Οι κυανοβακτηριακές τοξίνες είναι επικίνδυνες για τα ζώα και τον άνθρωπο, καθώς μπορούν να προκαλέσουν ασθένειες ακόμη και θνησιμότητα σε συγκεντρώσεις που απαντώνται στο φυσικό περιβάλλον (Falconer, 1996; Kuiper-Goodman et al., 1999; Codd et al., 2000).

Οι κυανοτοξίνες κατατάσσονται σε τρεις κατηγορίες με βάση τη χημική τους δομή: 1) τα κυκλικά πεπτίδια (συμπεριλαμβανομένων των ηπατοτοξικών μικροκυστινών και νοντουλαρινών), 2) τα αλκαλοειδή (όπως η ηπατοτοξίνη κυλινδροσπερμοψίνη, οι νευροτοξίνες: ανατοξίνη-α, ανατοξίνη-α (S) και οι σαξιτοξίνες (STX) και 3) οι λιποπολυσακχαρίτες (LPSs) τα οποία είναι εν δυνάμει ερεθιστικά και μπορούν να επηρεάσουν οποιοδήποτε εκτεθειμένο ιστό (Carmichael, 2001; Chorus & Bartram, 1999).

Τα γενικά χαρακτηριστικά των κυανοτοξινών συνοψίζονται στον Πίνακα 1.2.

Πίνακας 1.2. Ομάδες κυανοβακτηριακών τοξινών
Table 1.2. Groups of cyanotoxins

Τοξίνη	Αριθμός δομικών εκδόχων	Τοξικά γένη	Βιβλιογραφία
Ηπατοτοξίνες			
Μικροκυστίνες	>90	<i>Microcystis, Anabaena, Nostoc, Anabaenopsis, Planktothrix, Oscillatoria, Hapalosiphon</i>	Welker et al., 2004
Νοντουλαρίνες	9	<i>Nodularia, Theonella</i>	Codd et al., 2000
Κυλινδροσπερμοψίνες	3	<i>Cylindrospermopsis, Aphanizomenon, Umezakia, Anabaena, Raphidiopsis</i>	Schembri et al., 2001; Li et al., 2001
Νευροτοξίνες			
Ανατοξίνη-α	5	<i>Anabaena, Oscillatoria, Phormidium, Aphanizomenon, Raphidiopsis</i>	Molica et al., 2002; Namikoshi et al., 2003
Ανατοξίνη-α (s)	1	<i>Anabaena</i>	Molica et al., 2002; Namikoshi et al., 2003
Σαξίτοξίνες	20	<i>Aphanizomenon, Anabaena, Lyngbya, Cylindrospermopsis, Planktothrix</i>	Molica et al., 2002; Namikoshi et al., 2003
Δερματοτοξίνες και κυτοτοξίνες			
Λυγκμπιατοξίνη-α	1	<i>Lyngbya, Schizothrix, Oscillatoria</i>	Codd et al., 2000
Απλυσιατοξίνες	2	<i>Lyngbya, Schizothrix, Oscillatoria</i>	Codd et al., 2000
Λιποπολυσακχαρίτες	Μεγάλος	<i>Aphanizomenon, Anabaena, Lyngbya, Cylindrospermopsis, Planktothrix, Microcystis, Nostoc, Anabaenopsis, Planktothrix, Oscillatoria, Hapalosiphon, Nodularia</i>	Codd et al., 2000

1.2.1 Ηπατοτοξικά κυκλικά πεπτιδία

Μεγάλο ποσοστό των κυανοβακτηρίων των εσωτερικών υδάτων περιλαμβάνει είδη, τα οποία παράγουν ηπατοτοξίνες όπως οι μικροκυστίνες και οι νοντουλαρίνες (Rinehart et al., 1994; Carmichael, 1997). Οι μικροκυστίνες είναι επταπεπτιδία που πήραν το όνομα τους από το κυανοβακτηριακό γένος *Microcystis* από το οποίο και απομονώθηκαν για πρώτη φορά (Carmichael, 1997). Οι νοντουλαρίνες είναι πενταπεπτιδία που πήραν το όνομά τους από το γένος *Nodularia* (Carmichael, 1997).

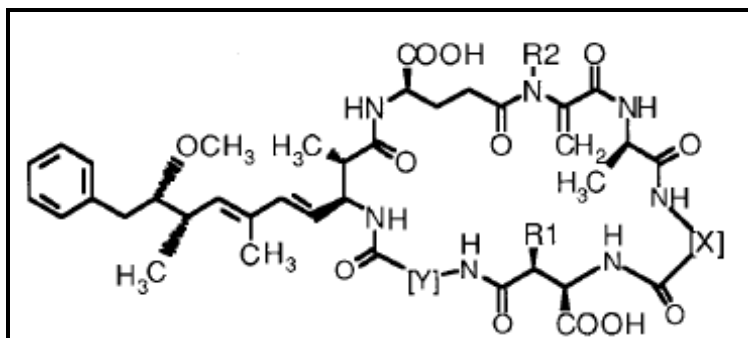
Οι μικροκυστίνες είναι μια ομάδα ηπατοτοξινών με μεγάλη δομική ποικιλία (Chorus, 2001). Όλα τα μέλη αυτής της ομάδας μοιράζονται μια βασική δομή: cyclo(D-Ala-X-D-β-MeisoAsp-Y-Adda-D-iso-Glu-Mdha), όπου τα X και Y εκπροσωπούν διαφορετικά L-αμινοξέα, το D-β-MeisoAsp εκπροσωπεί το D-erythro-β-methyl-isoaspartic acid, το μόριο Adda εκπροσωπεί το (2S,3S,8S,9S)-3-amino-9-methoxy-2,6,8-trimethyl-10-phenyldeca-4E,6E-dienoic acid και το μόριο Mdha εκπροσωπεί το N-methyldehydroalanine (Botes et al., 1985) (Εικόνα 1.3). Το μόριο Adda υπάρχει και στις νοντουλαρίνες και είναι υπεύθυνο για τη τοξική δράση αυτών των μορίων (Namikoshi et al., 1989). Το πιο τοξικό μέλος από την ομάδα των μικροκυστινών είναι η μικροκυστίνη-LR (MC-LR) η οποία περιέχει στη δομή της τα αμινοξέα L-λευκίνη και L-αργινίνη (Carmichael, 1997). Μέχρι σήμερα, έχουν καταγραφεί περισσότερα από 90 διαφορετικά μέλη της ομάδας των μικροκυστινών που παράγονται από διάφορα είδη κυανοβακτηρίων (Welker et al., 2004).

Οι μικροκυστίνες είναι διαλυτές στο νερό, στη μεθανόλη και την αιθανόλη, και αδιάλυτες στην ακετόνη, τον αιθέρα, το χλωροφόρμιο και το βενζόλιο (Rapala et al., 1997). Παραμένουν σταθερές μέσα σε δεξαμενές νερού για λιγότερο από μία εβδομάδα αλλά σταθεροποιούνται για μεγαλύτερες περιόδους σε φιλτραρισμένο ή απιονισμένο νερό (Böttcher et al., 2001). Δεν μεταβολίζονται στην γαστροοισοφαγική οδό

των θηλαστικών λόγω της παρουσίας των D-αμινοξέων και της κυκλικής τους δομής (Fischer et al., 2005). Επιπλέον, αντιστέκονται σε χημική υδρόλυση ή οξείδωση σε ουδέτερο pH. Μπορούν ακόμη και να αντέξουν πολλές ώρες κάτω από βρασμό, σε υψηλές θερμοκρασίες (408°C) και σε πολύ υψηλό ή πολύ χαμηλό pH (Hitzfeld et al., 2000). Εντούτοις, οι μικροκυστίνες είναι δυνατόν να οξειδωθούν από το όζον και άλλα ισχυρά οξειδωτικά μέσα (Chorus & Bartram, 1999). Παραμένουν σταθερές κάτω από φυσικό φως, ενώ αποσυντίθεται μετά από επίδραση της UV ακτινοβολίας (Hitzfeld et al., 2000). Γενικά, η βιοσύνθεση μικροκυστινών αυξάνει με την ένταση του φωτός ή με την φωτοσυνθετικά ενεργό εκπεμπόμενη ακτινοβολία (Rapala et al., 1997; Rapala & Sivonen, 1998; Kaebernick et al., 2000; Kaebernick & Neilan, 2001; Wiedner et al., 2003). Επίσης το μήκος κύματος του φωτός είναι καθοριστικός παράγοντας (το ερυθρό φως ευνοεί την παραγωγή τοξίνης σε αντίθεση με το κυανούν (Kaebernick et al., 2000). Η θερμοκρασία δείχνει να επηρεάζει τον τύπο της παραγόμενης τοξίνης, οι υψηλές θερμοκρασίες (25°C) ευνοούν την σύνθεση μικροκυστίνης-RR, και οι χαμηλότερες τη σύνθεση της μικροκυστίνης-LR (Rapala et al., 1997; Rapala & Sivonen, 1998). Πρόσφατες προσεγγίσεις, θέτουν τη γενοτυπική διαφορά ανάμεσα στα στελέχη ως τον βασικό παράγοντα που καθορίζει τη διακύμανση της συγκέντρωσης των μικροκυστινών σε ένα υδάτινο οικοσύστημα (Kurmayer et al., 2002).

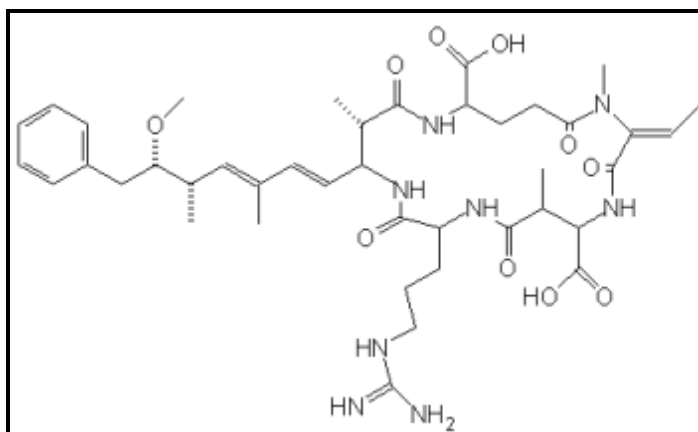
Οι νοντουλαρίνες είναι μια μικρότερη ομάδα πενταπεπτιδίων με παρόμοια δομή με τις μικροκυστίνες. Η δομή της νοντουλαρίνης αποτελείται από το cyclo- (D-β-Me-iso-Asp-L-Arg-Adda-D-iso-Glu-Mdhb-N-methyldehydroaminobutyric acid (Εικόνα 1.4) (Rinehart et al., 1988). Σε αντίθεση με τον μεγάλο αριθμό των μικροκυστινών, μόνο μερικά έκδοχα των νοντουλαρινών έχουν βρεθεί (Rinehart et al., 1988). Τα έκδοχα των νοντουλαρινών απομονώθηκαν για πρώτη φορά από το θαλάσσιο είδος *Nodularia spumigena*, το οποίο ήταν το πρώτο είδος στη βιβλιογραφία στο οποίο διαπιστώθηκαν οι τοξικές του ιδιότητες στα ζώα (Francis, 1878).

Ο ρόλος των μικροκυστινών υπήρξε αντικείμενο μελέτης αρκετών ερευνητών, χωρίς όμως αποτέλεσμα, αφού παραμένει ακόμα άγνωστος (Kaebernick & Neilan, 2001). Μια πρόσφατη φυλογενετική ανάλυση των γονιδίων που κωδικοποιούν τη συνθετάση των μικροκυστινών, έδειξε ότι η ικανότητα παραγωγής μικροκυστινών προϋπήρχε της μεταζωϊκής περιόδου με αποτέλεσμα να είναι πιθανό οι μικροκυστίνες να απέκτησαν πολύ αργότερα αμυντικό ρόλο έναντι των θηρευτών των κυανοβακτηρίων (Rantala et al., 2004). Επιπλέον, οι μικροκυστίνες ως μη-ριβοσωμικά πεπτιδία πιθανόν να συμμετέχουν στην ενδοκυτταρική επικοινωνία και στην προσαρμογή των κυανοβακτηρίων στις περιβαλλοντικές συνθήκες (Schatz et al., 2007). Ο ρόλος των μικροκυστινών στις αλληλοπαθητικές αλληλεπιδράσεις δεν είναι γνωστός, αλλά φαίνεται ότι αυτές οι τοξίνες σχετίζονται με τη μείωση της φωτοσυνθετικής ικανότητας και του ρυθμού αύξησης άλλων αυτότροφων πλαγκτονικών οργανισμών, αλλά και των μακροφύτων (Pflugmacher, 2002; Gross, 2003; Legrand et al., 2003). Οι μικροκυστίνες είναι πιθανόν να έχουν οικοφυσιολογικές λειτουργίες και να συμμετέχουν στο βασικό μεταβολισμό των κυανοβακτηρίων (Haande, 2008). Πιθανοί ρόλοι των μικροκυστινών θεωρούνται επίσης η σηματοδότηση, ο έλεγχος των γονιδίων (Dittmann et al., 2001; Rantala et al., 2004), η συμμετοχή στην αφομοίωση της ηλιακής ακτινοβολίας (Hesse et al., 2001), η συμμετοχή στην αποθήκευση αζώτου σε περιόδους ανεπάρκειας αζώτου (Kotak et al., 2000) και η συμμετοχή στην δημιουργία αποικιών (Kehr et al., 2006).



Εικόνα 1.3 Γενική δομή μικροκυστινών, όπου τα X και Y εκπροσωπούν διαφορετικά αμινοξέα ανάλογα με το έκδοχο της μικροκυστίνης, τα R1, R2 μπορεί να είναι H ή CH₃ (από Luckas et al.,2005).

Figure 1.3. General structure of microcystins. X and Y are variable L-amino acids. R1 and R2 may be H or CH₃(from Luckas et al.,2005) .



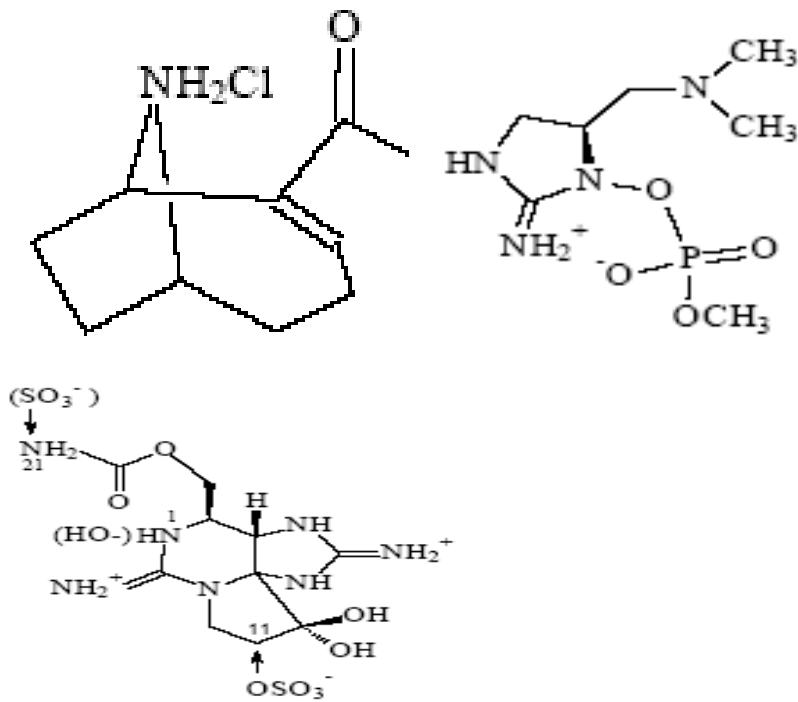
Εικόνα 1.4. Γενική δομή των νοντουλαρινών(από Luckas et al.,2005).

Figure 1.4. General structure of nodularins(from Luckas et al.,2005).

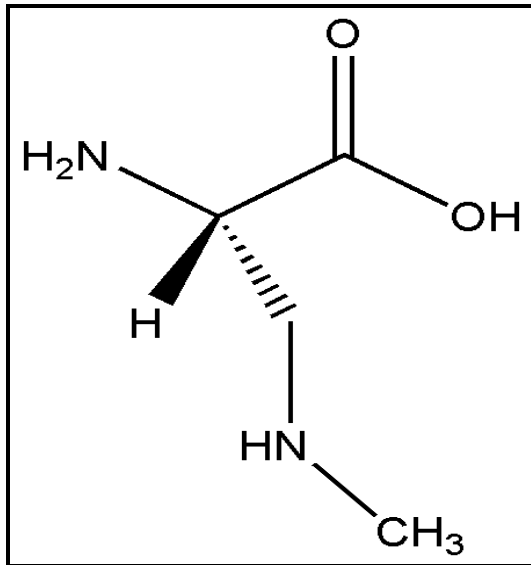
1.2.2 Νευροτοξικές αλκαλοειδείς ενώσεις

Αθροίσεις νευροτοξικών κυανοβακτηρίων έχουν εμφανιστεί στη Βόρεια Αμερική, την Ευρώπη και την Αυστραλία και έχουν προκαλέσει δηλητηριάσεις ζώων (Wiegand & Pflugmacher 2005). Τρεις ομάδες κυανοβακτηριακών νευροτοξινών είναι γνωστές: 1)Ανατοξίνη-α και Ομοανατοξίνη-α, 2) Ανατοξίνη-α (S), 3) Σαξιτοξίνες (Edwards et al., 1992)(Εικόνα 1.5). Πρόσφατα, μεγάλο ενδιαφέρον παρουσιάζει ακόμη

μια ομάδα νευροτοξινών που παράγεται από τα κυανοβακτήρια: η β-μεθυλ-άμινο-αλανίνη (Εικόνα 1.6). Η παραπάνω τοξίνη έχει προσδιοριστεί σε αρκετά εσωτερικά ύδατα ανά τον κόσμο και θεωρείται ότι σχετίζεται με τη νόσο του Αλοχάιμερ (Cox et al., 2005; Murch et al., 2004; Metcalf et al., 2008).



Εικόνα 1.5. Χημική δομή των κυανοβακτηριακών νευροτοξινών Ανατοξίνη-α, Σαξιτοξίνη και Ανατοξίνη-α (S) (από Briand et al., 2003).
Figure 1.5. General structure of Anatoxin-a , Saxitoxins and Anatoxin-a(S) (from Briand et al., 2003).



Εικόνα 1.6. Χημική δομή της νευροτοξίνης β-μεθυλ-άμινο-αλανίνη (από commons.wikimedia.org/wiki/File:Bmaa.png).

Figure 1.6. General structure of β-Methylamino-L-alanine (BMAA) (from commons.wikimedia.org/wiki/File:Bmaa.png).

Η Ανατοξίνη-α έχει βρεθεί στα είδη των γενών *Anabaena*, *Oscillatoria*, *Phormidium*, *Aphanizomenon*, *Raphidiopsis* ενώ η homoanatoxin-a στο γένος *Oscillatoria* (Sivonen et al., 1989). Η Ανατοξίνη-α (S) στο γένος *Anabaena* και οι Σαξιτοξίνες στα γένη *Aphanizomenon*, *Anabaena*, *Lyngbya*, *Cylindrospermopsis*, *Planktothrix* (Carmichael, 1997). Η Ανατοξίνη-α είναι μοναδική στα κυανοβακτήρια και μιμείται τον νευρικό διαμεσολαβητή ακετυλοχολίνη (Carmichael, 1994), προσδένεται στη νιασίνη και στους μυϊκούς υποδοχείς (Gorham & Carmichael, 1988), προκαλώντας συμπτώματα όπως μειωμένο μυϊκό συντονισμό, συσπάσεις και τελικά θάνατο από κατάρρευση του αναπνευστικού συστήματος (Holte et al., 1998).

Η Ανατοξίνη-α (S) είναι επίσης μοναδική στα κυανοβακτήρια και προκαλεί συμπτώματα παραπλήσια με αυτά της Ανατοξίνης-α με επιπλέον το σύμπτωμα της έκκρισης υδαρούς σάλιου (Carmichael, 1989). Η Ανατοξίνη-α(S) είναι μια φυσική οργανοφωσφορική ένωση που παρεμποδίζει τη δράση των

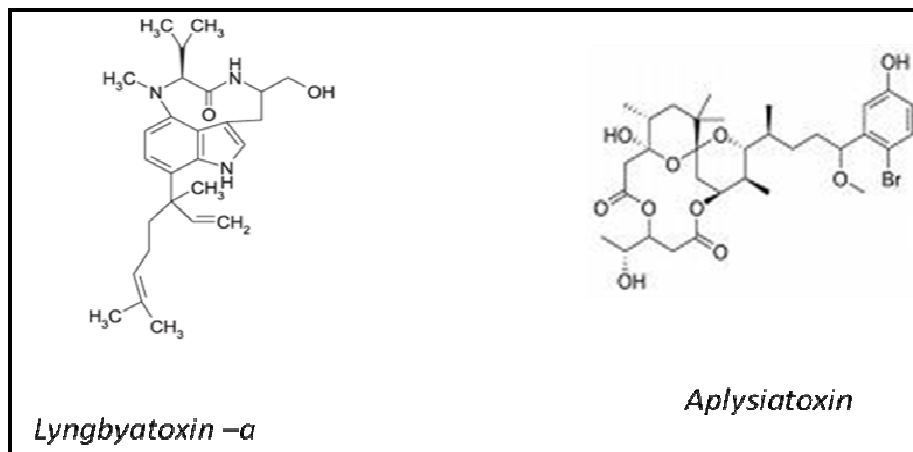
ακετυλοχολυνεστερασών προκαλώντας υπερδιέργεση των μυϊκών κυττάρων από την ακετυλοχολίνη (Mahmood & Carmichael, 1987).

Οι Σαξιτοξίνες παράγονται από τα κυανοβακτήρια (Carmichael et al., 1990) αλλά και από τα δινομαστιγωτά (Schantz, 1986). Εμποδίζουν τα κανάλια διέλευσης του νατρίου με αποτέλεσμα να χάνεται η επικοινωνία μεταξύ των νευρώνων και να επέρχεται θάνατος από κατάρρευση του αναπνευστικού συστήματος (Carmichael et al., 1979).

1.2.3 Κυτοτοξικές αλκαλοειδείς ενώσεις

Οι κυριότερες αλκαλοειδείς κυτοτοξίνες είναι η Λυγκμπιατοξίνη-α και η Απλυσιατοξίνη (Εικόνα 1.7). Η Λυγκμπιατοξίνη-α παράγεται από τα κυανοβακτηριακά γένη *Lyngbya*, *Schizothrix*, *Oscillatoria* (Moore, 1996). Αυτή η τοξίνη δρα ως επαγωγέας όγκων και ενεργοποιητής της κινάσης-C (Basu et al., 1992). Η κατανάλωση από τον άνθρωπο, επιβαρυσμένων ιχθύων μπορεί να οδηγήσει ακόμη και στο θάνατο (Huisman et al., 2005).

Η τοξίνη Απλυσιατοξίνη παράγεται από τα κυανοβακτηριακά γένη *Lyngbya*, *Schizothrix*, *Oscillatoria* και προκαλεί φλεγμονές στο δέρμα (Kato & Scheuer, 1974). Είναι επαγωγέας όγκων, διεγείρει την παραγωγή του αραχνοειδούς οξέος, επηρεάζει την παραγωγή των προσταγλαδινών, προκαλεί τη συσσωμάτωση των ανθρώπινων λεμφοβλαστικών κυττάρων και παρεμποδίζει την μελανογένεση στα B16 κύτταρα (Fischer et al., 1982; Hoshino et al., 1980; Sakamoto et al., 1981).

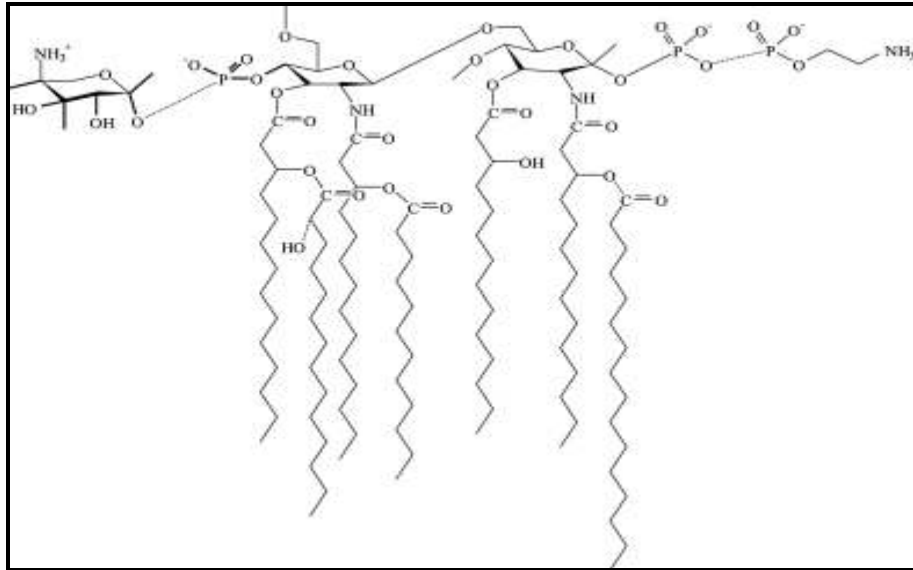


Εικόνα 1.7. Χημική δομή των κυανοβακτηριακών κυτοτοξινών Λυγκμπιατοξίνη-α και Απλυσιατοξίνη (από Briand et al., 2003)

Figure 1.7. General structure of *Lyngbyatoxin -a* and *Aplysiatoxin* (from Briand et al., 2003)

1.2.4 Ερεθιστικές ενδοτοξίνες

Οι λιποπολυσακχαρίτες (Εικόνα 1.8) απομονώθηκαν για πρώτη φορά από τα κυανοβακτήρια *Anacystis nidulans* και *Anabaena variabilis* και είναι ενώσεις που συνεισφέρουν στη δομική ακεραιότητα των κυανοβακτηρίων (Huisman et al., 2005). Αυτές οι ενδοτοξίνες είναι υπεύθυνες για πολλές παθοφυσιολογικές αντιδράσεις στους ανθρώπους και στα ζώα όπως πυρετός, θρομβοκυτοπενία, υπόταση, διασπειρώμενη ενδοαγγειακή πήξη, μη φυσιολογικά ποσοστά γλυκόζης, αναπνευστική οξείδωση και μεταβολική αλκαλίωση (Codd et al., 1989; de Figueiredo et al., 2004). Τα αποτελέσματα πολλών ερευνών έχουν δείξει ότι οι κύριοι-στόχοι κύτταρα των λιποπολυσακχαριτών είναι τα μακροφάγα (Mathison & Ulevitch, 1979).



Εικόνα 1.8. Δομή του λιπιδίου-α, το οποίο αποτελεί το τοξικό συστατικό των λιποπολυσακχαριδίων που παράγονται από τα κυανοβακτήρια (από Briand et al., 2003)

Figure 1.8. Structure of lipid- a, the toxic component of lipopolysaccharides, which are produced by cyanobacteria (from Briand et al., 2003)

1.3 ΤΟΞΙΚΗ ΔΡΑΣΗ ΜΙΚΡΟΚΥΣΤΙΝΩΝ

Οι μικροκυστίνες είναι υπεύθυνες για μια σειρά περιστατικών οξείας και χρόνιας τοξικότητας σε διάφορα ζώα αλλά και στον ανθρώπινο πληθυσμό (W.H.O., 1998; Duy et al., 2000; Dietrich & Hoeger, 2005). Η τιμή LD₅₀ αποτελεί ένα μέσο μελέτης της τοξικής δράσης πολλών ενώσεων και αναφέρεται στη συγκέντρωση μιας ουσίας που είναι ικανή να προκαλέσει το θάνατο του μισού αριθμού των ατόμων από τον συνολικό αριθμό πειραματόζων στους οποίους χορηγήθηκε (Hayes, 2001). Η τιμή LD₅₀ για το σύνολο των μικροκυστινών κυμαίνεται από 50-1000 μg/kg βάρος σώματος, μετά από ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση (W.H.O.,1998). Ειδικότερα για την μικροκυστίνη-LR η τιμή LD₅₀ κυμαίνεται μεταξύ των τιμών 36-122 μg/kg βάρους σώματος μετά από ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση και μεταξύ των τιμών 43-200 μg/kg βάρους σώματος μετά από εισπνοή της παραπάνω τοξίνης (Dawson,1998).

Όργανο-στόχος των μικροκυστινών είναι το ήπαρ (MacKintosh et al., 1990). Οι μικροκυστίνες μεταφέρονται στα ηπατικά κύτταρα μέσω

μεμβρανικών ενεργοεξαρτώμενων μεταφορέων, όπως οι μεταφορείς του χολικού οξέος (Runnegar et al., 1995). Ο κύριος μηχανισμός τοξικότητας των μικροκυστινών είναι η μη αναστρέψιμη αναστολή των πρωτεϊνικών φωσφατάσων 1 και 2A (Yoshizawa et al., 1990; Honkanen et al., 1990; Mackintosh et al., 1990). Οι πρωτεϊνικές φωσφατάσες 1 και 2A είναι ένζυμα κλειδιά για την αποφωσφορυλίωση της σερίνης/θρεονίνης πολλών φωσφοπρωτεϊνών (Cohen, 1989). Η αναστολή των πρωτεϊνικών φωσφατάσων ακολουθείται από την απώλεια της κυτοσκελετικής ακεραιότητας με συνέπεια τη λύση ή την απόπτωση, των ηπατικών κυττάρων (Runnegar et al., 1991; Romanowska-Duda et al., 2002; Dietrich & Hoeger, 2005).

Τα αρχικά συμπτώματα των τοξικών σεωσεων που προκαλούν οι μικροκυστίνες στα θηλαστικά περιλαμβάνουν αδυναμία, ωχρότητα, γαστρεντερίτιδα, ανόρθωση τριχών και ναυτία (Bell & Codd, 1994). Ακολουθεί η διόγκωση του ήπατος από τη συσσώρευση μεγάλων ποσοτήτων αίματος και τελικά η καταστροφή του ήπατος (Runnegar et al., 1991; Romanowska-Duda et al., 2002). Ο θάνατος των θηλαστικών επέρχεται από αιμορραγικό σοκ, σε χρονικό διάστημα λίγων ωρών, μετά τη χορήγηση των μικροκυστινών (Falconer et al., 1981; Bell & Codd, 1994).

Το οξειδωτικό στρες φαίνεται ότι είναι ένας ακόμα σημαντικός βιοχημικός μηχανισμός της τοξικότητας των μικροκυστινών (Ding & Ong, 2003). Οι μικροκυστίνες έχει αποδειχθεί ότι προκαλούν τη δημιουργία ενεργών ριζών οξυγόνου (Li et al., 2003), οι οποίες πιθανώς προκαλούν σημαντική κυτταρική καταστροφή όπως η υπεροξείδωση των λιπιδικών μεμβρανών και η απόπτωση των κυττάρων (Ding & Ong, 2003).

Η γονιδιοτοξικότητα των μικροκυστινών έχει επίσης αποδειχθεί (Zhan et al., 2004). Έχει παρατηρηθεί ότι η μικροκυστίνη-LR μπορεί να παρέμβει στο γενετικό υλικό αυξάνοντας τη συχνότητα των μεταλλάξεων αλλά και το ποσοστό των αργά αναπτυσσόμενων μεταλλάξεων, με αποτέλεσμα να προκαλούνται κυρίαρχες δομικές αλλαγές όπως μεγάλες

εξαλείψεις και ανασυνδυασμοί του γενετικού υλικού (Humpage et al., 2000).

Πιθανή συνέπεια της έκθεσης στις μικροκυστίνες είναι επίσης και η προαγωγή όγκων (Chorus&Bartram, 1999). Η αναστολή των φωσφατασών από τις μικροκυστίνες έχει ως συνέπεια τη διατάραξη της ισορροπίας στη φωσφορυλίωση σημαντικών πρωτεϊνών, όπως των πρωτεϊνών που καταστέλλουν τους όγκους (Sueoka et al., 1997). Αυτή η μεταβατική μετατροπή των παραπάνω πρωτεϊνών προκαλεί υπερβολικό κυτταρικό σήμα, πολλαπλασιασμό των κυττάρων, μετάπλαση των κυττάρων και επαγωγή όγκων (Apeldoorn et al., 2007).

1.4 ΒΙΟΣΥΣΣΩΡΕΥΣΗ ΤΩΝ ΜΙΚΡΟΚΥΣΤΙΝΩΝ

Ως βιοσυσσωρευση ορίζεται η προοδευτική αύξηση του ποσοστού μιας ουσίας σε έναν οργανισμό η οποία προκαλείται όταν ο ρυθμός πρόσληψης της ουσίας ξεπερνά τον ρυθμό αποβολής της από τον οργανισμό (Duffus, 1993). Η βιοσυσσωρευση των μικροκυστινών έχει αποδειχθεί σε μια πληθώρα υδρόβιων και χερσαίων οργανισμών (Chorus, 2001; Carmichael, 2001; Mohamed et al., 2003). Η έκθεση των ζώων στις μικροκυστίνες είναι δυνατόν να πραγματοποιηθεί άμεσα διαμέσου της κατανάλωσης τοξικών κυανοβακτηρίων ή έμμεσα μέσω της κατανάλωσης άλλων οργανισμών επιβαρυσμένων με μικροκυστίνες (Fisher & Dietrich, 2000). Από τους υδρόβιους οργανισμούς, σημαντικά ποσά μικροκυστινών, έχει βρεθεί ότι συσσωρεύονται στο ζωοπλαγκτόν, στα μαλάκια, στα καρκινοειδή και στους ιχθύες. Οι μικροκυστίνες επηρεάζουν και τους ανθρώπους μέσω της χρόνιας κατάποσης επιβαρυσμένου νερού και υδρόβιων οργανισμών, μέσω εισπνοής σταγονιδίων, ή επαφής με τις ρινικές βλεννώδεις μεμβράνες κατά τη διάρκεια των ψυχαγωγικών δραστηριοτήτων (Yu et al., 1995; Ueno et al., 1996; Falconer 1998). Η συσσωρευση μικροκυστινών στους διάφορους οργανισμούς μέσω της τροφικής αλυσίδας, είναι μεγάλης σημασίας και είναι δυνατόν να οδηγήσει σε απώλειες μεγάλου αριθμού οργανισμών διαφόρων ειδών, αλλά και σε οικονομικές απώλειες (Steffensen, 2008).

1.4.1 Συσσώρευση μικροκυστινών στο ζωοπλαγκτόν

Το ζωοπλαγκτόν είναι δυνατόν να συσσωρεύσει μεγάλες συγκεντρώσεις μικροκυστινών διαμέσου της κατανάλωσης τοξικών κυανοβακτηρίων (DeMott & Dhawale, 1995). Το μέγεθος της επίδρασης των μικροκυστινών στο ζωοπλαγκτόν εξαρτάται από τα διαφορετικά είδη, το στάδιο ανάπτυξης του οργανισμού και από τις περιβαλλοντικές συνθήκες όπως η θερμοκρασία και η τροφή (Lampert, 1982; Fulton & Paerl, 1987). Οι συνέπειες της συσσώρευσης των μικροκυστινών στους ζωοπλαγκτονικούς οργανισμούς περιλαμβάνουν τη μείωση της ευρωστίας των οργανισμών (Schriver et al., 1995), τη μείωση της αναπαραγωγικής τους ικανότητας καθώς και του ρυθμού επιβίωσης τους (Reinikainen et al., 1994; Weithoff & Walz, 1995; Thostrup & Christoffersen, 1999). Οι επιδράσεις των μικροκυστινών στο ζωοπλαγκτόν μπορούν να επηρεάσουν τη δομή και τη δυναμική της πλαγκτικής κοινωνίας, αλλά και ανώτερων κοινωνιών (Jarvis et al., 2006). Η μείωση ή οι μεταβολές στις πλαγκτικές κοινωνίες μπορούν να επιφέρουν ανισορροπία στη διαθεσιμότητα της τροφής για τα υψηλότερα επίπεδα της τροφικής αλυσίδας (Kotak et al., 1996; Mayer & Wahl, 1997; Thostrup & Christoffersen, 1999; Thompson et al., 2000). Επιπλέον, το ζωοπλαγκτόν είναι δυνατόν να δράσει ως «διαμεσολαβητής» των μικροκυστινών στα ανώτερα επίπεδα της υδρόβιας τροφικής αλυσίδας (Ibelings et al., 2005).

1.4.2 Συσσώρευση μικροκυστινών στα μαλάκια και στα καρκινοειδή

Η συσσώρευση των μικροκυστινών στα μαλάκια και στα καρκινοειδή προέρχεται κυρίως από την τροφή τους και σε μικρότερο ποσοστό από τη διήθηση του νερού (Zurawell et al., 1999; Zhang et al., 2009). Εντούτοις, πολλά είδη μαλακίων χαρακτηρίζονται από την ικανότητά τους να αποβάλλουν μεγάλα ποσά μικροκυστινών από τον οργανισμό τους μέσω της διαδικασίας της αποτοξίκωσης (Xie et al., 2007). Η συσσώρευση και ο μεταβολισμός των μικροκυστινών διαφέρουν

μεταξύ διαφορετικών ειδών μαλακίων και εξαρτώνται και από περιβαλλοντικούς παράγοντες όπως η θερμοκρασία (Yokoyama & Park, 2003; Xie et al., 2007; Zhang et al., 2009). Η συσσώρευση των μικροκυστινών στα μαλάκια και στα καρκινοειδή είναι βασικό βήμα για τη μεταφορά των παραπάνω τοξινών στην τροφική αλυσίδα, καθώς αυτοί οι οργανισμοί αποτελούν τροφή για πολλούς ιχθύες, ορισμένα είδη αμφιβίων, πουλιών και τον άνθρωπο (Novaczek et al., 1991; Falconer et al., 1992; Prepas et al., 1997; Williams et al., 1997; Amorim & Vasconcelos, 1999; Zhang et al., 2009).

1.4.3.Συσσώρευση μικροκυστινών στους ιχθύες

Η έκθεση των ιχθύων στις τοξίνες, γίνεται κυρίως μέσω δυο οδών: της κατάποσης κυττάρων που περιέχουν μικροκυστίνες ή των επιθηλιακών επιφανειών, οι οποίες έρχονται σε επαφή με νερό επιβαρυμένο με διαλυτές μικροκυστίνες (Rodger et al., 1994; Zimba et al., 2001). Τα νεαρά άτομα ιχθύων φαίνεται ότι είναι περισσότερο ευάλωτα στις μικροκυστίνες, σε σχέση με τα ενήλικα άτομα, εξαιτίας της τοξικής επίδρασης αυτών των τοξινών σε πολύ βασικά αναπτυξιακά στάδια των εμβρύων των ιχθύων (Jacquet et al., 2004; Ghazali et al., 2009).

Οι μικροκυστίνες φαίνεται να δρουν με παρόμοιο τρόπο στα διαφορετικά είδη ιχθύων, αν και υπάρχουν κάποιες μικρές διαφορές μεταξύ των διαφορετικών ειδών σε ότι αφορά την ευαισθησία και τα δευτερεύοντα όργανα στα οποία συσσωρεύονται οι παραπάνω τοξίνες (Phillips et al., 1985; Kopp & Hetesa, 2000). Η ευαισθησία των ιχθύων στις μικροκυστίνες πιθανώς επηρεάζεται από το περιβάλλον στο οποίο ζουν, αλλά και από το είδος της τροφής τους (Malbrouck & Kestemont, 2006). Είδη τα οποία συναντώνται σε ολιγότροφα περιβάλλοντα είναι πιο ευαίσθητα από τα είδη που ζουν σε εύτροφα περιβάλλοντα, στα οποία η έκθεση στις τοξίνες είναι πιο συχνή (Snyder et al., 2002).

Η έκθεση των ιχθύων στις μικροκυστίνες, επάγει την διατάραξη της οσμωρυθμιστικής ισορροπίας (Bury et al., 1995), μειώνει το ρυθμό αύξησης του οργανισμού (Liu et al., 2002), αυξάνει τη δραστηριότητα

των ηπατικών ενζύμων (Palikova et al., 1998), αυξάνει τον καρδιακό ρυθμό (Best et al., 2001), επηρεάζει τη συμπεριφορά του οργανισμού (Baganz et al., 1998) και επιφέρει διάφορες ιστοπαθολογικές αλλοιώσεις στο ήπαρ, τους νεφρούς, την καρδιά, τα βράγχια και τις γονάδες του οργανισμού (Carbis et al., 1996; Fischer & Dietrich, 2000; Fournie & Courtney, 2002).

Η συσσώρευση των μικροκυστινών στους ιχθύες είναι δυνατόν να προκαλέσει μεγάλες οικονομικές απώλειες (Andersen et al., 1993), αλλά και υψηλούς κινδύνους της δημόσιας υγείας μέσω της κατανάλωσης των παραπάνω οργανισμών (W.H.O., 1998).

1.4.4 Συσσώρευση μικροκυστινών στον ανθρώπινο πληθυσμό

Μέχρι σήμερα, έχουν πραγματοποιηθεί μια σειρά από μελέτες σχετικά με τη δράση των μικροκυστινών και την πιθανή έκθεση του ανθρώπου σε αυτές (Pilotto et al., 1997). Παρόλο που οι μικροκυστίνες έχουν χαρακτηριστεί ως ηπατοτοξίνες, πολλά περιστατικά ανθρώπινης έκθεσης, έχουν αποδείξει ότι αυτές μπορούν να δράσουν και ως νευροτοξίνες (Azevedo et al., 2002; Fischer et al., 2005; Jochimsen et al., 1998; Pouria et al., 1998), ακόμα και ως νεφροτοξίνες (Fischer & Dietrich 2000; Milutinovic et al., 2003; Moreno et al., 2005).

Οι μικροκυστίνες επηρεάζουν την ανθρώπινη υγεία μέσω της χρόνιας κατάποσης επιβαρυμένου νερού, εισπνοής σταγονιδίων, ή επαφής με τις ρινικές βλεννώδεις μεμβράνες κατά τη διάρκεια των ψυχαγωγικών δραστηριοτήτων, ή μέσω της δερμικής επαφής (Falconer 1999). Σχετικά με την παρουσία των μικροκυστινών στο πόσιμο νερό, μεγάλη ανησυχία προκύπτει από τη μη ικανοποιητική επεξεργασία καθαρισμού του νερού (Hitzfeld et al., 2000b; Hoeger et al., 2005). Αρκετά περιστατικά τοξίκωσης ανθρώπων μετά από κατανάλωση επιβαρυμένου νερού, έχουν καταγραφεί σε πολλές περιοχές του κόσμου και έχουν αποδοθεί στη μη ικανοποιητική επεξεργασία του νερού (Teixera et al., 1993; Dietrich & Hoeger 2005; Fromme et al., 2000).

Η πιο συχνή έκθεση του ανθρώπινου πληθυσμού στις μικροκυστίνες είναι κατά τη διάρκεια των διαφόρων ψυχαγωγικών

δραστηριοτήτων (Stewart et al., 2006). Αυτού του είδους η έκθεση περιλαμβάνει όχι μόνο την άμεση επαφή των ανθρώπων με το επιβαρυσμένο νερό, αλλά και την εισπνοή σταγονιδίων του επιβαρυσμένου νερού (Duy et al., 2000). Τα συμπτώματα της τοξίκωσης μέσω επαφής ή εισπνοής έχουν την ίδια ένταση και περιλαμβάνουν κυρίως ασθένειες όπως η γαστρεντερίτιδα, η δερματίτιδα και ορισμένες ατυπικές μορφές πνευμονίας (W.H.O.,1998; Chorus & Bartram,1999; Duy et al., 2000; Codd et al., 2005; Falconer, 2006). Μέχρι σήμερα, δεν έχουν καταγραφεί περιστατικά τοξίκωσης του ανθρώπινου πληθυσμού από κατανάλωση υδρόβιων οργανισμών επιβαρυσμένων με τοξίνες (Butler et al., 2009). Εντούτοις η κατανάλωση επιβαρυσμένων υδρόβιων οργανισμών είναι η πιο πιθανή οδός έκθεσης των ανθρώπων, καθώς καθημερινά καταναλώνονται πολλά είδη οργανισμών από εσωτερικά ύδατα που χαρακτηρίζονται από την παρουσία τοξικών κυανοβακτηρίων (Ernst et al., 2005).

Στον Πίνακα 1.3 παρουσιάζεται η ανεκτή ποσότητα των μικροκυστινών (TDI) στην οποία είναι δυνατόν να εκτεθούν διάφορες ηλικιακές ομάδες ανθρώπων, χωρίς να εμφανίσουν συμπτώματα τοξίκωσης.

Πίνακας 1.3. Ποσότητα μικροκυστινών που μπορεί να προσλαμβάνεται καθημερινά (TDI) από διάφορες οδούς, χωρίς να δημιουργούνται βλάβες στην υγεία, σύμφωνα με τους υπολογισμούς του Fromme et al., (2000).

Table 1.3. Calculated possible daily ingestion (TDI) to avoid acute health problems according to the calculations of Fromme et al., (2000).

Οδός λήψης τροφής	Συγκέντρωση μικροκυστινών	Βρέφη 5Kg=12.5 µg	Παιδιά 20Kg=50 µg	Ενήλικες 20Kg=50 µg
Υδροβιοί οργανισμοί	100 µg Kg ⁻¹	125g	500g	1500g
	1000 µg Kg ⁻¹	1.25g	5g	15g
Μάζα κυανοβακτηριών στη λίμνη	100 µg l ⁻¹	125ml	500ml	1500ml
	1000 µg l ⁻¹	12.5ml	50ml	150ml
Πόσιμο νερό	1.0 µg l ⁻¹	12.500ml	50.000ml	150000ml
	100 µg l ⁻¹	125ml	500ml	1500ml

1.4 ΜΙΚΡΟΚΥΣΤΙΝΕΣ ΣΤΑ ΕΣΩΤΕΡΙΚΑ ΥΔΑΤΑ ΤΗΣ ΕΛΛΑΔΟΣ

Παρόλο που η άνθηση των τοξικών κυανοβακτηριών στα εσωτερικά ύδατα πολλών χωρών είχε διαπιστωθεί από τις πρώτες δεκαετίες του περασμένου αιώνα (Stanković, 1931) και συνεχίζει να παρατηρείται (Temponeras et al., 2000; Vardaka et al., 2000; Romero et al., 2002; Cook et al., 2004; Vardaka et al., 2005; Gkelis et al., 2005; Kagalou et al., 2008) η παρουσία κυανοβακτηριακών τοξινών στον ελλαδικό χώρο αναφέρθηκε για πρώτη φορά το 1987 στις λίμνες Βιστωνίδα, Κορώνεια, Βόλβη και Καστοριάς (Lanaras et al., 1989). Τα έτη 1994-1997 πραγματοποιήθηκε η πρώτη συστηματική μελέτη της σύνθεσης ειδών των κυανοβακτηριών σε σχέση με την παρουσία και τη συγκέντρωση της μικροκυστινής-LR στη Λίμνη Καστοριά (Vardaka, 2001). Το 2004 υπήρξε μαζικός θάνατος πουλιών και ιχθύων στη Λίμνη Κορώνεια, πιθανώς ως αποτέλεσμα των κυανοτοξινών, αφού εκείνο το διάστημα το φυτοπλαγκτόν της λίμνης αποτελούνταν αποκλειστικά από κυανοβακτήρια (Moustaka-Gouni et al., 2004). Το 2005, οι Gkelis et al., (2006) μελέτησαν τη συγκέντρωση των μικροκυστινών σε αρκετά

εσωτερικά ύδατα, αποδεικνύοντας την παρουσία των μικροκυστινών στο νερό ελληνικών λιμνών. Πάραυτα, οι μελέτες σχετικά με την παρουσία των μικροκυστινών σε οργανισμούς των ελληνικών λιμνών είναι περιορισμένες (Gkelis et al., 2006; Kagalou et al., 2008; Vareli et al., 2009). Η παρουσία των μικροκυστινών κυρίως σε ιχθύες των ελληνικών λιμνών, κάνει φανερή την επιτακτική ανάγκη για τη μελέτη της συσσώρευσης των μικροκυστινών και σε άλλους εδώδιμους και μη, υδρόβιους οργανισμούς.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Σκοπός της παρούσας διατριβής είναι η μελέτη της παρουσίας των μικροκυστινών σε εσωτερικά υδάτινα οικοσυστήματα της Ελλάδας καθώς και στους ιστούς υδρόβιων ζωικών οργανισμών. Έτσι, θα επιχειρηθεί η κάλυψη κενών στη διεθνή και ελληνική βιβλιογραφία.

«Η Λίμνη Albert της Αυστραλίας έχει κλείσει λόγω της τοξικής παρουσίας των κυανοβακτηρίων... (ABC News, Australia 25.01.07)»

«Προειδοποίηση για την παρουσία μικροκυστινών στο πόσιμο νερό στην περιοχή Quebec του Καναδά... (TheStar.com, Canada 06.07.07)»

«Οι αθλητικές δραστηριότητες σε λίμνη της Αγγλίας αναβλήθηκαν λόγω της παρουσίας στο νερό της λίμνης μεγάλου όγκου τοξικών κυανοβακτηρίων... (BBC News, England 23.08.07)»

Κεφαλίδες εφημερίδων όπως οι παραπάνω, επισημαίνουν ότι ένα σαφές πρόβλημα αναπτύσσεται παγκοσμίως: Τα τοξικά κυανοβακτήρια είναι μικροσκοπικοί οργανισμοί υψηλής σπουδαιότητας για κάθε οικοσύστημα αλλά επίσης και πηγή επικινδυνότητας για την υγεία των ζώων και των ανθρώπων.

Η μελέτη της τοξικότητάς των κυανοβακτηρίων και της επίδρασής της στους οργανισμούς των ελληνικών εσωτερικών υδάτων, είναι ελάχιστα μελετημένη. Επιπλέον, η ενημέρωση του ελληνικού κοινού σχετικά με την παρουσία των κυανοτοξινών στα νερά των λιμνών που χρησιμοποιούνται για αρκετές χρήσεις, είναι απούσα. Στα πλαίσια της παρούσας έρευνας γίνεται προσπάθεια πλήρωσης των παραπάνω κενών και εμπλουτισμού της γνώσης που σχετίζεται με την τοξικότητα των κυανοβακτηρίων, ως βασικό βήμα προς τη συνειδητοποίηση του προβλήματος και την εύρεση λύσεων.

Για τους παραπάνω λόγους επικεντρώθηκε το ενδιαφέρον της παρούσας μελέτης στα εξής θέματα:

1. Την εκτίμηση των παραμέτρων της ποιότητας του νερού της λίμνης Παμβώτιδας, που συμβάλλουν στην ετήσια δυναμική των μικροκυστινών.
2. Τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης των μικροκυστινών (ενδοκυττάρων και εξωκυττάρων) στο νερό εσωτερικών υδάτινων οικοσυστημάτων της Ελλάδος.
3. Τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης των μικροκυστινών στους ιστούς τους ιχθύος *Carassius gibelio* των ελληνικών εσωτερικών υδάτινων οικοσυστημάτων. Το είδος αυτό επιλέχθηκε γιατί είναι ένα κοσμοπολίτικο είδος με ευρεία διασπορά στα περισσότερα υδάτινα οικοσυστήματα της Ευρώπης και της Ασίας.
4. Την εκτίμηση της ευαισθησίας στις μικροκυστίνες, που εμφανίζουν οι ιχθύες του είδους *Rutilus rutilus*, ανάλογα με το μέγεθός τους. Το είδος αυτό είναι ενδημικό της Δυτικής Ελλάδας και επιλέχθηκε γιατί παρουσιάζει διαφοροποίηση των διατροφικών του συνηθειών σε σχέση με την ηλικία.
5. Τον προσδιορισμό της εποχιακής κατανομής των μικροκυστινών σε υδρόβιους οργανισμούς της Λίμνης Παμβώτιδας.
6. Την εκτίμηση της πιθανής βιομεγένθυσης των μικροκυστινών διαμέσου της τροφικής αλυσίδας.
7. Τον έλεγχο της τοξικότητας των κυανοβακτηριακών εκχυλισμάτων της Λίμνης Παμβώτιδας με τη χρήση βιοδοκιμών με επίμυες και με ιχθύες του είδους *Danio rerio*.
8. Τη διερεύνηση της πιθανής απειλής της δημόσιας υγείας από την παρουσία των μικροκυστινών στα ελληνικά εσωτερικά υδάτινα οικοσυστήματα.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

Εποχιακή διακύμανση της συγκέντρωσης των μικροκυστινών στη Λίμνη Παμβώτιδα και εκτίμηση των περιβαλλοντικών παραγόντων που τη διαμορφώνουν.



3.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Φαινόμενα άνθησης κυανοβακτηρίων περιγράφηκαν για πρώτη φορά το 1878 (Francis, 1878) και από τότε έως σήμερα, μαζικές ανθήσεις κυανοβακτηρίων έχουν περιγραφεί σε ευτροφικές λίμνες και δεξαμενές πόσιμου νερού, σε όλες τις περιοχές του κόσμου (Kotak et al., 1995; Chorus, 2001). Επιστημονικές έρευνες έχουν αποδείξει ότι το 75% των υδάτων που περιέχουν κυανοβακτήρια, περιέχουν επίσης και τοξικούς κυανοβακτηριακούς μεταβολίτες (Sivonen & Jones, 1999). Οι μικροκυστίνες ως οι πιο κοσμοπολίτικες κυανοτοξίνες (Carmichael, 1992), ενοχοποιούνται για την υποβάθμιση της ποιότητας των υδάτων αλλά και της δημόσιας υγείας (Carmichael, 2001). Για τον παραπάνω λόγο, γίνονται προσπάθειες συχνής παρακολούθησης των συγκεντρώσεων των μικροκυστινών στα ύδατα που χαρακτηρίζονται από την παρουσία τοξικών κυανοβακτηρίων (Chorus, 2001).

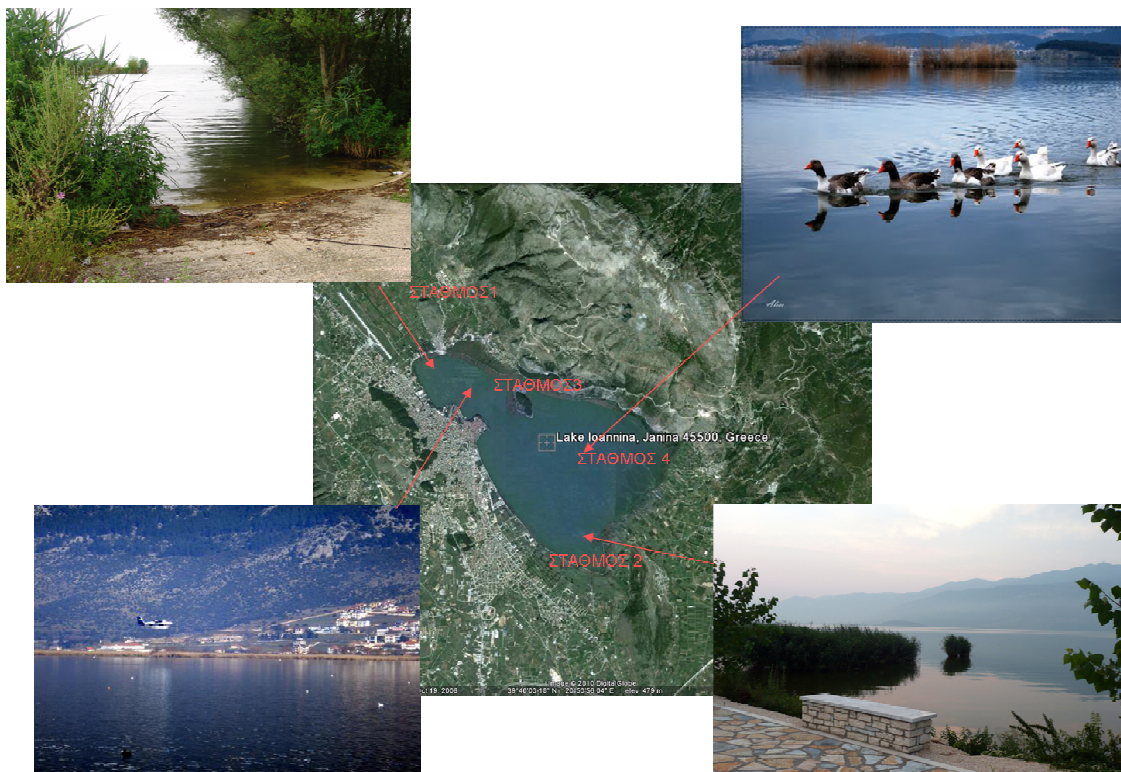
Οι περιβαλλοντικοί παράγοντες, ως παράμετροι της ποιότητας των νερών, συμβάλλουν στη διαμόρφωση των συγκεντρώσεων των μικροκυστινών, κατά την άνθηση των κυανοβακτηρίων (Rapala & Sivonen, 1998). Αρκετοί περιβαλλοντικοί παράγοντες, όπως η συγκέντρωση των θρεπτικών συστατικών, ο βαθμός διαστρωμάτωσης των λιμνών και η ένταση του φωτός επιδρούν στην πληθυσμιακή αύξηση των κυανοβακτηρίων, τη συσσώρευσή τους και τη διασπορά τους (Oh et al., 2000; Hesse & Kohl 2001; Long et al., 2001; Vezie et al., 2002; Maria et al., 2003). Έτσι, η κυανοβακτηριακή τοξικότητα μιας λίμνης μπορεί να διαφέρει χρονικά και χωρικά (Li et al., 2007). Από τα παραπάνω γίνεται φανερό ότι η κατανόηση των παραμέτρων που επιδρούν στην παραγωγή των μικροκυστινών είναι απαραίτητο βήμα προκειμένου να προβλεφθούν τα διάφορα τοξικά επεισόδια και να προασπιστεί η δημόσια υγεία.

Σκοπός της παρούσας ενότητας ήταν η ετήσια παρακολούθηση της διακύμανσης των συγκεντρώσεων των μικροκυστινών στη Λίμνη Παμβώτιδα. Επιπλέον, έγινε προσπάθεια για την εκτίμηση των παραμέτρων της ποιότητας του νερού της λίμνης (φυσικοχημικές

παράμετροι, θρεπτικά συστατικά, χλωροφύλλη-α και φυκοκυανίνη) που συμβάλλουν στη δυναμική των μικροκυστινών.

3.2 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.2.1 Περιοχή μελέτης



Εικόνα 3.1. Χάρτης της Λίμνης Παμβώτιδας, στον οποίο σημειώνονται οι τέσσερις σταθμοί δειγματοληψίας (από *googleearth*)
Figure 3.1. Map of Pamvotis Lake with the four sampling stations (from *googleearth*)

Η περιοχή μελέτης ήταν η Λίμνη Παμβώτιδα, η οποία βρίσκεται στη Βορειοδυτική Ελλάδα ($39^{\circ} 40' N$, $20^{\circ} 53' E$) (Εικόνα 3.1). Σε αυτήν επιλέχθηκαν δύο παρόχθιοι σταθμοί δειγματοληψίας (σταθμός 1 και 2), καθώς και δύο πελαγικοί σταθμοί δειγματοληψίας (σταθμός 3 και 4). Ο σταθμός 1 βρίσκεται στην Περιοχή του Περάματος ($39^{\circ} 41' 2136'' N$, $20^{\circ} 50' 3866'' E$), ενώ ο σταθμός 2 βρίσκεται στην Περιοχή του Κατσικά ($39^{\circ} 38' 0044'' N$, $20^{\circ} 53' 4730'' E$). Ο σταθμός 3 ($39^{\circ} 40' 5119'' N$, $20^{\circ} 51' 2312'' E$) βρίσκεται στο κέντρο της μικρής περιοχής της λίμνης,

ενώ ο σταθμός 4 (29° 39'4655''N, 20° 53'3665'' E) βρίσκεται στο κέντρο της μεγάλης περιοχής της λίμνης. Η επιλογή της θέσης των σταθμών έγινε σύμφωνα με τη χρήση αυτών για ψυχαγωγικές ή για αρδευτικές δραστηριότητες.

Η Λίμνη Παμβώτιδα είναι μια μεσογειακή ρηχή λίμνη η οποία έχει έκταση περίπου 23 km² και μέσο βάθος 5.5m (Kagalou et al., 2003, Romero et al., 2002). Η λίμνη χαρακτηρίζεται ως σημαντικός οικοτόπος, σύμφωνα με την οδηγία NATURA 2000 (Kagalou et al., 2008). Από τα είδη ιχθύων που ζουν στην Παμβώτιδα, έξι (*Rutilus rutilus*, *Barbus albanicus*, *Economidichthys pygmaeus*, *Silurus arisostotelis*, *Cobitis hellenica*, *Polyodon spathula*) περιλαμβάνονται στη κοινοτική οδηγία 92/43/ΕΟΚ, έξι (*Pseudophoxinus stymphalicus*, *Rutilus rutilus*, *Economidichthys pygmaeus*, *Silurus arisostotelis*, *Silurus glanis*, *Acipenser ruthenus*) είναι προστατευόμενα είδη σύμφωνα με την συνθήκη της Βέρνης και εννέα (*Leuciscus cephalus*, *Pseudophoxinus stymphalicus*, *Barbus albanicus*, *Economidichthys pygmaeus*, *Cobitis hellenica*, *Acipenser baerii*, *Acipenser gueldenstadtii*, *Acipenser ruthenus*, *Polyodon spathula*) περιλαμβάνονται στο Κόκκινο Βιβλίο σαν τοπικά απειλούμενα είδη (Ekonomidis,1991). Το νερό της Λίμνης Παμβώτιδας χρησιμοποιείται για αρδευτικούς και ψυχαγωγικούς σκοπούς, ενώ ασκείται και αλιευτική δραστηριότητα, έντονη στο παρελθόν, μικρότερη πρόσφατα (Kagalou & Leonardos, 2009).

Εντούτοις, τις τρεις τελευταίες δεκαετίες, το τροφικό επίπεδο της λίμνης έχει μεταβληθεί σε εύτροφο λόγω της αυξανόμενης ανθρωπογενούς δραστηριότητας (κυρίως λόγω της άρδευσης) (Albanis et al., 1986; Stalikas et al., 1994; Kotti et al., 2000; Kagalou et al., 2001; 2008). Η λίμνη χαρακτηρίζεται από σημαντικές συγκεντρώσεις αζώτου και φωσφόρου τόσο από τις εισροές όσο και από την εσωτερική τροφοδοσία του πυθμένα της (Romero et al., 2002). Οι Vardaka et al., (2005), υπολόγισαν τον βιοόγκο των κυανοβακτηρίων στη Λίμνη Παμβώτιδα (9.507 cm³ m⁻³), αποδεικνύοντας τον αυξημένο ευτροφισμό της και την έντονη παρουσία της άνθησης των κυανοβακτηρίων στη λίμνη. Κατά τη διάρκεια της παρούσας μελέτης, παρατηρήθηκε μαζική

άνθηση κυανοβακτηρίων από τις αρχές του Ιουνίου μέχρι τα μέσα του Νοεμβρίου, ενώ η παρουσία μικρότερου βιοόγκου κυανοβακτηρίων ήταν αισθητή καθόλη τη διάρκεια του έτους 2008.

3.2.2 Περιγραφή δειγματοληψίας

Η συλλογή των δειγμάτων του νερού λάμβανε χώρα μια φορά τον μήνα καθόλη τη διάρκεια του έτους 2008. Η συλλογή γινόταν με τη βοήθεια δοχείων πολυαιθυλενίου όγκου 1500 ml, τα οποία τοποθετούνταν 10-20cm κάτω από την επιφάνεια του νερού, κάθε σταθμού. Τα δοχεία βυθίζονταν αργά στο νερό ώστε η επιφάνεια του νερού να διαταράσσεται όσο το δυνατόν λιγότερο. Σε κάθε δειγματοληψία, λαμβάνονταν οι τιμές της θερμοκρασίας του νερού, του διαλυμένου στο νερό οξυγόνου και του pH. Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν *in situ* με φορητά όργανα μέτρησης, η συγκέντρωση του διαλυμένου στο νερό οξυγόνου με το WTW Oxy340i, το pH και η θερμοκρασία με το YSI63.

Τα δείγματα του νερού μεταφέρθηκαν με τη βοήθεια φορητών ψυγείων στο εργαστήριο, όπου και πραγματοποιήθηκε ο ποσοτικός προσδιορισμός των θρεπτικών ανόργανων ενώσεων (αμμωνιακών (N-NH₄), νιτρικών (N-NO₃), νιτρωδών (N-NO₂) και ορθοφωσφορικών ιόντων (P-PO₄)), της χλωροφύλλης-α, της φυκοκυανίνης και των μικροκυστινών που περιείχονταν στα δείγματα του νερού.

Επίσης, πραγματοποιούνταν μηνιαία συλλογή δειγμάτων φυτοπλαγκτού από τον ένα παρόχθιο σταθμό δειγματοληψίας (σταθμός 1) και από τον ένα πελαγικό σταθμό δειγματοληψίας (σταθμός 4). Η συλλογή πραγματοποιούνταν με τη διήθηση 50 l νερού από κάθε σταθμό, με τη βοήθεια φυτοπλαγκτονικού δικτυού (27μm) (Εικόνα 3.2). Τα προσυγκεντρωμένα δείγματα που προέκυψαν, διατηρήθηκαν σε διάλυμα φορμαλδεΐδης 37%, προκειμένου να πραγματοποιηθεί η μικροσκοπική παρατήρησή τους σε ανάστροφο μικροσκόπιο Zeiss (Axiovert 40 CFL) σύμφωνα με το ταξινομικό σύστημα των Anagnostidis & Komarek (1985, 1988) και Komarek & Anagnostidis (1986, 1989).



Εικόνα 3.2. Δίκτυο (mesh size of the net: 27 μm), για τη συλλογή των φυτοπλαγκτονικών δειγμάτων στους παρόχθιους σταθμούς της Λίμνης Παμβώτιδας κατά τη διάρκεια του έτους 2008.

Figure 3.2. Sample (mesh size of the net: 27 μm) collected in littoral stations of Lake Pamvotis, during 2008

3.2.3. Ποσοτικός προσδιορισμός των ανόργανων θρεπτικών ενώσεων του νερού

Όγκος 200 ml από κάθε δείγμα νερού, διήλθε μέσω ηθμών Whatman GF/C (0.45- μm) υπό κενό (συσκευή διήθησης νερού KNF LAB). Κατόπιν, από το διήθημα λαμβονόταν υπόδειγμα στο οποίο προσδιοριζόταν οι συγκεντρώσεις των ανόργανων θρεπτικών ενώσεων με εφαρμογή διαφορετικών πρωτόκολλων προσδιορισμού για κάθε ένωση και με τη χρήση φασματομέτρου HACH DR/2400.

Για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης των αμμωνιακών ιόντων στα δείγματα του νερού χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος Nessler. Σύμφωνα με τη μέθοδο αυτή, το αντιδραστήριο Nessler (K_2HgI_4) αντιδρά υπό ισχυρά αλκαλικές συνθήκες με αμμωνία σχηματίζοντας έγχρωμα προϊόντα. Η ένταση του χρώματος μετράται στα 425 nm και είναι ανάλογη με τη συγκέντρωση της αμμωνίας στο δείγμα (A.P.H.A., 2002). Το εύρος των συγκεντρώσεων των αμμωνιακών ιόντων που ανιχνεύει η συγκεκριμένη μέθοδος είναι 0.02-2.5 mg/l.

Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης των νιτρικών ιόντων πραγματοποιήθηκε βάσει της μεθόδου αναγωγής του καδμίου. Σύμφωνα

με τη μέθοδο αυτή, το κάδμιο χρησιμοποιείται για την αναγωγή των νιτρικών ιόντων σε νιτρώδη. Στη συνέχεια, τα νιτρώδη ιόντα αντιδρούν με το μονοβασικό σουλφανλικό οξύ σχηματίζοντας ένα ενδιάμεσο διαζωνικό άλας. Το διαζωνικό άλας, στη συνέχεια, σχηματίζει ένα έγχρωμο σύμπλοκο με το χρωμοτροπικό οξύ. Η ένταση του χρώματος μετράται στα 430 nm και είναι ανάλογη με τη συγκέντρωση των νιτρικών ιόντων στο δείγμα (A.P.H.A., 2002). Το εύρος των συγκεντρώσεων των νιτρικών ιόντων που ανιχνεύει η συγκεκριμένη μέθοδος είναι 0.1-10.0 mg/l.

Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης των νιτρωδών ιόντων, πραγματοποιείται μέσω της μεθόδου διαζώτωσης. Σύμφωνα με τη μέθοδο αυτή, τα νιτρώδη ιόντα αντιδρούν με το σουλφανλικό οξύ σχηματίζοντας ένα διαζωνιακό άλας. Στη συνέχεια λαμβάνει χώρα αντίδραση του διαζωνιακού άλατος με χρωμοτροπικό οξύ σχηματίζοντας ένα έγχρωμο σύμπλοκο. Η ένταση του χρώματος μετράται στα 507 nm και είναι ανάλογη με τη συγκέντρωση των νιτρωδών ιόντων στο δείγμα (A.P.H.A., 2002). Το εύρος των συγκεντρώσεων των νιτρωδών ιόντων που ανιχνεύει η συγκεκριμένη μέθοδος είναι 0.002-0.300 mg/l.

Η μέθοδος προσδιορισμού των ορθοφωσφορικών ιόντων του νερού στηρίζεται στην συμπλοκοποίηση των φωσφορικών ιόντων με μολυβδαινικά ιόντα σε όξινες συνθήκες. Παρουσία ασκορβικού οξέος λαμβάνει χώρα αναγωγή του σχηματιζόμενου συμπλόκου δίνοντας στο διάλυμα μπλε χρωματισμό. Η ένταση του χρώματος, η οποία είναι ανάλογη με την συγκέντρωση του δείγματος σε φωσφόρο, μετράται φασματοφωτομετρικά σε μήκος κύματος 890 nm (A.P.H.A., 2002). Το εύρος των συγκεντρώσεων των ορθοφωσφορικών ιόντων που ανιχνεύει η συγκεκριμένη μέθοδος είναι 0.02- 2.5 mg/l.

3.2.4. Ποσοτικός προσδιορισμός χλωροφύλλης-α

Για τον προσδιορισμό της χλωροφύλλης-α των δειγμάτων, όγκος 500 ml από κάθε δείγμα νερού, διήλθε μέσω ηθμών Whatman GF/C (0.45-μm) σε κενό (συσκευή διήθησης νερού KNF LAB). Ακολούθησε η εκχύλιση της χλωροφύλλης-α από τον ηθμό, με διάλυμα ακετόνης 95% (A.P.H.A. 1989). Έπειτα, καταγράφηκε η απορρόφηση του διαλύματος

στα 630 nm, 647 nm, 664 nm και 750 nm (A.P.H.A. 1989). Η τελική συγκέντρωση της χλωροφύλλης-α (σε µg/l) προσδιορίζεται σύμφωνα με την εξίσωση προσδιορισμού των Jeffrey & Humphrey (1975):

$$Chl_a = C_a * V_{ex} * V_{sample}^{-1},$$

Όπου,

V_{ex} = όγκος δείγματος που μετρήθηκε

V_{sample} = όγκος δείγματος που διηθήθηκε

και

$$C_a = 11.85 * (OD'_{664}) - 1.54 * (OD'_{647}) - 0.08 * (OD'_{630})$$

Όπου

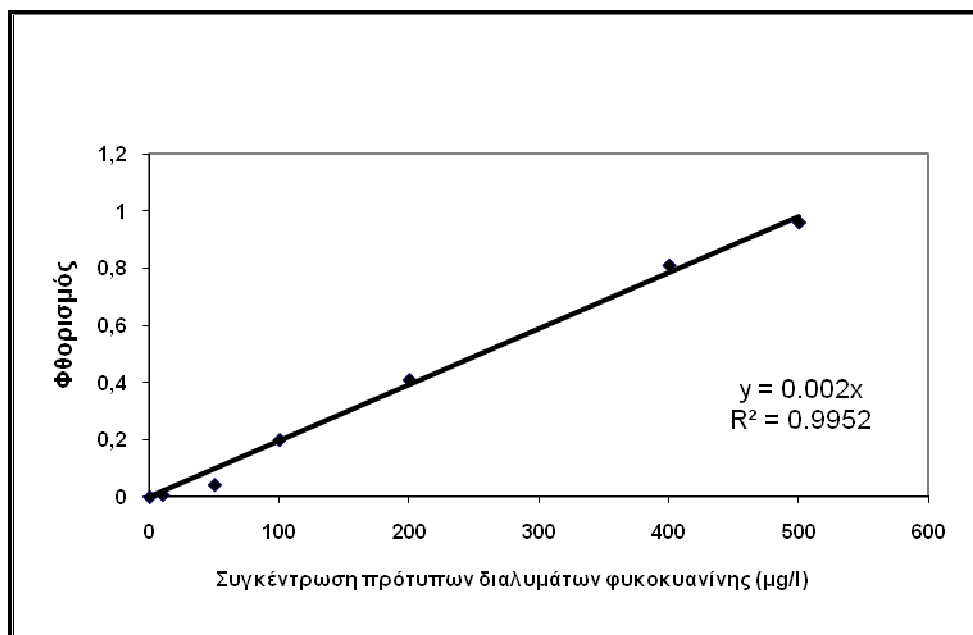
OD'_{664} = Απορρόφηση 664- Απορρόφηση 750

OD'_{647} = Απορρόφηση 647- Απορρόφηση 750

OD'_{630} = Απορρόφηση 630- Απορρόφηση 750

3.2.5. Ποσοτικός προσδιορισμός φυκοκυανίνης

Ο ποσοτικός προσδιορισμός της φυκοκυανίνης, που περιέχεται στα δείγματα του νερού, πραγματοποιήθηκε φθορισμομετρικά. Όγκος νερού (250 ml) διήλθε μέσω ηθμών υάλου (Whatman glass fiber filters) (0.22µm, 47mm) σε κενό (συσκευή διήθησης νερού KNF LAB). Προκειμένου να ενισχυθεί η εγκυρότητα των αποτελεσμάτων, το κάθε ένα δείγμα αντιπροσωπεύεται από δύο ηθμούς. Οι ηθμοί καταψύχθηκαν μέχρι τη στιγμή της ανάλυσης. Ακολούθησε η εκκύλιση της φυκοκυανίνης από τους ηθμούς, με διάλυμα φωσφορικών αλάτων 10mM (pH=7) (Sarada et al., 1999). Ο προσδιορισμός πραγματοποιήθηκε σε φθορισμόμετρο (Perkin Elmer, LS45). Το μήκος κύματος της διέγερσης του μορίου ορίστηκε στα 630 nm, ενώ το μήκος κύματος της εκπομπής του μορίου ορίστηκε στα 660 nm (Sarada et al., 1999). Η κατασκευή της πρότυπης καμπύλης έγινε με τη χρήση προτύπων διαλυμάτων καθαρής φυκοκυανίνης (Εικόνα 3.3), απομονωμένης από το κυανοβακτήριο *Spirulina* sp. (Sigma, P2172).



Εικόνα 3.3 Πρότυπη καμπύλη υπολογισμού φυκοκυανίνης
Figure 3.3 Standard curve of phycocyanin

3.2.6 Ποσοτικός προσδιορισμός μικροκυστινών

3.2.6.1 Επεξεργασία και αποθήκευση

Οι μικροκυστίνες που περιέχονταν στα δείγματα του νερού αναλύθηκαν σε 2 μορφές: διαλυμένες στο νερό (εξωκυττάρια) και στο εσωτερικό των κυττάρων του αιωρούμενου υλικού (ενδοκυττάρια). Όγκος 500 ml από κάθε δείγμα νερού, διήλθε μέσω ηθμών Whatman GF/C (0.45-μm) υπό κενό (συσκευή διήθησης νερού KNF LAB). Οι ηθμοί χρησιμοποιήθηκαν για τον ποσοτικό προσδιορισμό των ενδοκυττάρια μικροκυστινών και διατηρήθηκαν σε θερμοκρασία -20°C μέχρι την περαιτέρω επεξεργασία τους. Το διήθημα χρησιμοποιήθηκε απευθείας για τον ποσοτικό προσδιορισμό των εξωκυττάρια μικροκυστινών (Carmichael & An, 1999) με τη βοήθεια της ενζυμοσυνδεδεόμενης ανοσοπροσοροφητικής τεχνικής (ELISA) (Mathys & Surholt, 2004).

3.2.6.2 Εκχύλιση μικροκυστινών

Η εκχύλιση των ενδοκυττάρων μικροκυστινών από τους ηθμούς πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας ως διαλύτη μεθανόλη 100% (v/v), σύμφωνα με τους Lawton et al., (1994), Carmichael & An, (1999). Ακολούθησε ομογενοποίηση με ανάδευση για 12 ώρες. Το εναιώρημα τοποθετήθηκε σε κατεργασία με υπερήχους (Vibra Cell Sonicator, Sonics and Material Inc.) για 15 λεπτά και φυγοκεντρήθηκε στις 1300 rpm για 15 λεπτά σύμφωνα με τους Rositano & Nicholson, (1994), Meriluoto & Eriksson, (1988). Το υπερκείμενο συλλέχθηκε και στη συνέχεια η διαδικασία: προσθήκη μεθανόλης-ανάδευση-κατεργασία με υπερήχους-φυγοκέντρωση-συλλογή του υπερκειμένου επαναλήφθηκε άλλες δύο φορές σύμφωνα με τους Lawton et al., (1994), Fastner et al., (1998), Flett & Nicholson, (1991), Coyle & Lawton, (1996), Ward et al., (1997). Το υπερκείμενο τοποθετήθηκε σε ρεύμα αζώτου προκειμένου να εξατμιστεί πλήρως η μεθανόλη, σύμφωνα με τους Metcalf et al., (2000) και το προσυγκεντρωμένο δείγμα επαναδιαλύθηκε σε ελάχιστο όγκο μεθανόλης 100%. Ακολούθησε αραιώση του δείγματος με απεσταγμένο νερό ώστε να μειωθεί ο όγκος της μεθανόλης στο 2% (Carmichael & An, 1999).

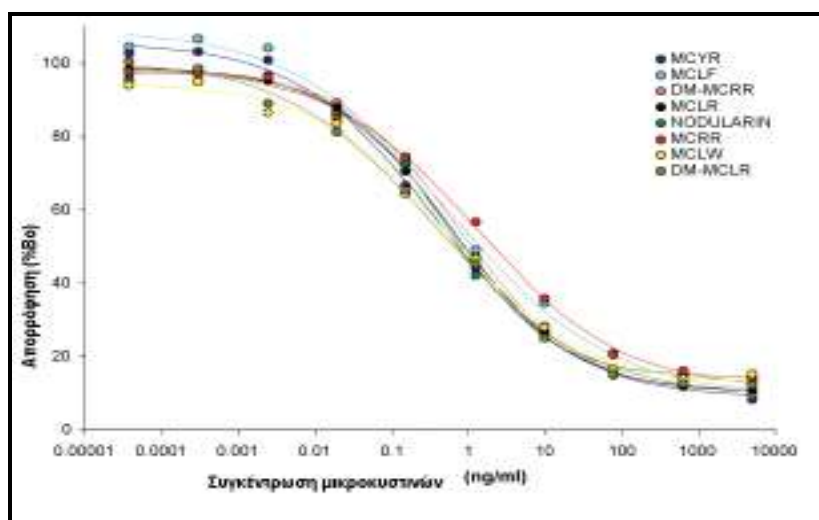
Στο αραιωμένο δείγμα που προέκυψε προσδιορίστηκαν ποσοτικά οι μικροκυστίνες μέσω της ενζυμοσυνδεόμενης ανοσοπροσοροφητικής τεχνικής (ELISA).

3.2.6.3 Ενζυμοσυνδεόμενος ανοσοπροσοροφητικός προσδιορισμός (ELISA)

Η ενζυμοσυνδεόμενη ανοσοπροσοροφητική τεχνική, η οποία χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη πραγματοποιήθηκε με το σύστημα ABRAXIS-Microcystin ELISA kit (520011, USA). Η κατασκευή και η χρήση του παραπάνω συστήματος βασίζεται σε μια νέα τεχνική που αναπτύχθηκε από τους Fischer et al., (2001). Πρόκειται για μια έμμεσα-ανταγωνιστική μέθοδο η οποία χρησιμοποιεί αντισώματα τα οποία αναγνωρίζουν ως επίτοπο το αμινοξύ ADDA. Το συγκεκριμένο αμινοξύ αποτελεί μέρος του μορίου όλων των μικροκυστινών και των νοντουλαρινών και έχει αποδειχθεί ότι είναι υπεύθυνο για την τοξική

δράση των παραπάνω τοξινών (Carmichael, 1992; Ransom et al., 1994). Στα μικροπηγάδια τιτλοδότησης του ELISA kit που χρησιμοποιήθηκε, βρίσκονται ακινητοποιημένα σύμπλοκα ADDA – πρωτεΐνης, τα οποία ανταγωνίζονται με τις μικροκυστίνες των δειγμάτων για περιορισμένο αριθμό αντισωμάτων.

Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε πλεονεκτεί έναντι των παλαιότερων μεθόδων που χρησιμοποιούσαν μονοκλωνικά (Saito et al., 1994) ή πολυκλωνικά αντισώματα (Chu et al., 1989) στο γεγονός ότι μπορεί να ανιχνεύσει μεγαλύτερο εύρος αναλόγων μικροκυστινών. Η μεγάλη ευαισθησία της μεθόδου σε ένα πλήθος αναλόγων μικροκυστινών (Εικόνα 3.4) την καθιστά την πιο αξιόπιστη μέθοδο ποσοτικού προσδιορισμού των μικροκυστινών.



Εικόνα 3.4. Πρότυπες καμπύλες της συγκέντρωσης διαφόρων αναλόγων μικροκυστινών σύμφωνα με τους Fischer et al., (2001) (από Fischer et al., 2001).

Figure 3.4. Standard curves for Microcystin analogues according to Fischer et al., (2001) (from Fischer et al., 2001).

Η κάθε δοκιμή πραγματοποιήθηκε ως εξής:

Αρχικά προστέθηκαν στα πηγάδια τα προς ανάλυση δείγματα (50 μl), τα δείγματα νερού απαλλαγμένα από τοξίνες (control) (50 μl) και τα πρότυπα διαλύματα των μικροκυστινών (50 μl). Καθένα από τα παραπάνω διαλύματα αντιπροσωπευόταν από δυο πηγάδια. Ακολούθησε η προσθήκη του πρώτου αντισώματος και η επώαση τους σε θερμοκρασία δωματίου για 90 λεπτά. Στο τέλος της επώασης τα

πηγαδάκια εκπλύθηκαν τρεις φορές με το ειδικό διάλυμα έκπλυσης. Έπειτα, προστέθηκε σε κάθε πηγαδάκι το δεύτερο αντίσωμα το οποίο είναι συνδεδεμένο με κατάλληλο ένζυμο (100μl) και ακολούθησε επώαση για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά την εφαρμογή ενός δεύτερου σταδίου έκπλυσης, προστέθηκε το διάλυμα με το υπόστρωμα της αντίδρασης (100μl), στην οποία συμμετέχει το παραπάνω ένζυμο και ακολούθησε επώαση για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Στο τέλος της επώασης προστέθηκε το διάλυμα τερματισμού της αντίδρασης (50 μl) και μετρήθηκε η απορρόφηση των χρωμοφόρων προϊόντων της αντίδρασης, στα 450 nm με τη χρήση φωτομέτρου (Bio-Tek MWGAG).

Σε κάθε δοκιμαστικό πηγαδάκι, υπάρχει ίσος αριθμός μορίων συμπλόκου ADDA –πρωτεΐνης και κάθε δοκιμαστικό πηγαδάκι λαμβάνει ίσο αριθμό αντισωμάτων. Επομένως, ένα δείγμα που περιέχει μικροκυστίνες σε χαμηλή συγκέντρωση επιτρέπει σε μεγαλύτερο αριθμό μορίων συμπλόκου ADDA –πρωτεΐνης να δεσμευτεί από τα αντισώματα και το αποτέλεσμα είναι εντονότερο χρώμα. Αντίστροφα, ένα δείγμα που περιέχει μικροκυστίνες σε υψηλή συγκέντρωση επιτρέπει σε μικρότερο αριθμό μορίων συμπλόκου ADDA –πρωτεΐνης να δεσμευτεί από τα αντισώματα και το αποτέλεσμα είναι λιγότερο έντονο χρώμα (Fischer et al., 2001).

Η ικανότητα ανάκτησης της μεθόδου μετρήθηκε με την ανάλυση πραγματικών δειγμάτων πριν και μετά την προσθήκη προτύπων διαλυμάτων μικροκυστίνης. Αυτή υπολογίστηκε ίση με 97%. Η βαθμονόμηση της μεθόδου και η κατασκευή της πρότυπης καμπύλης έγινε με πρότυπα διαλύματα της μικροκυστίνης-LR συγκεντρώσεων: 0, 150 ng/l, 400 ng/l, 1000 ng/l, 2000 ng/l και 5000 ng/l. Η συγκέντρωση των μικροκυστινών που περιεχόταν στα δείγματα υπολογίστηκε από την πρότυπη καμπύλη, όπως προέκυψε από το στατιστικό λογισμικό (KCjunior, Bio-Tek Instruments). Η συγκέντρωση των μικροκυστινών που περιέχεται στα δείγματα του νερού, εκφράστηκε ως μικρογραμμάρια ισοδυνάμων μικροκυστίνης-LR ανα λίτρο ($\mu\text{g MC-LReq/l}$) (Hawkins et al., 2005).

3.3 ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ

Η στατιστική επεξεργασία των δεδομένων έγινε με τη χρήση του στατιστικού προγράμματος SPSS 17.0 for Windows. Τα δεδομένα ελέγχθηκαν ως προς την κατανομή τους, προκειμένου να εφαρμοστεί σε αυτά η ανάλυση διακύμανσης (ANOVA). Όσα δεν εμφάνιζαν κανονική κατανομή, λογαριθμούνταν και έπειτα εφαρμοζόταν η ANOVA. Με την εφαρμογή της ANOVA εξετάζονταν τυχόν σημαντικές διαφορές ανάμεσα στα δείγματα των πελαγικών και παρόχθιων σταθμών δειγματοληψίας, ως προς τη συγκέντρωση των μικροκυστινών και των τιμών των περιβαλλοντικών παραμέτρων του νερού. Επίσης η ίδια ανάλυση χρησιμοποιήθηκε για την εξέταση τυχόν σημαντικών διαφορών ανάμεσα στους μήνες ως προς τη συγκέντρωση των μικροκυστινών, της χλωροφύλλης-α και της φυκοκυανίνης. Η Ανάλυση Συσχέτισης (Correlation Analysis) κατά Spearman χρησιμοποιήθηκε για την διερεύνηση πιθανών συσχετίσεων των συγκεντρώσεων των μικροκυστινών με τις περιβαλλοντικές παραμέτρους του νερού. Επίσης, έγινε προσπάθεια ανεύρεσης της εξίσωσης που περιέγραφε καλύτερα τις παραπάνω συσχετίσεις, έχοντας ως κριτήριο επιλογής, την υψηλότερη τιμή F. Η ίδια ανάλυση (Correlation Analysis) χρησιμοποιήθηκε για τη διερεύνηση πιθανών συσχετίσεων της συγκέντρωσης των ενδοκυττάρων και εξωκυττάρων μικροκυστινών με τη συνολική συγκέντρωση των μικροκυστινών.

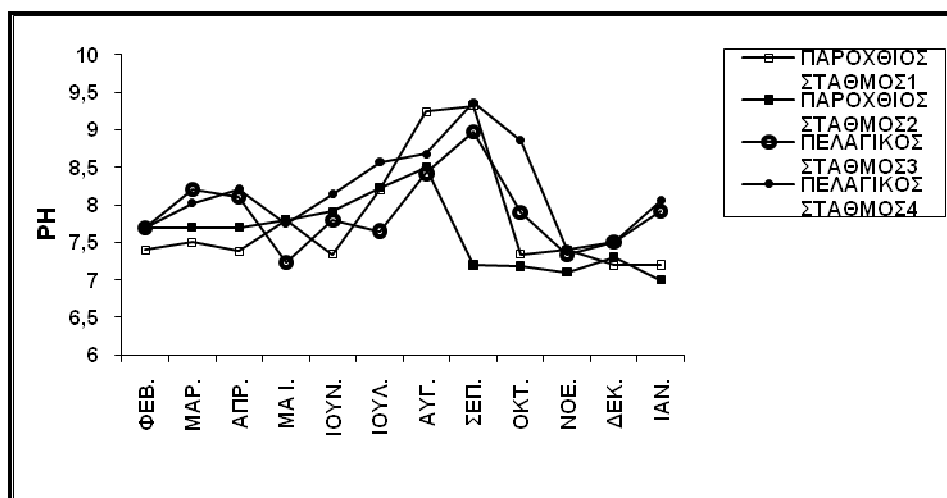
3.4 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.4.1 Περιβαλλοντικές και βιολογικές παράμετροι της Λίμνης Παμβώτιδας

Η μικροσκοπική παρατήρηση των φυτοπλαγκτονικών δειγμάτων της Λίμνης Παμβώτιδας έδειξε ότι το κυανοβακτηριακό γένος *Microcystis* ήταν κυρίαρχο στο τέλος της θερινής και της φθινοπωρινής περιόδου. Επιπλέον, αποικίες του *Microcystis* παρατηρήθηκαν και τους χειμερινούς μήνες παρόλο που κυρίαρχοι οργανισμοί αυτούς τους μήνες

ήταν τα διάτομα. Τα νηματοειδή κυανοβακτήρια του γένους *Anabaena* και *Aphanizomenon* ήταν κυρίαρχα τους δυο πρώτους θερινούς μήνες.

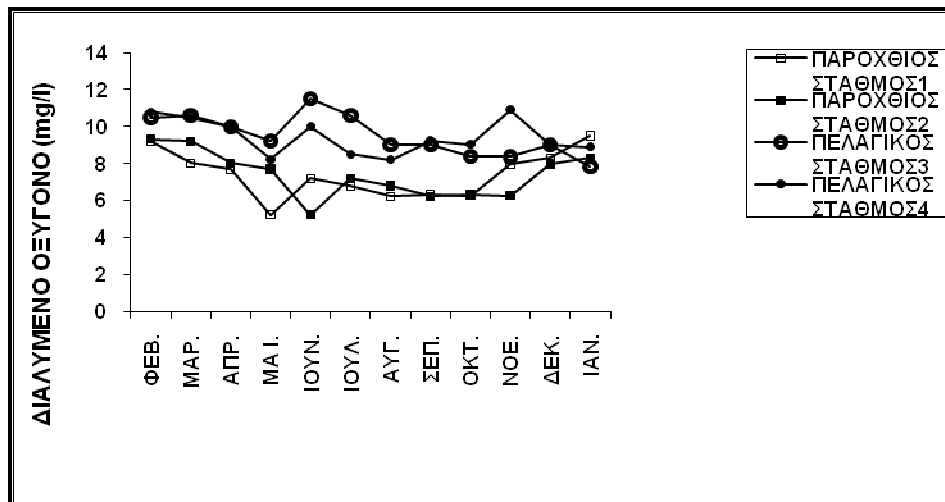
Η μέτρηση του pH στους τέσσερις σταθμούς δειγματοληψίας της Λίμνης Παμβώτιδας έδειξε ότι όλοι οι σταθμοί παρουσίαζαν υψηλές τιμές (8.26 ± 1.49) κατά τη διάρκεια των θερινών μηνών. Οι χαμηλότερες τιμές του pH (7.00 ± 0.14) μετρήθηκαν τους χειμερινούς μήνες (Εικόνα 3.5). Η διακύμανση των τιμών του pH δε διέφερε στατιστικά σημαντικά ανάμεσα στους παράχθιους και τους πελαγικούς σταθμούς ($P > 0.05$, $F = 2.72$).



Εικόνα 3.5 Μηνιαία διακύμανση του pH στους τέσσερις σταθμούς δειγματοληψίας της Λίμνης Παμβώτιδας.

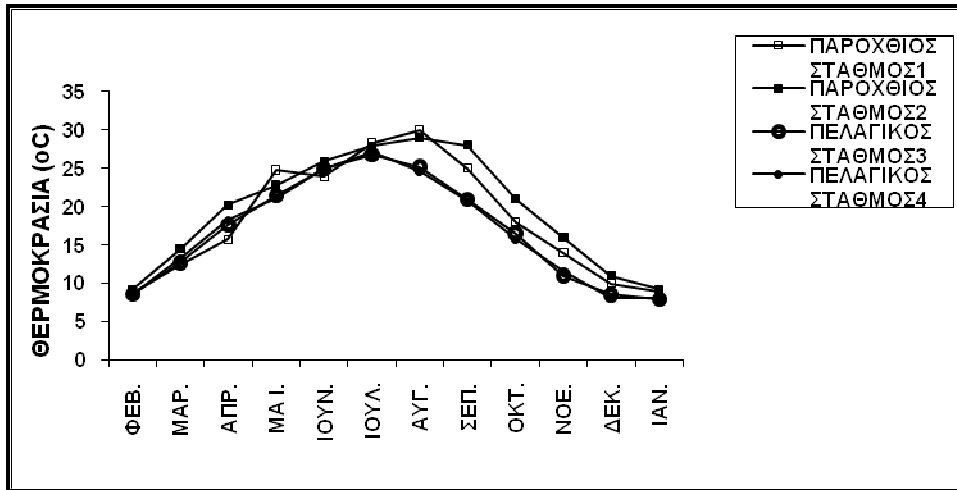
Figure 3.5. Monthly variation of pH in sampling stations of Lake Pamvotis.

Η μηνιαία διακύμανση του διαλυμένου οξυγόνου διέφερε στατιστικά σημαντικά ανάμεσα στους παράχθιους και πελαγικούς σταθμούς ($P < 0.05$, $F = 18.80$). Οι υψηλότερες τιμές του διαλυμένου οξυγόνου ($10.75 \text{ mg/l} \pm 1.05 \text{ mg/l}$) μετρήθηκαν στους πελαγικούς σταθμούς. Οι χαμηλότερες τιμές του διαλυμένου οξυγόνου ($6.20 \text{ mg/l} \pm 1.40 \text{ mg/l}$) μετρήθηκαν στους παράχθιους σταθμούς κατά τη διάρκεια των θερινών μηνών (Εικόνα 3.6).



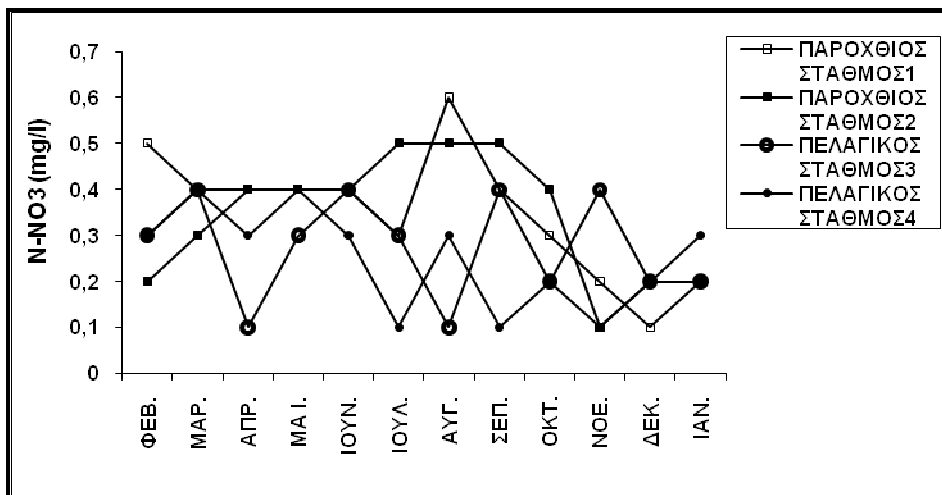
Εικόνα 3.6. Μηνιαία διακύμανση του Διαλυμένου οξυγόνου (mg/l) στους τέσσερις σταθμούς δειγματοληψίας της Λίμνης Παμβώτιδας.
Figure 3.6. Monthly variation of Dissolved oxygen (mg/l) in sampling stations of Lake Pamvotis.

Η μηνιαία διακύμανση της θερμοκρασίας δε διέφερε στατιστικά σημαντικά ανάμεσα στους παρόχθιους και τους πελαγικούς σταθμούς ($P > 0.05$, $F = 0.75$). Οι υψηλότερες θερμοκρασίες ($29.50^{\circ}\text{C} \pm 0.70^{\circ}\text{C}$) σημειώθηκαν κατά τη διάρκεια των θερινών μηνών, ενώ οι χαμηλότερες ($8.00^{\circ}\text{C} \pm 0.14^{\circ}\text{C}$) κατά τη διάρκεια των χειμερινών μηνών (Εικόνα 3.7).



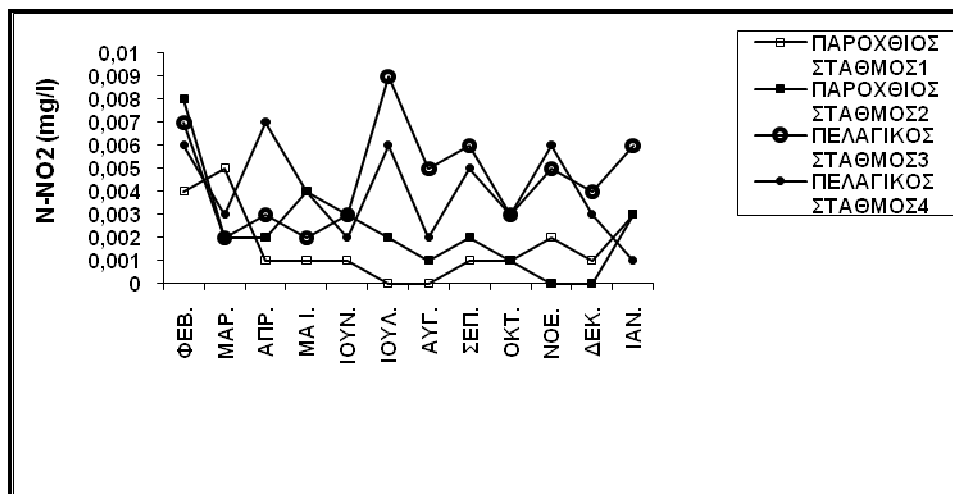
Εικόνα 3.7. Μηνιαία διακύμανση της Θερμοκρασίας (°C) στους τέσσερις σταθμούς δειγματοληψίας της Λίμνης Παμβώτιδας.
Figure 3.7. Monthly variation of Temperature (°C) in sampling stations of Lake Pamvotis.

Όσο αφορά τη διακύμανση της συγκέντρωσης των νιτρικών ιόντων (N-NO₃) του νερού της Λίμνης Παμβώτιδας, αυτή δε διέφερε στατιστικά σημαντικά ανάμεσα στους παρόχθιους και τους πελαγικούς σταθμούς (P>0.05, F=4.20). Οι υψηλότερες τιμές των νιτρικών ιόντων (0.55 mg/l ± 0.07 mg/l) μετρήθηκαν κατά τη διάρκεια των θερινών μηνών, ενώ οι χαμηλότερες τιμές (0.15 mg/l ± 0.07 mg/l) μετρήθηκαν κατά τη διάρκεια των χειμερινών μηνών (Εικόνα 3.8).



Εικόνα 3.8. Μηνιαία διακύμανση των νιτρικών ιόντων (N-NO₃, mg/l) στους τέσσερις σταθμούς δειγματοληψίας της Λίμνης Παμβώτιδας.
Figure 3.8. Monthly variation of N-NO₃ (mg/l) in sampling stations of Lake Pamvotis.

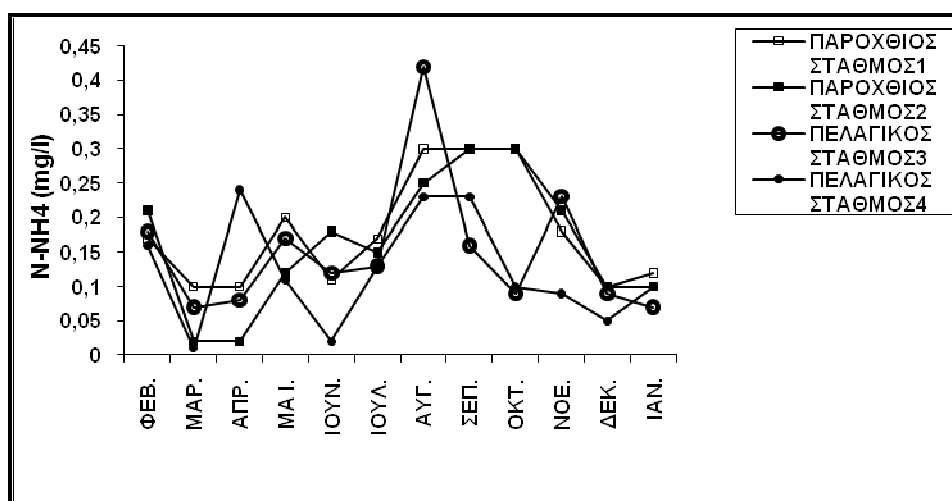
Η διακύμανση της συγκέντρωσης των νιτρικών ιόντων ($N-NO_2$) διέφερε στατιστικά σημαντικά ανάμεσα στους παρόχθιους και πελαγικούς σταθμούς ($P < 0.05$, $F = 12.00$). Οι υψηλότερες τιμές των νιτρικών ιόντων ($0.0075 \text{ mg/l} \pm 0.0021 \text{ mg/l}$) μετρήθηκαν τους θερινούς μήνες στους πελαγικούς σταθμούς, ενώ την ίδια περίοδο οι παρόχθιοι σταθμοί εμφάνισαν τις χαμηλότερες τιμές νιτρικών ιόντων ($0.0005 \text{ mg/l} \pm 0.0003 \text{ mg/l}$) (Εικόνα 3.9).



Εικόνα 3.9. Μηνιαία διακύμανση των νιτρικών ιόντων ($N-NO_2$, mg/l) στους τέσσερις σταθμούς δειγματοληψίας της Λίμνης Παμβώτιδας.

Figure 3.9. Monthly variation of $N-NO_2$ (mg/l) in sampling stations of Lake Pamvotis.

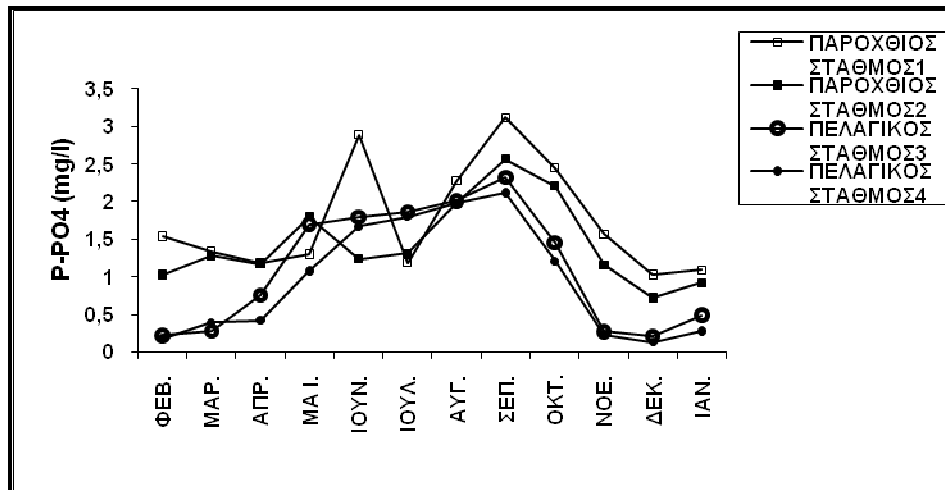
Η διακύμανση της συγκέντρωσης των αμμωνιακών ιόντων ($N-NH_4$) δε διέφερε στατιστικά σημαντικά ανάμεσα στους παρόχθιους και πελαγικούς σταθμούς ($P > 0.05$, $F = 2.30$). Οι υψηλότερες τιμές των αμμωνιακών ιόντων ($0.32 \text{ mg/l} \pm 0.13 \text{ mg/l}$) μετρήθηκαν τους θερινούς μήνες, ενώ οι μικρότερες τιμές μετρήθηκαν τους εαρινούς μήνες ($0.01 \text{ mg/l} \pm 0.004 \text{ mg/l}$) (Εικόνα 3.10).



Εικόνα 3.10. Μηνιαία διακύμανση των αμμωνιακών ιόντων (N -NH₄, mg/l) στους τέσσερις σταθμούς δειγματοληψίας της Λίμνης Παμβώτιδας.

Figure 3.10. Monthly variation of (N -NH₄, mg/l) in sampling stations of Lake Pamvotis.

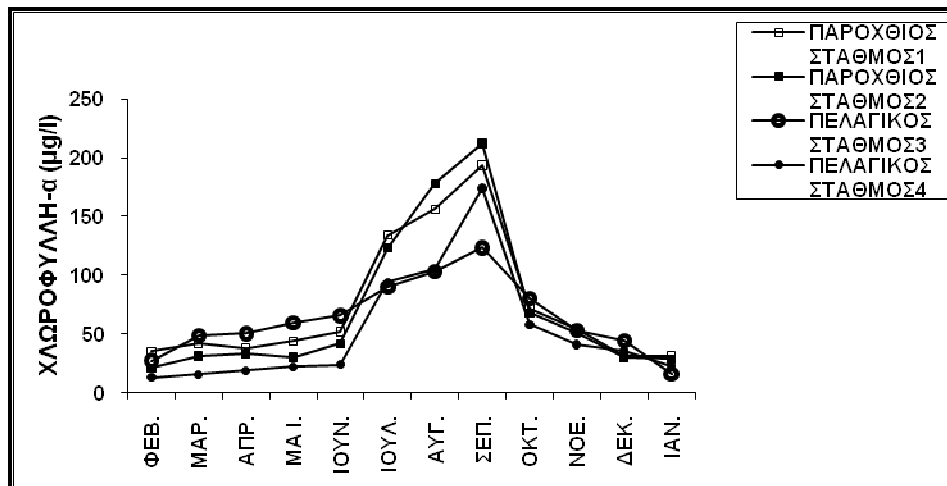
Η διακύμανση της συγκέντρωσης των ορθοφωσφορικών ιόντων (P-PO₄) διέφερε στατιστικά σημαντικά ανάμεσα στους παρόχθιους και τους πελαγικούς σταθμούς ($P < 0.05$, $F = 4.72$). Οι υψηλότερες τιμές των ορθοφωσφορικών ιόντων ($2.84 \text{ mg/l} \pm 0.38 \text{ mg/l}$) μετρήθηκαν στους παρόχθιους σταθμούς κατά τη διάρκεια των φθινοπωρινών μηνών, ενώ οι μικρότερες τιμές μετρήθηκαν στους πελαγικούς σταθμούς τους χειμερινούς μήνες ($0.17 \text{ mg/l} \pm 0.05 \text{ mg/l}$) (Εικόνα 3.11).



Εικόνα 3.11. Μηνιαία διακύμανση των ορθοφωφορικών ιόντων (P-PO₄, mg/l) στους τέσσερις σταθμούς δειγματοληψίας της Λίμνης Παμβώτιδας.

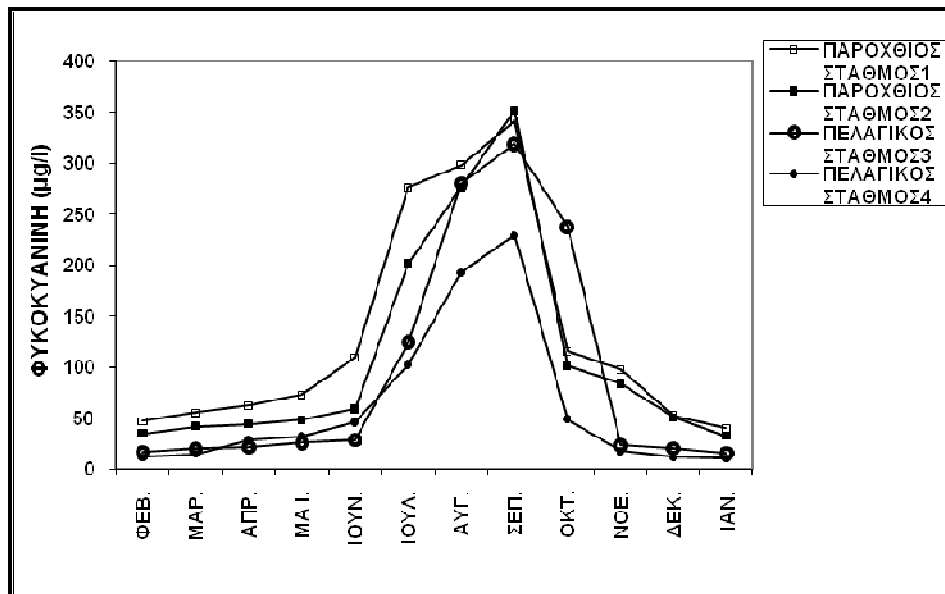
Figure 3.11. Monthly variation of P-PO₄ (mg/l) in sampling stations of Lake Pamvotis.

Η διακύμανση της συγκέντρωσης της χλωροφύλλης-α δε διέφερε στατιστικά σημαντικά ανάμεσα στους παρόχθιους και τους πελαγικούς σταθμούς ($P > 0.05$, $F = 0.486$). Εντούτοις, η συγκέντρωση της χλωροφύλλης-α διέφερε στατιστικά σημαντικά ανάμεσα στους μήνες ($P < 0.05$, $F = 25.29$). Οι υψηλότερες τιμές της χλωροφύλλης-α ($202.82 \mu\text{g/l} \pm 12.97 \mu\text{g/l}$) μετρήθηκαν τον πρώτο μήνα του φθινοπώρου, ενώ οι μικρότερες τιμές μετρήθηκαν τους χειμερινούς μήνες ($19.5 \mu\text{g/l} \pm 4.94 \mu\text{g/l}$) (Εικόνα 3.12).



Εικόνα 3.12. Μηνιαία διακύμανση της κλωροφύλλης-α (µg/l) στους τέσσερις σταθμούς δειγματοληψίας της Λίμνης Παμβώτιδας.
Figure 3.12. Monthly variation of chlorophyll-a (µg/l) in sampling stations of Lake Pamvotis.

Η διακύμανση της συγκέντρωσης της φυκοκυανίνης δε διέφερε στατιστικά σημαντικά ανάμεσα στους παρόχθιους και τους πελαγικούς σταθμούς ($P > 0.05$, $F = 0.788$). Εντούτοις, η συγκέντρωση της φυκοκυανίνης διέφερε στατιστικά σημαντικά ανάμεσα στους μήνες ($P < 0.05$, $F = 19.91$). Οι υψηλότερες τιμές της φυκοκυανίνης ($346.64 \mu\text{g/l} \pm 6.49 \mu\text{g/l}$) μετρήθηκαν τον πρώτο μήνα του φθινοπώρου, ενώ οι μικρότερες τιμές μετρήθηκαν τους χειμερινούς μήνες ($12.78 \mu\text{g/l} \pm 3.58 \mu\text{g/l}$) (Εικόνα 3.13).



Εικόνα 3.13. Μηνιαία διακύμανση της φυκοκυανίνης (µg/l) στους τέσσερις σταθμούς δειγματοληψίας της Λίμνης Παμβώτιδας.

Figure 3.13. Monthly variation of phycocyanin (µg/l) in sampling stations of Lake Pamvotis.

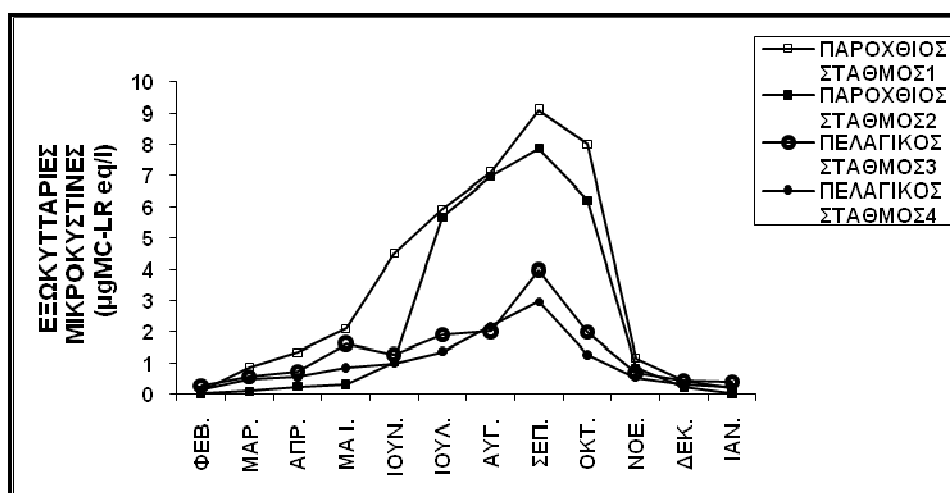
3.4.2 Συγκεντρώσεις μικροκυστινών και συσχέτιση τους με τις περιβαλλοντικές παραμέτρους του νερού

Τα δείγματα του νερού της Λίμνης Παμβώτιδας, εμφάνισαν όλη τη διάρκεια του έτους σημαντικές συγκεντρώσεις ενδοκυττάρων και εξωκυττάρων μικροκυστινών (Εικόνα 3.16). Η συγκέντρωση των ενδοκυττάρων μικροκυστινών, αποτελούσε το 72.94% της συνολικής συγκέντρωσης των μικροκυστινών (ενδοκυττάρων και εξωκυττάρων) της Λίμνης Παμβώτιδας. Επιπλέον, η συνολική συγκέντρωση των μικροκυστινών διέφερε στατιστικά σημαντικά ανάμεσα στους παρόχθιους και τους πελαγικούς σταθμούς ($P < 0.05$, $F = 5.48$), αλλά και ανάμεσα στους μήνες ($P < 0.05$, $F = 5.06$). Οι υψηλότερες τιμές ($23.39 \mu\text{gMC-LReq/l} \pm 1.09 \mu\text{gMC-LReq/l}$) μετρήθηκαν στους παρόχθιους σταθμούς κατά τη διάρκεια των θερινών και φθινοπωρινών μηνών. Οι χαμηλότερες τιμές ($1.16 \mu\text{gMC-LReq/l} \pm 0.24 \mu\text{gMC-LReq/l}$) μετρήθηκαν στους πελαγικούς σταθμούς κατά τη διάρκεια των χειμερινών μηνών.

Η κατανομή των συγκεντρώσεων των εξωκυττάρων μικροκυστινών δε διέφερε στατιστικά σημαντικά ανάμεσα στους πελαγικούς και παρόχθιους σταθμούς ($P > 0.05$, $F = 3.64$). Εντούτοις, η συγκέντρωση των

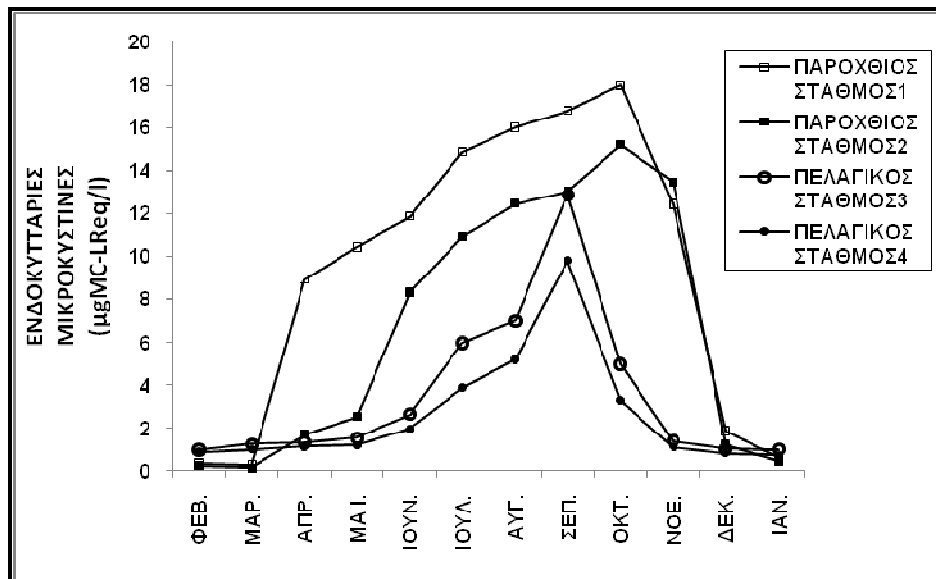
εξωκυττάρων μικροκυστινών διέφερε στατιστικά σημαντικά ανάμεσα στους μήνες ($P < 0.05$, $F = 5.39$). Οι υψηλότερες τιμές ($8.50 \mu\text{gMC-LReq/l} \pm 0.87 \mu\text{gMC-LReq/l}$) μετρήθηκαν κατά τη διάρκεια των θερινών και φθινοπωρινών μηνών, ενώ οι χαμηλότερες τιμές ($0.10 \mu\text{gMC-LReq/l} \pm 0.13 \mu\text{gMC-LReq/l}$) μετρήθηκαν τους χειμερινούς μήνες (Εικόνα 3.14).

Η κατανομή των συγκεντρώσεων των ενδοκυττάρων μικροκυστινών διέφερε στατιστικά σημαντικά ανάμεσα στους πελαγικούς και τους παρόχθιους σταθμούς ($P < 0.05$, $F = 6.00$), αλλά και ανάμεσα στους μήνες ($P < 0.05$, $F = 4.38$). Οι υψηλότερες τιμές ($11.54 \mu\text{gMC-LReq/l} \pm 5.18 \mu\text{gMC-LReq/l}$) μετρήθηκαν στους παρόχθιους σταθμούς κατά τη διάρκεια των θερινών και φθινοπωρινών μηνών, ενώ οι χαμηλότερες τιμές ($0.87 \mu\text{gMC-LReq/l} \pm 0.19 \mu\text{gMC-LReq/l}$) μετρήθηκαν στους πελαγικούς σταθμούς, τους χειμερινούς μήνες (Εικόνα 3.15).



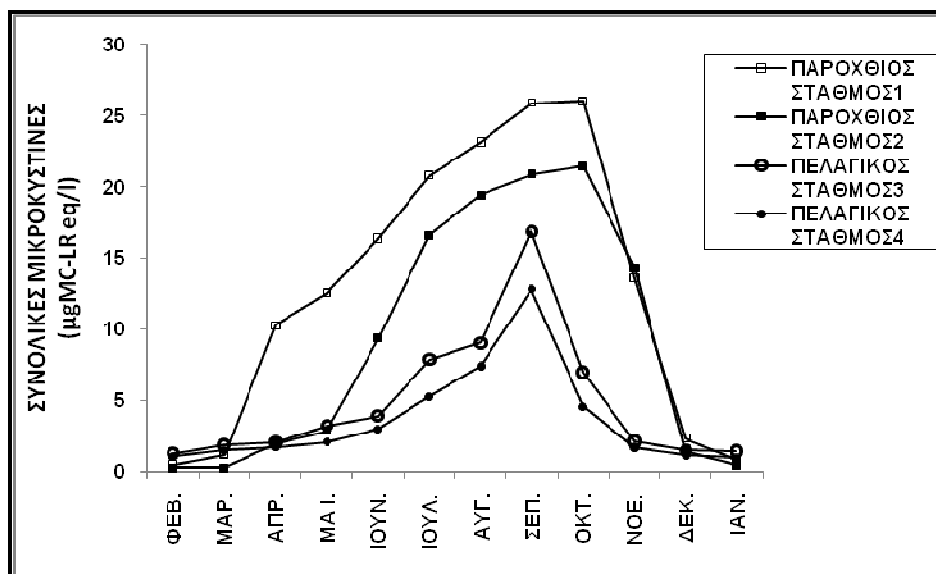
Εικόνα 3.14. Μηνιαία διακύμανση των εξωκυττάρων μικροκυστινών ($\mu\text{gMC-LReq/l}$) στους τέσσερις σταθμούς δειγματοληψίας της Λίμνης Παμβώτιδας.

Figure 3.14. Monthly variation of dissolved microcystins ($\mu\text{gMC-LReq/l}$), in water of sampling stations from Lake Pamvotis.



Εικόνα 3.15. Μηνιαία διακύμανση των ενδοκυττάρων μικροκυστινών ($\mu\text{gMC-LReq/l}$) στους τέσσερις σταθμούς δειγματοληψίας της Λίμνης Παμβώτιδας.

Figure 3.15. Monthly variation of cell-bound microcystins ($\mu\text{gMC-LReq/l}$) in sampling stations of Lake Pamvotis.



Εικόνα 3.16. Μηνιαία διακύμανση των συνολικών μικροκυστινών (ενδοκυττάρων και εξωκυττάρων) ($\mu\text{gMC-LReq/l}$) στους τέσσερις σταθμούς δειγματοληψίας της Λίμνης Παμβώτιδας.

Figure 3.16. Monthly variation of Total microcystins (cell-bound and dissolved in water) in sampling stations of Lake Pamvotis.

Όλες οι περιβαλλοντικές παράμετροι που μελετήθηκαν, με εξαίρεση το pH, εμφάνισαν συσχετίσεις με τις συγκεντρώσεις των ενδοκυττάρων μικροκυστινών και των εξωκυττάρων μικροκυστινών, καθώς και με τη συνολική συγκέντρωση των μικροκυστινών (ενδοκυττάρια και εξωκυττάρια μικροκυστίνες) (Πίνακας 3.1).

Ιδιαίτερα ισχυρή συσχέτιση εμφανίστηκε μεταξύ της συγκέντρωσης των ενδοκυττάρων και των εξωκυττάρων μικροκυστινών. Από τις φυσικοχημικές παραμέτρους, ισχυρές συσχετίσεις με τη συγκέντρωση των ενδοκυττάρων και των εξωκυττάρων μικροκυστινών, καθώς και με τη συνολική συγκέντρωση των μικροκυστινών, εμφάνισαν η θερμοκρασία του νερού και η συγκέντρωση των ορθοφωσφορικών ιόντων. Λιγότερο ισχυρές συσχετίσεις με τις συγκεντρώσεις των μικροκυστινών εμφάνισαν οι συγκεντρώσεις των αζωτούχων ενώσεων και του διαλυμένου οξυγόνου.

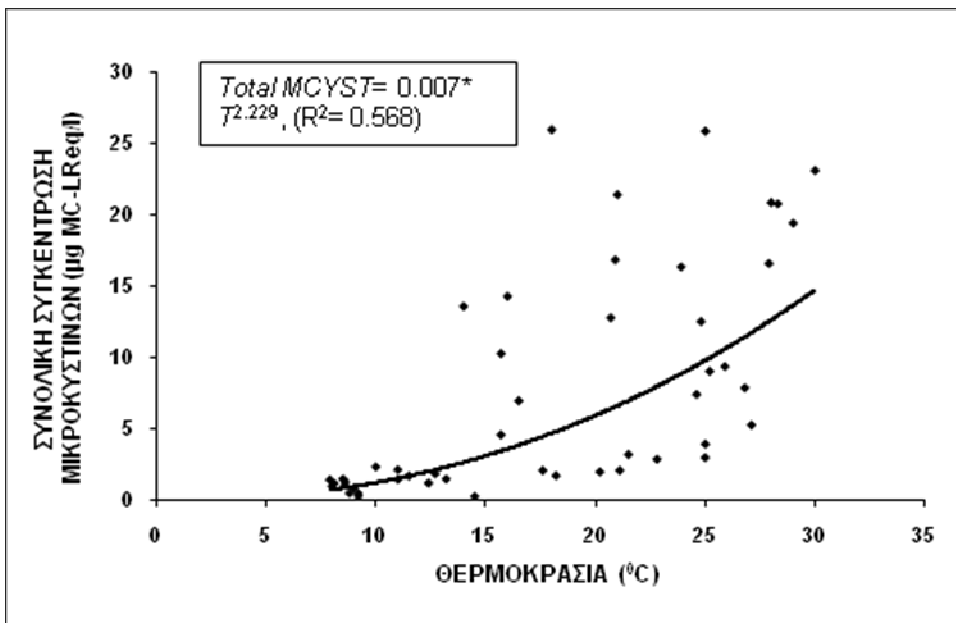
Η συγκέντρωση της χλωροφύλλης-a εμφάνισε ισχυρή συσχέτιση με τη συγκέντρωση των ενδοκυττάρων μικροκυστινών και των εξωκυττάρων μικροκυστινών, καθώς και με τη συνολική συγκέντρωση των μικροκυστινών. Εντούτοις, η συγκέντρωση της φυκοκυανίνης εμφάνισε ισχυρότερες συσχετίσεις με τη συγκέντρωση των ενδοκυττάρων μικροκυστινών, καθώς και με τη συνολική συγκέντρωση των μικροκυστινών. Επιπλέον, ισχυρή συσχέτιση παρατηρήθηκε μεταξύ της συγκέντρωσης της χλωροφύλλης-a και της συγκέντρωσης της φυκοκυανίνης.

Πίνακας 3.1. Ανάλυση συσχέτισης (Spearman) μεταξύ των μικροκυστινών και των περιβαλλοντικών παραμέτρων του νερού, (οι στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις σημειώνονται με έντονη γραφή, $P < 0.05$).

Figure 3.1. Correlation Analysis (Spearman) between Microcystin concentration and environmental parameters (significant correlations in bold, $P < 0.05$).

	PH	ΔΙΑΛΥΜΕΝΟ ΟΞΥΓΟΝΟ	ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑ	N-NO3	N-NO2	N-NH4	P-PO4	ΧΛΩΡ ΟΦΥΛ ΛΗ-α	ΦΥΚΟ ΚΥΑΝ ΙΝΗ	ΕΞ. ΜΙΚΡΟΚ ΥΣΤΙΝΕΣ	ΕΝΔ. ΜΙΚΡΟΚΥΣ ΤΙΝΕΣ	ΣΥΝΟΛΟ ΜΙΚΡΟΚΥΣΤΙΝΩΝ (ΕΞΩΚΥΤΤΑΡΙΕΣ ΚΑΙ ΕΝΔΟΚΥΤΤΑΡΙΕΣ)
ΕΞ. ΜΙΚΡΟΚΥΣΤΙΝΕΣ	0.339	-0.491	0.779	0.316	-0.360	0.542	0.755	0.848	0.781	1	0.887	0.935
ΕΝΔ. ΜΙΚΡΟΚΥΣΤΙΝΕΣ	0.220	-0.619	0.738	0.245	-0.496	0.568	0.705	0.771	0.800	0.887	1	0.990
ΣΥΝΟΛΟ ΜΙΚΡΟΚΥΣΤΙΝΩΝ(ΕΞΩΚΥΤΤΑΡΙΕΣ ΚΑΙ ΕΝΔΟΚΥΤΤΑΡΙΕΣ	0.245	-0.602	0.769	0.292	-0.461	0.576	0.732	0.798	0.805	0.935	0.990	1
ΧΛΩΡΟΦΥΛΛΗ-α	-	-	-	-	-	-	-	1	0.790	0.848	0.771	0.798

Οι περιβαλλοντικές παράμετροι του νερού που εμφάνισαν τις ισχυρότερες συσχετίσεις με τη συνολική συγκέντρωση των μικροκυστινών (εξωκυττάρων και ενδοκυττάρων), εξετάστηκαν και ως προς το είδος της συσχέτισης τους. Στην Εικόνα 3.17, φαίνεται η δυναμική (power) σχέση μεταξύ της θερμοκρασίας του νερού (T) και της συνολικής συγκέντρωσης των μικροκυστινών (Total MCYST). Η παραπάνω σχέση περιγράφεται από την εξίσωση: $Total\ MCYST = 0.007 * T^{2.229}$, ($R^2 = 0.568$).

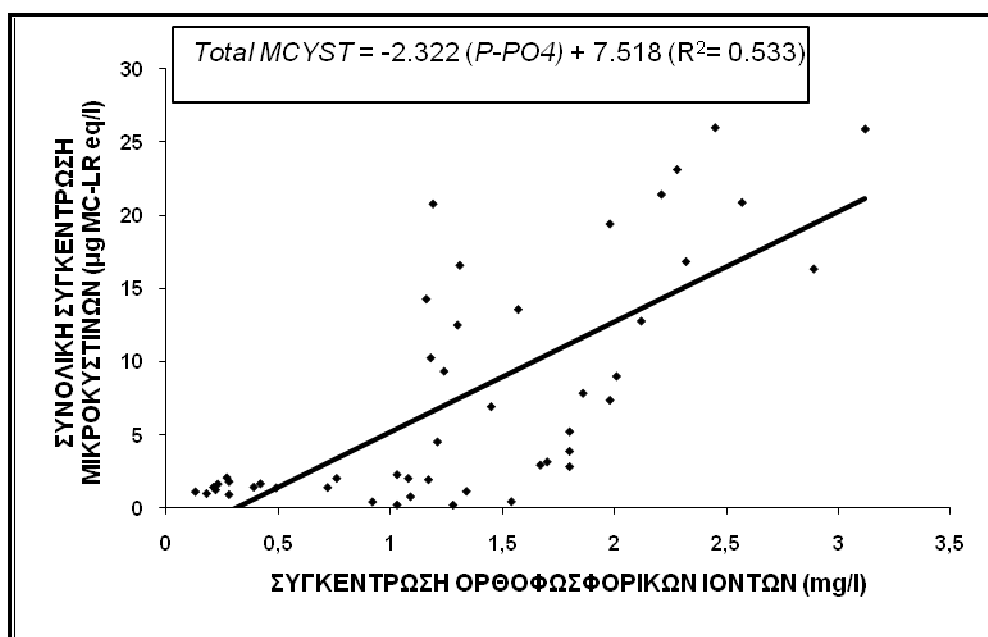


Εικόνα 3.17. Συσχέτιση Θερμοκρασίας (°C) με τη συνολική συγκέντρωση των μικροκυστινών (ενδοκυττάρια και εξωκυττάρια)(µgMCYST-LReq/l).

Figure 3.17. Temperature (°C) in relation to Total Concentration of microcystins (cell-bounded and dissolved in water) (µgMCYST-LReq/l).

Στην Εικόνα 3.18 φαίνεται η γραμμική σχέση μεταξύ της συγκέντρωσης των ορθοφωσφορικών ιόντων (P-PO4) και της συνολικής συγκέντρωσης των μικροκυστινών (Total MCYST). Η παραπάνω σχέση περιγράφεται από την εξίσωση:

$$Total\ MCYST = -2.322 (P-PO4) + 7.518 (R^2 = 0.533)$$

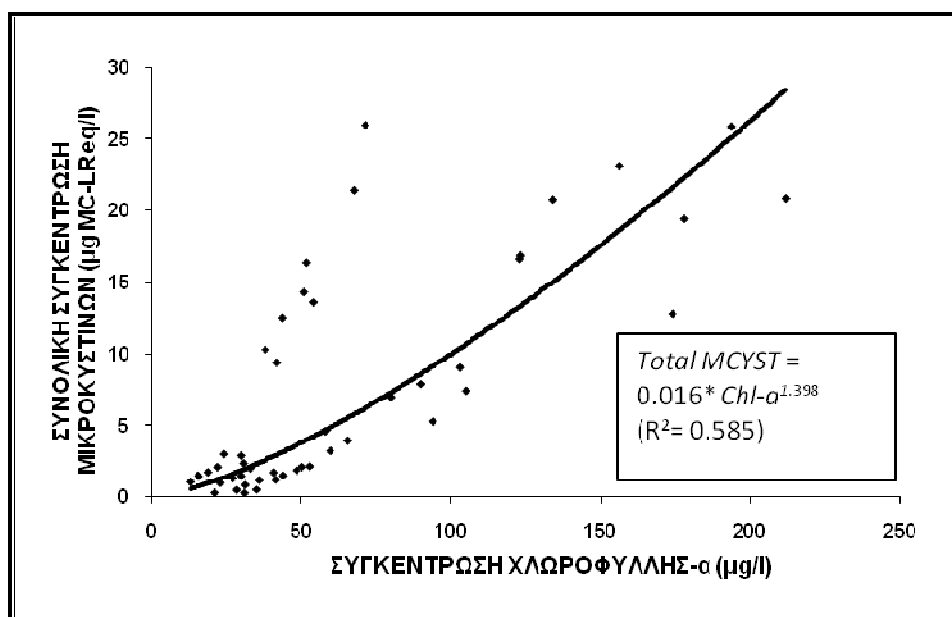


Εικόνα 3.18. Συσχέτιση της συγκέντρωσης των ορθοφωσφορικών ιόντων (mg/l) με τη συνολική συγκέντρωση των μικροκυστινών (ενδοκυττάρια και εξωκυττάρια)(µg MCYST-LReq/l).

Figure 3.18. P-PO4 Concentration (mg/l) in relation to Total Concentration of microcystins (cell-bounded and dissolved in water) (µgMCYST-LReq/l).

Στην Εικόνα 3.19 φαίνεται η δυναμική σχέση μεταξύ της συγκέντρωσης της χλωροφύλλης-α (Chl-a) και της συνολικής συγκέντρωσης των μικροκυστινών (Total MCYST). Η παραπάνω απόκλιση περιγράφεται από την εξής εξίσωση:

$$Total\ MCYST = 0.016 * Chl-a^{1.398} \quad (R^2 = 0.585)$$

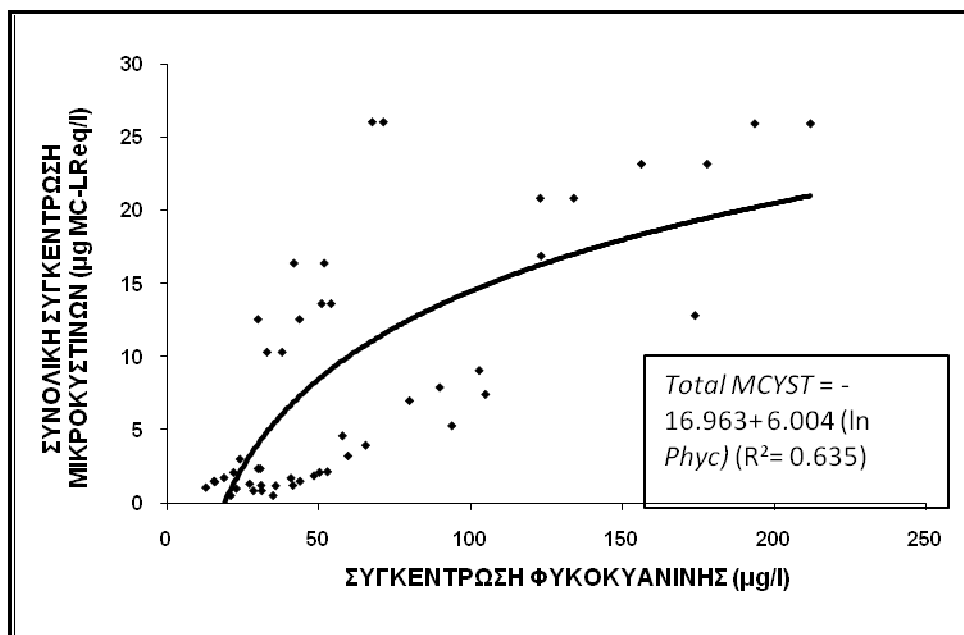


Εικόνα 3.19. Συσχέτιση της συγκέντρωσης της χλωροφύλλης-α (µg/l) με τη συνολική συγκέντρωση των μικροκυστινών (ενδοκυττάριας και εξωκυττάριας)(µgMCYST-LReq/l).

Figure 3.19. Chl-a Concentration (µg/l) in relation to Total Concentration of MCYST-LR eq. (cell-bounded and dissolved in water) (µg/l).

Στην Εικόνα 3.20 φαίνεται η λογαριθμική σχέση μεταξύ της συγκέντρωσης της φυκοκυανίνης (Phyc) και της συνολικής συγκέντρωσης των μικροκυστινών (Total MCYST). Η παραπάνω απόκλιση περιγράφεται από την εξής εξίσωση:

$$Total\ MCYST = -16.963 + 6.004 (\ln Phyc) \quad (R^2 = 0.635)$$



Εικόνα 3.20. Συσχέτιση της συγκέντρωσης της φυκοκυανίνης (µg/l) με τη συνολική συγκέντρωση των μικροκυστινών (ενδοκυττάρια και εξωκυττάρια) (µgMCYST-LReq/l).

Figure 3.20. Phycocyanin Concentration (µg/l) in relation to Total Concentration of microcystins (cell-bounded and dissolved in water) (µgMCYST-LReq/l).

3.5 ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Ο ευτροφισμός της λίμνης, έχει καταγραφεί αρκετά χρόνια πριν με εμφανή τα σημάδια της σημειακής και μη σημειακής ρύπανσης (Anagnostidis & Economou, 1980; Koussouris et al., 1989, Albanis et al., 1986; Kagalou et al., 2001; 2003). Το ευτροφικό επίπεδο της Λίμνης Παμβώτιδας, επιβεβαιώθηκε από τις τιμές των περιβαλλοντικών και βιολογικών παραμέτρων που μετρήθηκαν στο νερό της λίμνης, στην

παρούσα μελέτη. Επιπλέον, συγκρίνοντας τις τιμές της συγκέντρωσης των ανόργανων αζωτούχων ενώσεων που μετρήθηκαν με αυτές των ορθοφωσφορικών ενώσεων, φαίνεται ότι περιοριστικός παράγοντας στο νερό της λίμνης, είναι το άζωτο. Η διακύμανση της στάθμης του νερού, η μείωση της λιμναίας επιφάνειας και η συνεχώς αυξανόμενη χρήση του νερού για άρδευση είναι από τις βασικότερες αιτίες του ευτροφισμού της Λίμνης Παμβώτιδας (Antonopoulos et al., 2008). Κάτω από αυτές τις συνθήκες, η παρουσία και η επικράτηση των κυανοβακτηρίων είναι αναμενόμενη (Tilman, 1986).

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης, τα νηματοειδή κυανοβακτήρια *Anabaena* sp. και *Aphanizomenon* sp. ήταν κυρίαρχα τους πρώτους θερινούς μήνες, οπότε και η συγκέντρωση του αζώτου στο νερό της λίμνης ήταν αισθητά μειωμένη. Τα παραπάνω γένη διαθέτουν ετεροκύτια με τη βοήθεια των οποίων μπορούν να δεσμεύουν το ατμοσφαιρικό άζωτο (Fay, 1992; Gallon, 2001). Εντούτοις, τα κυανοβακτήρια του γένους *Microcystis* είχαν σταθερή παρουσία στο νερό της λίμνης σχεδόν όλο το χρόνο, ενώ κυριαρχούσαν στο τέλος των θερινών μηνών και στις αρχές του φθινοπώρου. Τα κυανοβακτηριακά είδη *Microcystis* sp. δεν έχουν τη δυνατότητα δέσμευσης του ατμοσφαιρικού αζώτου, εντούτοις μπορούν και κυριαρχούν σε λίμνες με χαμηλές συγκεντρώσεις αζώτου (Watanabe et al., 1996). Η κυριαρχία αυτού του είδους, είναι στενά συνδεδεμένη με την ικανότητά του να ζει σε περιβάλλοντα με σταθερή θερμική διαστρωμάτωση, όπως είναι το περιβάλλον της Λίμνης Παμβώτιδας, κατά τη διάρκεια της θερινής περιόδου (Reynolds, 1984; Vardaka et al., 2000; Kagalou et al., 2001).

Τα τοξικά κυανοβακτήρια των γενών *Microcystis* sp. και *Anabaena* sp. έχει αποδειχθεί ότι μπορούν να παράγουν μικροκυστίνες (Carmichael, 1986). Στη Λίμνη Παμβώτιδα, κατά τη διάρκεια της παρούσας μελέτης, εντοπίστηκαν σημαντικές ποσότητες ενδοκυττάρων και εξωκυττάρων μικροκυστινών. Επιπλέον, οι συγκεντρώσεις των ενδοκυττάρων μικροκυστινών ήταν υψηλότερες των εξωκυττάρων μικροκυστινών. Αυτό είναι συνέπεια του γεγονότος ότι οι μικροκυστίνες θεωρούνται ενδοτοξίνες, καθώς η πλειονότητά τους βρίσκεται στο

εσωτερικό των κυττάρων (Shi et al., 1995). Οι μικροκυστινές απελευθερώνονται στο νερό μετά από λύση των κυττάρων ή όταν το κυτταρικό τοίχωμα των κυανοβακτηρίων γίνεται ευάλωτο στην παρουσία χημικών ενώσεων, οι οποίες αναστέλλουν την κυτταρική σύνθεση, ή από τις αντιδράσεις των ενζύμων, ή από τη φωτοσύνθεση ή από φυσιολογικό μαρασμό (Kotak et al., 1996). Τα αποτελέσματα της παρούσας έρευνας που αφορούν την υψηλή συσχέτιση των συγκεντρώσεων των ενδοκυττάρων μικροκυστινών με τις συγκεντρώσεις των εξωκυττάρων μικροκυστινών, είναι σε συμφωνία με τα αποτελέσματα παλαιότερων μελετών των Kagalou et al., (2008). Εντούτοις, οι Zheng et al., (2004) δεν βρήκαν συσχέτιση των ενδοκυττάρων και εξωκυττάρων μικροκυστινών στην εύτροφη Λίμνη Lianhuahe της Κίνας. Τέτοιου είδους διαφορετικά αποτελέσματα ενισχύουν την άποψη ότι η λειτουργία των μικροκυστινών στα κυανοβακτήρια δεν είναι ακόμα γνωστή και εξαρτάται κυρίως από βιοχημικές διαδικασίες (Lam et al., 1995).

Η συνολική συγκέντρωση των μικροκυστινών (ενδοκυττάρων και εξωκυττάρων) είναι αυτή που ενδιαφέρει στα πλαίσια προγραμμάτων παρακολούθησης της κυανοβακτηριακής τοξικότητας των λιμνών. Στη Λίμνη Παμβώτιδα οι τιμές της συνολικής συγκέντρωσης των μικροκυστινών (ενδοκυττάρων και εξωκυττάρων) για το έτος 2008, κυμάνθηκαν από 0.24-23.39 $\mu\text{gMC-LR eq/l}$. Το έτος 2000, σύμφωνα με μελέτες του Gkelis, (2005), η συνολική συγκέντρωση των μικροκυστινών στη Λίμνη Παμβώτιδα κυμάνθηκε από 3.45 -28.85 $\mu\text{gMC-LR eq/l}$, ενώ τον Αύγουστο του ίδιου έτους η παραπάνω συγκέντρωση ξεπέρασε τη τιμή των 3000 $\mu\text{gMC-LR eq/l}$. Επιπλέον, το έτος 2005, η συνολική συγκέντρωση των μικροκυστινών κυμάνθηκε από 3.5-13.5 $\mu\text{gMC-LR eq/l}$ (Kagalou et al., 2008). Από τα παραπάνω φαίνεται ότι η συγκέντρωση των μικροκυστινών στο νερό της λίμνης, είναι δυνατόν να μεταβάλλεται ανάμεσα στα έτη. Οι συγκεντρώσεις των μικροκυστινών στη Λίμνη Παμβώτιδα είναι παραπλήσιες με αντίστοιχες συγκεντρώσεις σε άλλες μεσογειακές χώρες όπως η Τουρκία (1.0-3.65 $\mu\text{gMC-LR eq/l}$) (Albay et al., 2003) και η Πορτογαλία (1.0-37.0 $\mu\text{gMC-LR eq/l}$) (Ueno et al., 1996). Εντούτοις, είναι πολύ υψηλότερες από τις αντίστοιχες

συγκεντρώσεις λιμνών της Γαλλίας (0.5-2 $\mu\text{gMC-LR eq/l}$) (Briand et al., 2002) και της Κορέας (0-0.2 $\mu\text{gMC-LR eq/l}$) (Oh et al., 2001). Υψηλότερες τιμές συγκεντρώσεων μικροκυστινών μετρήθηκαν σε λίμνες της Βραζιλίας (980 $\mu\text{gMC-LR eq/l}$) (Magalhães et al., 2001).

Η διακύμανση της συγκέντρωσης των μικροκυστινών στη Λίμνη Παμβώτιδα φανέρωσε χρονικές και χωρικές διαφορές. Η συγκέντρωση των ενδοκυττάρων μικροκυστινών κυμάνθηκε σε χαμηλές τιμές τους χειμερινούς μήνες, ενώ αυξήθηκε τους θερινούς και φθινοπωρινούς μήνες. Αυτή η αύξηση σχετίζεται με την αύξηση των κυανοβακτηρίων στο νερό της λίμνης κατά τους θερμούς μήνες, όπως αποδείχθηκε από τη διακύμανση της φυκοκυανίνης, η οποία είναι η χαρακτηριστική χρωστική των κυανοβακτηρίων. Οι Rogalus & Watzin (2008), απέδειξαν ότι η προοδευτική άνθηση των κυανοβακτηρίων ευνοεί την ανάπτυξη των τοξικών ειδών, σε σχέση με τα μη τοξικά είδη. Σημαντική αύξηση της συγκέντρωσης των μικροκυστινών τους θερμούς μήνες παρατηρήθηκε επίσης στη Λίμνη Daechung της Κορέας (Oh et al., 2001) αλλά και στη Λίμνη Sulejow της Πολωνίας (Izydorczyk et al., 2008). Το ίδιο πρότυπο διακύμανσης ακολούθησε και η συγκέντρωση των εξωκυττάρων μικροκυστινών. Η απότομη αύξηση της συγκέντρωσης των εξωκυττάρων μικροκυστινών τους πρώτους φθινοπωρινούς μήνες, είναι αποτέλεσμα της λύσης των κυανοβακτηριακών κυττάρων (Park et al., 1998; Fromme, 2000).

Οι χωρικές διαφορές της συγκέντρωσης των μικροκυστινών σχετίζονταν με την πελαγική και την παρόχθια ζώνη της λίμνης. Η συνολική συγκέντρωση των μικροκυστινών στη Λίμνη Παμβώτιδα ήταν υψηλότερη στους παρόχθιους σταθμούς σε σχέση με τους πελαγικούς. Τα κυανοβακτηριακά γένη *Microcystis* και *Anabaena*, τα οποία ταυτοποιήθηκαν στη Λίμνη Παμβώτιδα, χαρακτηρίζονται από την ικανότητά τους να δημιουργούν μεγάλους πληθυσμούς στην παρόχθια ζώνη των λιμνών (Hotto et al., 2005). Οι Hotto et al., (2008), παρατήρησαν επίσης υψηλότερες συγκεντρώσεις μικροκυστινών στην παρόχθια ζώνη της Λίμνης Oneida Lake στη Νέα Υόρκη. Οι μελέτες που αφορούν τη χωρική διακύμανση των μικροκυστινών μιας λίμνης είναι

περιορισμένες και αυτό γιατί δίνεται ιδιαίτερη προσοχή στις παρόχθιες περιοχές, οι οποίες συγκεντρώνουν τον υψηλότερο όγκο κυανοβακτηρίων και συνήθως αποτελούν περιοχές αναψυχής (Rogalus & Watzin, 2008). Εντούτοις από τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης φαίνεται ότι οι μικροκυστίνες είναι παρούσες και στις πελαγικές περιοχές, ήδη από τους χειμερινούς μήνες. Αυτό το γεγονός σε συνδυασμό με τις σταθερότερες περιβαλλοντικές συνθήκες που συνήθως επικρατούν στις πελαγικές περιοχές υποστηρίζει την αξία της παρακολούθησης των μικροκυστινών και στις πελαγικές περιοχές.

Στην παρούσα ενότητα έγινε προσπάθεια συσχέτισης των αβιοτικών καθώς και ορισμένων βιολογικών παραγόντων με τη συνολική συγκέντρωση των μικροκυστινών στη Λίμνη Παμβώτιδα. Οι περιβαλλοντικές συνθήκες επηρεάζουν την άνθηση των κυανοβακτηρίων, αλλά και το ρυθμό παραγωγής των μικροκυστινών στο εσωτερικό των κυανοβακτηριακών κυττάρων (Orr & Jones, 1998; Kurmayer et al., 2002, 2003). Οι αβιοτικοί παράγοντες όπως η αυξημένη θερμοκρασία, η διαστρωμάτωση του νερού, οι αυξημένες συγκεντρώσεις φωσφόρου, η διαφάνεια και η ένταση του φωτός επάγουν την παρουσία και την παραμονή των κυανοβακτηρίων στο νερό των υδάτινων οικοσυστημάτων (Briand et al., 2003).

Στη Λίμνη Παμβώτιδα βρέθηκαν ενδιαφέρουσες συσχετίσεις μεταξύ της συνολικής συγκέντρωσης των μικροκυστινών και των αβιοτικών παραγόντων. Οι συγκεντρώσεις των ορθοφωσφορικών ιόντων έδειξαν ισχυρή θετική συσχέτιση με τη συγκέντρωση των μικροκυστινών. Οι Jacoby et al., (2000), παρατήρησαν ότι το κυανοβακτήριο *Microcystis aeruginosa* εμφάνιζε μεγαλύτερο ρυθμό αύξησης όταν στην καλλιέργειά του προστίθονταν υψηλές συγκεντρώσεις φωσφόρου. Επίσης, σύμφωνα με εργαστηριακές μελέτες των Oh et al., (2000), η αύξηση της συγκέντρωσης του φωσφόρου στην καλλιέργεια του τοξικού κυανοβακτηρίου *M. aeruginosa* είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση της παραγωγής μικροκυστινών από το κυανοβακτήριο. Οι Rapala et al., (1997), υποστήριξαν ότι οι συγκεντρώσεις του φωσφόρου ενισχύουν την

αύξηση των κυανοβακτηρίων και την παραγωγή των μικροκυστινών σε όλα τα τοξικά γένη των κυανοβακτηρίων.

Η συγκέντρωση των μικροκυστινών στη Λίμνη Παμβώτιδα εμφάνισε επίσης ισχυρή θετική συσχέτιση με τη θερμοκρασία του νερού. Οι Izydorczyk et al., (2009), παρατήρησαν ισχυρή συσχέτιση μεταξύ της συγκέντρωσης των μικροκυστινών στη Λίμνη Sulejow της Πολωνίας και της θερμοκρασίας του νερού. Οι ίδιοι υποστήριξαν ότι η θερμοκρασία επηρεάζει εμμέσως τη συγκέντρωση των μικροκυστινών, αυξάνοντας τον όγκο των τοξικών κυανοβακτηρίων. Επίσης, η θερμοκρασία φαίνεται να επηρέασε θετικά την παραγωγή μικροκυστινών στη Λίμνη Taihu της Κίνας (Shen et al., 2003) και στη Λίμνη de Bay των Φιλιππίνων (Baldia et al., 2003).

Ασθενέστερες συσχετίσεις εμφανίστηκαν μεταξύ της συγκέντρωσης των μικροκυστινών της Λίμνης Παμβώτιδας και των ανόργανων αζωτούχων ενώσεων καθώς και του διαλυμένου οξυγόνου. Τα αποτελέσματα μελετών που αφορούν τη συσχέτιση των αζωτούχων ενώσεων με τη συγκέντρωση των μικροκυστινών πολλές φορές είναι αντικρουόμενα (Kotak et al., 1995; Oh et al., 2000). Η διαθεσιμότητα του αζώτου είναι σημαντική για την παραγωγή των μικροκυστινών καθώς το άζωτο αποτελεί βασικό στοιχείο για τη σύνθεση των πρωτεϊνών. Τα αποτελέσματα πολλών εργαστηριακών μελετών απέδειξαν ότι η παραγωγή των μικροκυστινών από το κυανοβακτήριο *M. aeruginosa* συσχετίζονταν θετικά με τη συγκέντρωση των αζωτούχων ενώσεων στο θρεπτικό διάλυμα (Watanabe & Oishi, 1985; Lee et al., 2000). Εντούτοις, οι Kotak et al., (2000), βασιζόμενοι σε εργαστηριακά πειράματα υποστήριξαν ότι η παραγωγή των μικροκυστινών στα κυανοβακτηριακά κύτταρα δεν σχετίζεται με τις συγκεντρώσεις του αζώτου. Στη Λίμνη Xingyun της Κίνας, οι συγκεντρώσεις των αζωτούχων ενώσεων επηρέασαν θετικά τη συγκέντρωση των μικροκυστινών στο νερό της λίμνης. Αντιθέτως, στη Λίμνη Oneida της Νέας Υόρκης δεν παρατηρήθηκε συσχέτιση της συγκέντρωσης των μικροκυστινών με τις συγκεντρώσεις των αζωτούχων ενώσεων (Hotto et al., 2008). Η αρνητική συσχέτιση της συγκέντρωσης των μικροκυστινών της Λίμνης Παμβώτιδας

με τη συγκέντρωση του διαλυμένου οξυγόνου οφείλεται στην αύξηση των κυανοβακτηρίων. Η άνθηση των κυανοβακτηρίων οδηγεί σε μείωση του διαλυμένου οξυγόνου της λίμνης μέσω της αύξησης της συγκέντρωσης του οργανικού υλικού στη στήλη του νερού (Robarts et al., 2005).

Όσον αφορά τους βιολογικούς παράγοντες, ισχυρή συσχέτιση εμφανίστηκε μεταξύ της χλωροφύλλης-α και της συγκέντρωσης των μικροκυστινών. Το ίδιο ισχυρή συσχέτιση βρέθηκε και από τους Oh et al. (2001), οι οποίοι μέτρησαν τη συγκέντρωση της χλωροφύλλης-α ($0.59\text{mg}/\text{m}^3$) και τη συγκέντρωση των μικροκυστινών (50 to 240 ng/l) σε μια εύτροφη λίμνη της Κορέας, στην οποία κυριαρχούσαν τοξικά κυανοβακτήρια του γένους *Microcystis* spp. Επίσης, οι Wu et al., (2006), βρήκαν σημαντική συσχέτιση μεταξύ της συγκέντρωσης της χλωροφύλλης-α και της συγκέντρωσης των μικροκυστινών σε 30 ρηχές λίμνες της Κίνας.

Σύμφωνα με τον Παγκόσμιο οργανισμό υγείας (W.H.O.,1998), η μέτρηση της συγκέντρωσης της χλωροφύλλης-α θεωρείται χρήσιμο εργαλείο για την παρακολούθηση της κυανοβακτηριακής άνθησης. Εντούτοις, η μέτρηση της χλωροφύλλης-α δεν μπορεί να διαχωρίσει τους κυανοβακτηριακούς πληθυσμούς από τους ευκαρυωτικούς φυτοπλακτονικούς οργανισμούς (Izydorczyk et al., 2005). Τα τελευταία χρόνια, η φυκοκυανίνη χρησιμοποιείται όλο και πιο συχνά ως εργαλείο παρακολούθησης των κυανοβακτηριακών πληθυσμών (Ahn et al., 2002; Vincent et al., 2004). Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης, η συγκέντρωση της φυκοκυανίνης εμφάνισε ισχυρή συσχέτιση με τη συγκέντρωση των μικροκυστινών της Λίμνης Παμβώτιδας. Επιπλέον, αυτή η συσχέτιση ήταν πολύ πιο ισχυρή από τη συσχέτιση της συγκέντρωσης των μικροκυστινών με τη συγκέντρωση της χλωροφύλλης-α. Οι Izydorczyk et al., (2005), επίσης παρατήρησαν ισχυρή συσχέτιση της συγκέντρωσης της φυκοκυανίνης με τη συγκέντρωση των μικροκυστινών στη Λίμνη Sulejow της Πολωνίας. Εντούτοις, οι ίδιοι ερευνητές παρατήρησαν ισχυρότερη συσχέτιση της συγκέντρωσης των μικροκυστινών με τον αριθμό των τοξικών κυανοβακτηρίων. Αυτή η ισχυρότερη συσχέτιση μπορεί να εξηγηθεί από το γεγονός ότι σε μια

λίμνη είναι παρόντα ταυτόχρονα τοξικά και μη τοξικά κυανοβακτηριακά είδη (Izydorczyk et al., 2005).

Ο συνεχής έλεγχος της συγκέντρωσης των μικροκυστινών είναι επιτακτικός για τα υδάτινα οικοσυστήματα που χαρακτηρίζονται από την παρουσία τοξικών κυανοβακτηρίων, προκειμένου να διασφαλιστεί η σωστή λειτουργία του οικοσυστήματος και να προασπιστεί η δημόσια υγεία. Ο καλύτερος έλεγχος στηρίζεται στην μέτρηση της συγκέντρωσης των μικροκυστινών σε συνδυασμό με τη μέτρηση της αφθονίας των τοξικών κυανοβακτηρίων. Η συγκέντρωση των ορθοφωσφορικών ιόντων, της χλωροφύλλης-α, της φυκοκυανίνης καθώς και η θερμοκρασία, θα μπορούσαν να είναι συμπληρωματικές ενδείξεις για τη συγκέντρωση των μικροκυστινών στο νερό της Λίμνης Παμβώτιδας.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

Συσσώρευση μικροκυστινών στο νερό και τους ιστούς του ιχθύος
Carassius gibelio, δεκατριών εσωτερικών υδάτινων οικοσυστημάτων της
Ελλάδος



4.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η άνθηση των κυανοβακτηρίων σε πολλές λίμνες είναι συνέπεια της αστικοποίησης και των καλλιεργητικών τεχνικών που συνεχώς αναπτύσσονται στον ελληνικό χώρο. Η παρουσία κυανοβακτηριακών αθροίσεων στα ελληνικά εσωτερικά ύδατα αναφέρθηκε για πρώτη φορά το 1987 (Lanaras et al., 1989). Οι πληροφορίες σχετικά με τη σύσταση και την τοξικότητα των κυανοβακτηρίων στις ελληνικές λίμνες είναι ελάχιστες (Cook et al., 2004;2005; Vardaka et al., 2005; Gkelis et al., 2005). Ελάχιστες είναι επίσης και οι γνώσεις σχετικά με την παρουσία των μικροκυστινών στους υδρόβιους οργανισμούς της Ελλάδος (Gkelis et al., 2006; Kagalou et al., 2008; Papadimitriou et al., 2009), αλλά και ευρύτερα, της Μεσογείου (Mohamed et al., 2003).

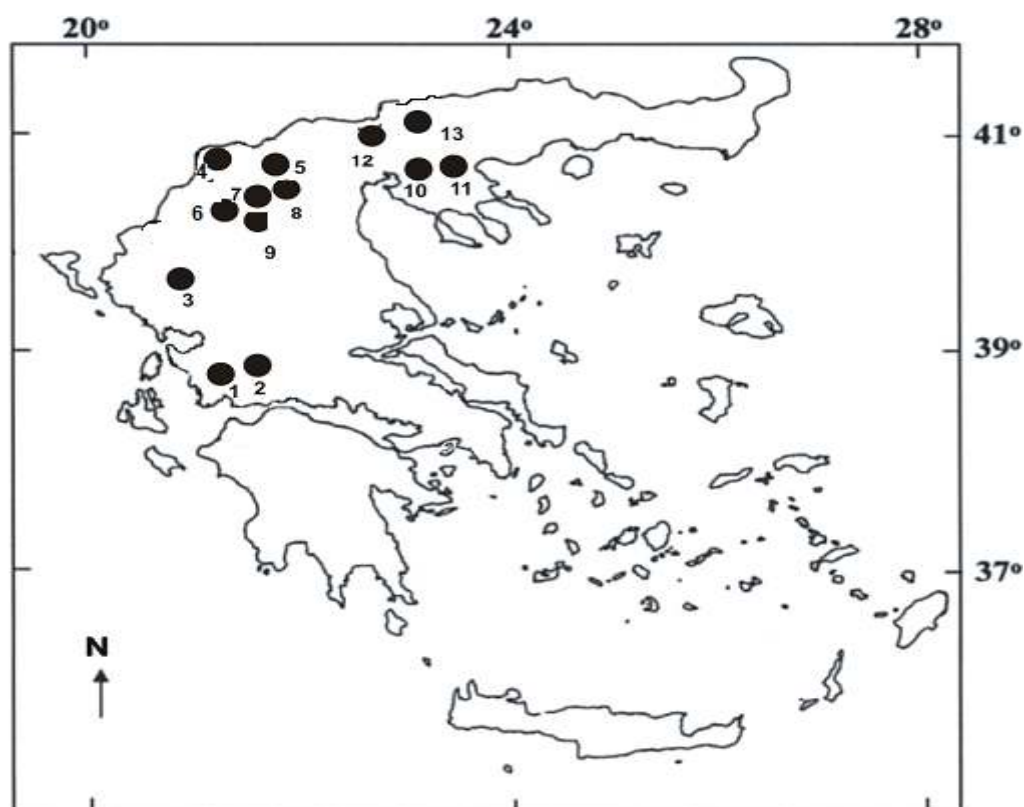
Τα υδάτινα οικοσυστήματα τα οποία είναι επιβαρυμένα με μικροκυστίνες, αποτελούν απειλή ως προς τη διαβίωση πολλών οργανισμών. Οι υδρόβιοι οργανισμοί είναι οι πρώτοι που εκτίθενται στην τοξική επίδραση των μικροκυστινών (Ernst, 2008). Συγκεντρώσεις μικροκυστινών έχουν ανιχνευθεί σε διάφορα είδη ιχθύων προερχόμενα από υδάτινα οικοσυστήματα πολλών χωρών (Ernst et al., 2001; Magalhães et al., 2001; Sipiä et al., 2001).

Στην παρούσα ενότητα, πραγματοποιήθηκαν δειγματοληψίες νερού και ιχθύων του είδους *Carassius gibelio* από ένα μεγάλο αριθμό (13) εσωτερικών υδάτινων οικοσυστημάτων της Ελλάδας διαφορετικής τυπολογίας και επιπέδου ευτροφισμού. Σκοπός της παρούσας μελέτης, ήταν η διερεύνηση της παρουσίας των μικροκυστινών στο νερό και στους ιστούς του ιχθύος *Carassius gibelio*.

4.2 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

4.2.1 Υδάτινα οικοσυστήματα μελέτης

Δώδεκα (12) φυσικές λίμνες και ένας (1) τεχνητός ταμιευτήρας νερού διερευνήθηκαν ως προς την παρουσία ενδοκυττάρων και εξωκυττάρων μικροκυστινών στο νερό, καθώς και σε ιστούς του ιχθύος *Carassius gibelio* (Εικόνα 4.1).



Εικόνα 4.1. Γεωγραφική θέση 13 υδάτινων συστημάτων της ηπειρωτικής Ελλάδας που διερευνήθηκαν ως προς την παρουσία μικροκυστινών. Οι αριθμοί από 1 ως 13 αντιστοιχούν ως εξής: Λίμνη Λυσιμαχία (1), Λίμνη Τριχωνίδα(2), Λίμνη Παμβώτιδα (3), Λίμνη Μικρή Πρέσπα (4), Λίμνη Βεγοριτιδα (5), Λίμνη Καστοριά (6), Λίμνη Ζάζαρη (7), Λίμνη Πετρών (8), Λίμνη Χειμαδίτιδα (9), Λίμνη Κορώνεια (10), Λίμνη Βόλβη (11), Λίμνη Δοϊράνη (12), τεχνητός ταμιευτήρας νερού Κερκίνης (13).

Figure 4.1. The major Greek Lakes examined for microcystin concentrations. Trichonis (1), Lysimachia (2), Pamvotis (3), Mikri Prespa (4), Vegoritida (5), Kastoria (6), Zazari (7), Petron (8), Chimaditis (9), Koronia (10), Volvi (11), Doirani (12), Kerkini (13).

Τα δεκατρία υδάτινα οικοσυστήματα που διερευνήθηκαν ως προς την παρουσία των μικροκυστινών, ανήκουν στην Κεντρική και Βόρεια Ελλάδα (Εικόνα 4.1). Η επιλογή των οικοσυστημάτων βασίστηκε στα εξής κριτήρια: στη χρήση του νερού τους, στην οικιστική τους ανάπτυξη, στην οικολογική τους αξία και στη τροφική τους κατάσταση.

Η Λίμνη Τριχωνίδα είναι μία καρστική λίμνη, με μέσο βάθος 30.3m και έκταση 99 km² (Daoulas et al.,1993; Kagalou & Leonardos,

2009; Zacharias et al., 2002). Η λίμνη παρουσιάζει χαμηλές συγκεντρώσεις χλωροφύλλης και διατηρεί χαμηλή, επί του παρόντος, τροφική κατάσταση. Αν και από πλευράς συγκέντρωσης χλωροφύλλης η Τριχωνίδα εξακολουθεί να κατατάσσεται στις oligοτροφικές λίμνες, υπάρχουν ενδείξεις ότι παρουσιάζει τάση μετάβασης προς τη μεσοτροφική κατάσταση με περιοριστικό παράγοντα το φώσφορο (Psilonikos et al., 1995; Zacharias et al., 2002). Ενδεικτική της οικολογικής σημασίας της Τριχωνίδας είναι η ενδημική ιχθυοπανίδα της (Economidis, 1991; Economou et al., 1994), τα νέα είδη μαλακίων και τα ενδημικά νέα είδη διατόμων, χρυσοφυκών και κυανοβακτηρίων (Tafas and Economou-Amilli, 1997). Σε ότι αφορά την ιχθυοπανίδα είναι μια από τις πλέον σημαντικές της Ελλάδας. Ένα από τα πλέον ενδιαφέροντα είδη είναι ο Νανογοβιός που ζει μόνο στην Τριχωνίδα και πουθενά αλλού στον κόσμο (ενδημικό) (Economidis, 1991) και πρόκειται μάλλον για το μικρότερο είδος των εσωτερικών υδάτων της Ευρώπης. Από τα είδη ιχθύων που ζουν στη Τριχωνίδα, οκτώ (*Rutilus ylikiensis*, *Barbus albanicus*, *Barbus peloponnesius*, *Phoxinellus pleurobipunctatus*, *Cobitis trichonica*, *Economidichthys pygmaeus*, *Silurus aristotelis*, *Salmo trutta macrostigma*) περιλαμβάνονται στη κοινοτική οδηγία 92/43/ΕΟΚ, οκτώ (*Rutilus ylikiensis*, *Pseudophoxinus stymphalicus*, *Barbus peloponnesius*, *Cobitis trichonica*, *Economidichthys pygmaeus*, *Silurus aristotelis*, *Silurus glanis*, *Salaria fluviatilis*) είναι προστατευόμενα είδη σύμφωνα με την συνθήκη της Βέρνης και δέκα (*Rutilus ylikiensis*, *Leuciscus cephalus*, *Pseudophoxinus stymphalicus*, *Barbus albanicus*, *Barbus peloponnesius*, *Phoxinellus pleurobipunctatus*, *Cobitis trichonica*, *Economidichthys pygmaeus*, *Economidichthys trichonis*, *Salaria economidis*) περιλαμβάνονται στο Κόκκινο Βιβλίο ως τοπικά απειλούμενα είδη (Economidis, 1991). Το νερό της Λίμνης Τριχωνίδας χρησιμοποιείται για αρδευτικούς, ψυχαγωγικούς και βιομηχανικούς σκοπούς, ενώ ασκείται και έντονη αλιευτική δραστηριότητα (Kagalou & Leonardos, 2009).

Η Λυσιμαχία είναι μια λίμνη έκτασης 13 km² και μέσου βάθους 3.9 m (Kagalou & Leonardos, 2009; Zacharias et al., 2002). Πρόκειται για μια θερμή, μονομικτική λίμνη η οποία παρουσιάζει χαμηλότερη ποιότητα νερού από τη Λίμνη Τριχωνίδα (μεγαλύτερες συγκεντρώσεις θρεπτικών και κυρίως νιτρικών, με αυξητική τάση διαχρονικά) (Hadjibiros et al., 1997; Zacharias et al., 2002). Στο παρελθόν η λίμνη ήταν ολιγοτροφική. Το επίπεδο των θρεπτικών συστατικών, αλλά και οι συγκεντρώσεις φυτοπλαγκτού την κατατάσσουν σήμερα στις ευτροφικές έως υπερτροφικές λίμνες με περιοριστικό παράγοντα τον φώσφορο (Skoulikidis et al., 1998; Zacharias et al., 2002). Σε αντίθεση με τις άλλες λίμνες της Αιτωλοακαρνανίας, η Λίμνη Λυσιμαχία αντιμετωπίζει σοβαρή ρύπανση από αστικά απόβλητα και αγροτικές δραστηριότητες. Σήμερα, έχουν περιοριστεί οι εισροές από αστικά λύματα, ιδιαίτερα μετά την λειτουργία της μονάδας επεξεργασίας λυμάτων της πόλης του Αγρινίου, αλλά παραμένουν οι αγροτικές δραστηριότητες. Η επιβάρυνση θα ήταν πολύ μεγαλύτερη αν δεν υπήρχε η είσοδος μεγάλων όγκων καθαρού νερού από την Τριχωνίδα, που προκαλεί αραιώση και απομάκρυνση των ρύπων. Από τα είδη ιχθύων που ζουν στη Λυσιμαχία, επτά (*Rutilus ylikiensis*, *Barbus albanicus*, *Phoxinellus pleurobipunctatus*, *Salmo trutta macrostigma*, *Cobitis trichonica*, *Economidichthys pygmaeus*, *Silurus aristotelis*) περιλαμβάνονται στη κοινοτική οδηγία 92/43/ΕΟΚ, έξι (*Rutilus ylikiensis*, *Pseudophoxinus stymphalicus*, *Cobitis trichonica*, *Economidichthys pygmaeus*, *Silurus aristotelis*, *Salaria fluviatilis*) από αυτά είναι προστατευόμενα είδη σύμφωνα με την συνθήκη της Βέρνης και έξι (*Leuciscus cephalus*, *Pseudophoxinus stymphalicus*, *Barbus albanicus*, *Phoxinellus pleurobipunctatus*, *Cobitis trichonica*, *Economidichthys pygmaeus*) περιλαμβάνονται στο Κόκκινο Βιβλίο σαν τοπικά απειλούμενα είδη (Economidis, 1991). Το νερό της Λίμνης Λυσιμαχίας χρησιμοποιείται για άρδευση, ενώ ασκείται και έντονη αλιευτική δραστηριότητα (Kagalou & Leonardos, 2009).

Η Λίμνη Μικρή Πρέσπα έχει έκταση περίπου 49 km² και μέσο βάθος 4.1 m (Kagalou & Leonardos, 2009; Zacharias et al., 2002). Ο

λόγος των στοιχείων άζωτο:φώσφορος κυμαίνεται σε υψηλά επίπεδα, ενώ ο φωσφόρος είναι ο περιοριστικός παράγοντας (Zacharias et al., 2002). Οι συγκεντρώσεις χλωροφύλλης στη λίμνη εμπίπτουν στα όρια των εύτροφων έως υπερτροφικών λιμνών (Kagalou & Leonardos, 2009; Zacharias et al., 2002). Το νερό της Λίμνης Μικρής Πρέσπας χρησιμοποιείται για αρδευτικούς, ψυχαγωγικούς σκοπούς, ενώ ασκείται και αλιευτική δραστηριότητα (Kagalou & Leonardos, 2009). Είναι λίμνη μεγάλης οικολογικής αξίας καθώς έχει πλούσια ιχθυοπανίδα. Πέντε είδη ιχθύων (*Rutilus prespensis*, *Phoxinellus prespensis*, *Barbus prespensis*, *Chalcarburnus belvica*, *Cobitis meridionalis*) που ζουν στη λίμνη περιλαμβάνονται στην Οδηγία 92/43/ΕΟΚ, τέσσερα (*Barbus prespensis*, *Pseudophoxinus stymphalicus*, *Alburnoides bipunctatus*, *Cobitis meridionalis*) προστατεύονται από τη συνθήκη της Βέρνης ενώ τρία είδη ιχθύων (*Leuciscus cephalus*, *Barbus prespensis*, *Pseudophoxinus stymphalicus*) αναφέρονται στο Κόκκινο Βιβλίο (Karandinos 1992).

Η Λίμνη της Καστοριάς είναι μια ρηχή καρστική λίμνη με μέση επιφάνεια 27 km² και μέσο βάθος 4,8 m (Zacharias et al., 2002). Η λίμνη κατατάσσεται στις εύτροφες και το καλοκαίρι παρατηρούνται στον πυθμένα της ανοξικές συνθήκες (Vardaka et al., 2000; Moustaka-Gouni et al., 2006). Η κατάσταση της λίμνης επιδεινώθηκε τις τελευταίες δεκαετίες, όσον αφορά τον ευτροφισμό, κάτι που οφείλεται κυρίως στα αστικά λύματα που κατέληγαν μέχρι το 1990 απευθείας στη λίμνη. Μετά την λειτουργία της μονάδας επεξεργασίας λυμάτων της πόλης της Καστοριάς μειώθηκε η επιβάρυνση όσο αφορά τα αστικά λύματα, αλλά παραμένει η επιβάρυνση από αγροτικές δραστηριότητες. Το ίζημα της λίμνης είναι πλούσιο σε οργανική ύλη και ενώσεις φωσφόρου που σε συνδυασμό με τις υψηλές θερμοκρασίες το καλοκαίρι και το μικρό βάθος της λίμνης συμβάλλουν στην απελευθέρωση του φωσφόρου (Vardaka et al., 2000; Moustaka-Gouni et al., 2006). Ο φωσφόρος δρα ως περιοριστικός παράγοντας (Zacharia et al., 2002). Η λίμνη έχει προταθεί ως περιοχή κοινοτικού ενδιαφέροντος στο δίκτυο NATURA 2000 (Dafis et al., 1997). Ένα είδος ιχθύος (*Leuciscus cephalus*) που ζει

στη λίμνη αναφέρεται στο Κόκκινο Βιβλίο και ένα ακόμη είδος ιχθύος (*Silurus glanis*) προστατεύεται από τη συνθήκη της Βέρνης (Economididis, 1991). Το νερό της Λίμνης Καστοριάς χρησιμοποιείται για αρδευτικούς και ψυχαγωγικούς σκοπούς, ενώ ασκείται έντονη αλιευτική δραστηριότητα (Kagalou & Leonardos, 2009).

Η Λίμνη Βεγορίτιδα έχει έκταση 40 km² (Dafis et al., 1997) και το μέσο βάθος της είναι 29m (Skoulikidis et.al., 1998). Η λίμνη βρίσκεται σε βιομηχανοποιημένη και κατοικημένη περιοχή και κατατάσσεται στις μεσότροφες λίμνες (Stefouli et al., 2005). Η λίμνη Βεγορίτιδα έχει προταθεί ως περιοχή κοινοτικού ενδιαφέροντος στο δίκτυο NATURA 2000. Δύο είδη ιχθύων (*Coregonus laveratus*, *Barbus peloponnesius*) που ζουν στη λίμνη περιλαμβάνονται στην Οδηγία 92/43/ΕΟΚ, τρία (*Coregonus laveratus*, *Barbus peloponnesius*, *Silurus glanis*) προστατεύονται από τη συνθήκη της Βέρνης ενώ δύο είδη ιχθύων (*Leuciscus cephalus*, *Barbus peloponnesius*) αναφέρονται στο Κόκκινο Βιβλίο (Economididis, 1991). Το νερό της Λίμνης Βεγορίτιδας χρησιμοποιείται για αρδευτικούς, ψυχαγωγικούς και υδροηλεκτρικούς σκοπούς, ενώ ασκείται και αλιευτική δραστηριότητα (Kagalou & Leonardos, 2009).

Η Λίμνη Χειμαδίτιδα έχει μέσο βάθος 1.2 m και έκταση 11 km² και είναι μια εύτροφη λίμνη (Kagalou & Leonardos, 2009, Zacharias et al., 2002; Tsoumani et al., 2006). Οι κυριότεροι παράγοντες που επηρεάζουν αρνητικά το οικοσύστημα είναι η υπεράντληση νερών για τις καλλιεργούμενες εκτάσεις της περιοχής και για τις δραστηριότητες της ΔΕΗ, τα αστικά λύματα και τα βιομηχανικά απόβλητα της περιοχής καθώς επίσης και τα αγροχημικά που καταλήγουν μέσω του αποστραγγιστικού δικτύου στη λίμνη. Η λίμνη έχει αυξημένες συγκεντρώσεις θρεπτικών συστατικών (Skoulikidis et.al., 1998; Zacharias et al., 2002). Η Λίμνη Χειμαδίτιδα αποτελεί περιοχή του δικτύου NATURA 2000 (Dafis et al., 1996) και συγκαταλέγεται στον κατάλογο των σημαντικών βιοτόπων της Ελλάδας όπως αυτοί καταγράφηκαν στο CORINE BIOTOPE PROJECT (1989). Επίσης έχει προταθεί να συμπεριληφθεί στο δίκτυο ειδικής προστασίας (SPAS)

(Tsiouris, 1996). Δύο είδη ιχθύων (*Barbus peloponnesius*, *Rhodeus amarus*) που ζουν στη λίμνη περιλαμβάνονται στην Οδηγία 92/43/ΕΟΚ, τρία (*Barbus peloponnesius*, *Rhodeus amarus*, *Silurus glanis*) προστατεύονται από τη συνθήκη της Βέρνης ενώ δύο είδη ιχθύων (*Pachychilon macedonicum*, *Barbus peloponnesius*) αναφέρονται στο Κόκκινο Βιβλίο (Economidis, 1991). Το νερό της Λίμνης Χειμαδίτιδας χρησιμοποιείται για αρδευτικούς σκοπούς, ενώ ασκείται αλιευτική δραστηριότητα (Kagalou & Leonardos, 2009).

Η Λίμνη Ζάζαρη έχει μέσο βάθος 1.7m και έκταση 2km² και είναι μια εύτροφη λίμνη (Zacharias et al., 2002). Αποτελεί γειτονική λίμνη της Λίμνης Χειμαδίτιδας. Δύο είδη ιχθύων (*Barbus peloponnesius*, *Rhodeus amarus*) που ζουν στη λίμνη περιλαμβάνονται στην Οδηγία 92/43/ΕΟΚ, δύο (*Barbus peloponnesius*, *Rhodeus amarus*) προστατεύονται από τη συνθήκη της Βέρνης ενώ δύο είδη ιχθύων (*Pachychilon macedonicum*, *Barbus peloponnesius*) αναφέρονται στο Κόκκινο Βιβλίο (Economidis, 1991). Αποτελεί περιοχή του δικτύου “NATURA 2000” (Dafis et al., 1996) και το νερό της χρησιμοποιείται για αρδευτικούς, ψυχαγωγικούς και υδροηλεκτρικούς σκοπούς, ενώ ασκείται αλιευτική δραστηριότητα (Kagalou & Leonardos, 2009).

Η Λίμνη Δοϊράνη είναι μια διεθνής λίμνη μεταξύ της Ελλάδος και της Πρώην Γιουγκοσλαβικής Δημοκρατίας της Μακεδονίας. Είναι μια ρηχή λίμνη με μέσο βάθος τα 5.5m και συνολική έκταση 41 Km² (Zacharias et al., 2002). Η Δοϊράνη είναι μια τυπική εύτροφη λίμνη έως και υπερτροφική (Temponeras et al., 2000; Kagalou & Leonardos, 2009). Ο ολικός φωσφόρος στο νερό της λίμνης είναι σε πολύ υψηλά επίπεδα (Temponeras et al., 2000; Kagalou & Leonardos, 2009). Έξι είδη ιχθύων (*Barbus peloponnesius*, *Rhodeus amarus*, *Barbus cyclolepis*, *Cobitis taenia*, *Cobitis vardarensis*, *Sabanejewia balcanica*) που ζουν στη λίμνη περιλαμβάνονται στην Οδηγία 92/43/ΕΟΚ, οκτώ (*Leucaspius delineatus*, *Barbus peloponnesius*, *Chondrostoma nasus*, *Rhodeus amarus*, *Barbus cyclolepis*, *Sabanejewia balcanica*, *Silurus glanis*, *Salaria fluviatilis*) προστατεύονται από τη συνθήκη της Βέρνης ενώ επτά είδη ιχθύων (*Pachychilon macedonicum*, *Leuciscus cephalus*,

Alburnus alburnus, *Barbus peloponnesius*, *Barbus cyclolepis*, *Cobitis vardarensis*, *Sabanejewia balcanica*) αναφέρονται στο Κόκκινο Βιβλίο (Economidis, 1991). Το νερό της Λίμνης Δοϊράνης χρησιμοποιείται για αρδευτικούς και βιομηχανικούς σκοπούς, ενώ ασκείται αλιευτική δραστηριότητα (Kagalou & Leonardos, 2009).

Ο τεχνητός ταμιευτήρας Κερκίνης αποτελεί μια ιδιαίτερη περίπτωση υγροτόπου. Δημιουργήθηκε με την κατασκευή φράγματος στο ρου του ποταμού Στρυμόνα και τα νερά του χρησιμοποιούνται για άρδευση (Dafis et al., 1996). Το ακριβές μέσο βάθος του ταμιευτήρα δεν έχει υπολογιστεί, αλλά σύμφωνα με μελέτες των Zacharias et al., (2002), αυτό κυμαίνεται από 3 έως 5m. Η έκταση του είναι ίση με 51.5 Km² (Zacharias et al., 2002). Στη περιοχή δεν υπάρχει ιδιαίτερα αναπτυγμένη βιομηχανική δραστηριότητα. Υπάρχουν όμως κάποιες μικρές μονάδες όπως σφαγεία και βιοτεχνίες δερμάτων, οι οποίες ρυπαίνουν το Στρυμόνα με τα απόβλητα τους και έμμεσα τον ταμιευτήρα (Tsoumani et al., 2006). Επίσης έχουν βρεθεί αυξημένες συγκεντρώσεις φωσφορικών και αζωτούχων ενώσεων, που φανερώνουν την επίδραση της γεωργικής ανάπτυξης της γύρω περιοχής στον ταμιευτήρα, δημιουργώντας έτσι την εμφάνιση του ανεπιθύμητου φαινομένου του ευτροφισμού (Skoulikidis et al., 1998). Ο ταμιευτήρας της Κερκίνης αποτελεί έναν από τους 11 ελληνικούς Υγροτόπους Διεθνούς Σημασίας που προστατεύεται από τη Διεθνή Σύμβαση Ramsar. Καλύπτεται από την Ευρωπαϊκή και Διεθνή νομοθεσία, όπως η Οδηγία 79/409 της Ευρωπαϊκής Ένωσης και η Διεθνής Σύμβαση της Βαρκελώνης (Dafis et al., 1996). Επίσης αποτελεί περιοχή του Ευρωπαϊκού Δικτύου NATURA 2000 σύμφωνα με την Οδηγία 92/43/ΕΟΚ (Dafis et al., 1996).

Η Λίμνη Βόλβη είναι μια από τις μεγαλύτερες λίμνες στην Ελλάδα. Έχει έκταση 69km² και μέσο βάθος 13.8m (Zacharias et al., 2002). Με βάση την έρευνα για τις φυσικοχημικές παραμέτρους του νερού, το φυτοπλαγκτό και το ζωοβένθος, η λίμνη κατατάσσεται στις εύτροφες (Moustaka 1989; Petaloti et al., 2004). Η Λίμνη Βόλβη, είναι ένας από τους 11 σημαντικότερους υγροτόπους της χώρας μας που προστατεύονται από τη Διεθνή Σύμβαση Ramsar. Ακόμα σύμφωνα με

την κοινοτική Οδηγία 69/409/ΕΟΚ αποτελεί Ειδικά Προστατευόμενη Περιοχή και ανήκει στο δίκτυο NATURA 2000 (Dafis et al., 1996). Επτά είδη ιχθύων (*Alosa macedonica*, *Barbus cyclolepis*, *Rhodeus amarus*, *Aspius aspius*, *Chalcarlburnus chalcoides*, *Cobitis strumicae*, *Silurus aristotelis*) που ζουν στη λίμνη περιλαμβάνονται στην Οδηγία 92/43/ΕΟΚ, εννέα (*Alosa macedonica*, *Barbus cyclolepis*, *Rhodeus amarus*, *Aspius aspius*, *Chalcarlburnus chalcoides*, *Cobitis strumicae*, *Silurus aristotelis*, *Silurus glanis*, *Salaria fluviatilis*) προστατεύονται από τη συνθήκη της Βέρνης ενώ έξι είδη ιχθύων (*Leuciscus cephalus*, *Barbus cyclolepis*, *Chalcarlburnus chalcoides*, *Vimba melanops*, *Alburnus alburnus*, *Cobitis strumicae*) αναφέρονται στο Κόκκινο Βιβλίο (Economidis, 1991). Το νερό της Λίμνης Βόλβης χρησιμοποιείται για αρδευτικούς και βιομηχανικούς σκοπούς, ενώ ασκείται αλιευτική δραστηριότητα (Kagalou & Leonardos, 2009).

Η Λίμνη Κορώνεια μέχρι και το 2006 ήταν μια εύτροφη ως υπερέυτροφη λίμνη με μέσο βάθος 3.8 και έκταση 30 km² (Zacharias et al., 2002). Ένας συνδυασμός φαινομένων (λειψυδρία, μείωση φυσικής τροφοδοσίας της λίμνης, αύξηση κατανάλωσης νερού) οδήγησαν σε σοβαρή μείωση της στάθμης του νερού της λίμνης Κορώνειας (Genitsaris et al., 2009). Κατά καιρούς έχουν αναφερθεί φαινόμενα μαζικών θανάτων ιχθύων, τα οποία αποδόθηκαν στην υψηλή αφθονία των κυανοβακτηρίων και στην αυξημένη συγκέντρωση των μικροκυστινών της λίμνης (Moustaka-Gouni et al., 2004).

Η Λίμνη Πετρών είναι μια ρηχή λίμνη η οποία έχει μέσο βάθος 2.6m και έκταση 10km² και είναι μια μεσότροφη λίμνη (Zacharias et al., 2002). Οι τιμές του αζώτου και του φωσφόρου στο νερό της λίμνης, την κατατάσσουν στα όρια των μη ρυπασμένων λιμνών (Stanner & Bourdeau, 1995). Η Λίμνη Πετρών έχει προταθεί ως περιοχή κοινοτικού ενδιαφέροντος στο δίκτυο “NATURA 2000” (Tsoumani et al., 2006). Το νερό της Λίμνης Πετρών χρησιμοποιείται για αρδευτικούς σκοπούς, ενώ ασκείται αλιευτική δραστηριότητα (Kagalou & Leonardos, 2009).

Τα χαρακτηριστικά της Λίμνης Παμβώτιδας έχουν περιγραφθεί αναλυτικά στην προηγούμενη ενότητα.

Τα κύρια λιμνολογικά χαρακτηριστικά, οι χρήσεις και τα επικρατέστερα κυανοβακτηριακά είδη των υδάτινων οικοσυστημάτων παρουσιάζονται στον Πίνακα 4.1.

Πίνακας 4.1. Κύρια λιμνολογικά χαρακτηριστικά, χρήσεις και επικρατέστερα κυανοβακτηριακά είδη των υπό μελέτη υδάτινων οικοσυστημάτων (^α Vardaka et al.,2005; ^β Cook et al.,2004; ^γ Tsoumani et al.,2006; ^δTryfon et al., 1997; ^εMoustaka et al.,1990; ^ζVardaka et al.,2000; ^η Temponeras et al., 2000; ^θ Kagalou and Leonardos, 2009; ^ιZacharias et al., 2002)

Table 4.1. Main limnological characteristics, uses and dominant cyanobacterial species of studied Lakes(^α Vardaka et al.,2005; ^β Cook et al.,2004, ^γ Tsoumani et al.,2006; ^δTryfon et al., 1997 ; ^εMoustaka et al.,1990; ^ζVardaka et al.,2000; ^η Temponeras et al., 2000; ^θ Kagalou and Leonardos, 2009; ^ιZacharias et al., 2002).

A/A	Υδάτινο Σύστημα	Μέσο βάθος(m)^ι	Επιφάνεια(Km²)^θ	Χρήσεις^ο	Τροφικό επίπεδο	Επικρατέστερα είδη κυανοβακτηρίων
1	Λυσιμαχία	3.9	13	Αλεία/ άρδευση	Ευτροφικό- υπερτροφικό ^ν	<i>Oscillatoria</i> sp. ^α <i>Anabaena</i> sp. ^α <i>Aphanizomenon flos-aquae</i> ^α
2	Τριγωνίδα	30.3	99.0	Αλεία / άρδευση / ψυχαγωγία / βιομηχανία	Ολιγοτροφικό – μεσοτροφικό ^ν	<i>Oscillatoria</i> sp. ^α <i>Anabaena</i> sp. ^α <i>Aphanizomenon flos-aquae</i> ^α
3	Παμβώτιδα	5.5	23.0	Αλεία / άρδευση / ψυχαγωγία	Ευτροφικό ^ν	<i>Microcystis</i> sp. ^β <i>Anabaena</i> sp. ^β
4	Μικρή Πρέσπα	4.1	49.0	Αλεία / άρδευση / ψυχαγωγία	Ευτροφικό – Υπερτροφικό ^δ	<i>Microcystis</i> sp. ^β
5	Βεγορίτιδα	28.9	40.0	Αλεία / άρδευση / ψυχαγωγία / υδροηλεκτρική	Ολιγοτροφικό – μεσοτροφικό ^η	<i>Aphanizomenon flos-aquae</i> ^α <i>Anabaena</i> sp. ^α
6	Καστοριά	4.8	27.0	Αλεία / άρδευση / ψυχαγωγία	Ευτροφικό ^ζ	<i>Microcystis</i> sp. ^β <i>Anabaena</i> sp. ^β
7	Ζάζαρη	1.7	2.0	Αλεία / άρδευση / ψυχαγωγία / υδροηλεκτρική	Ευτροφικό ^ν	<i>Microcystis</i> sp. ^β
8	Πετρών	2.6	10.0	Αλεία / άρδευση	Μεσοτροφικό ^ν	<i>Microcystis</i> sp. ^α

9	Χειμαδίτιδα	1.2	11.0	Αλιεία / άρδευση	Ευτροφικό γ	<i>Aphanizomenon flos-aquae</i> ^α <i>Microcystis</i> sp. ^α <i>Anabaena</i> sp. ^α <i>Oscillatoria</i> sp. ^α
10	Κορώνεια	3.8	30.0	Αλιεία / άρδευση /βιομηχανία	Ευτροφικό – Υπερτροφικό γ	<i>Microcystis</i> sp. ^α <i>Anabaena</i> sp. ^α
11	Βόλβη	13.8	69.0	Αλιεία / άρδευση /βιομηχανία	Ευτροφικόγ	<i>Anabaena</i> sp. ^β <i>Aphanizomenon flos-aquae</i> ^β <i>Juaginema subtilissimum</i> ^β <i>Limnothrix redekei</i> ^β <i>Planktolyngbya limnetica</i> ^β
12	Δοϊράνη	5.5	41.0	Αλιεία / άρδευση /βιομηχανία	Ευτροφικό – Υπερτροφικό η	<i>Anabaena</i> sp. ^β <i>Aphanizomenon flos-aquae</i> ^β <i>Juaginema subtilissimum</i> ^β <i>Limnothrix redekei</i> ^β <i>Planktolyngbya</i> <i>limnetica</i> ^β
13	Κερκίνη	3.0-5.0	51.5	Άρδευση	Ευτροφικό γ	<i>Microcystis</i> sp. ^β

4.2.2 Χαρακτηριστικά του ιχθύος *Carassius gibelio*

Στην παρούσα ενότητα διερευνήθηκε η συγκέντρωση των μικροκυστινών στους ιστούς του ιχθύος *Carassius gibelio* (Εικόνα 4.2). Η επιλογή του παραπάνω ιχθύος έγινε σύμφωνα με τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά που εμφανίζει. Το είδος *Carassius gibelio* (BLOCH, 1782) ανήκει στην οικογένεια των *Cyprinidae* (Πίνακας 4.2) και είναι γνωστό στην Ελλάδα με την κοινή ονομασία πεταλούδα ή αγριοκυπρίνος. Θεωρείται από τα πιο ανθεκτικά είδη, μπορεί να επιβιώσει κάτω από εξαιρετικά ακραίες περιβαλλοντικές συνθήκες, όπου άλλα είδη δύσκολα μπορούν (Holcik 1980). Αντέχει και σε πολύ χαμηλά επίπεδα συγκέντρωσης διαλυμένου οξυγόνου (Kottelat & Freyhof, 2007). Ζει και σε στάσιμα νερά αλλά και σε νερά με μεγάλη ροή κυρίως σε περιοχές με πυκνή υδρόβια βλάστηση και λασπώδη πυθμένα (Riede, 2004). Ο πληθυσμός του αποτελείται μόνο από θηλυκά άτομα, που κατά την αναπαραγωγική περίοδο (τέλη του χειμώνα μέχρι και τα τέλη της άνοιξης) τα αυγά τους επιβρέχονται από κυπρινοειδή χωρίς όμως να λαμβάνει χώρα πραγματική γονιμοποίηση (γυνογένεση) (Spratte & Hartmann, 1997). Το διαιτολόγιό του είναι μικτό, είναι δηλαδή παμφάγο είδος, το οποίο τρέφεται κυρίως με υδρόβια καρκινοειδή, όπως τα κολυμβητικά δεκάποδα, με έντομα, σκουλήκια, υδρόβια φυτά και φύκη (Cihar, 1991). Είναι ευρέως διαδεδομένο απ' την Ιαπωνία ως και την Ευρώπη συμπεριλαμβανομένης και της Ελλάδος (Economidis 1991; Kottelat 1997). Μπορεί να βρεθεί σε ένα μεγάλο αριθμό οικοσυστημάτων λόγω της μεγάλης προσαρμοστικής του ικανότητας (Kottelat & Freyhof 2007). Στις περισσότερες χώρες έχει μεγάλη εμπορική αξία και καταναλώνεται σε μεγάλο βαθμό. Στην Ελλάδα έχει μικρή εμπορική αξία (Leonardos et al., 2001). Τέλος, είναι το μοναδικό είδος στην Ελλάδα που υπάρχει στο σύνολο των εσωτερικών υδάτων γεγονός που το καθιστά ως οργανισμό -μέτρο σύγκρισης.



Εικόνα 4.2. Χαρακτηριστικός εκπρόσωπος *Carassius gibelio* (από www.yousouroum.gr)
Figure 4.2 *Carassius gibelio* (from www.yousouroum.gr)

Πίνακας 4.2. Συστηματική κατάταξη του είδους <i>Carassius gibelio</i> (Bloch, 1782) Table 4.2. Classification of <i>Carassius gibelio</i>	
Βασίλειο:	Animalia
Φύλο:	Chordata
Υποφύλο:	Vertebrata
Υπερκλάση:	Gnathostomata
Κλάση:	Osteichthyes
Υποκλάση :	Actinopterygii
Υπέρταξη:	Teleostei
Τάξη:	Cypriniformes
Οικογένεια:	Cyprinidae
Γένος:	Carassius
Είδος:	<i>Carassius gibelio</i> (Bloch, 1782)

4.2.3 Συλλογή δειγμάτων νερού και ιχθύων

Τα δείγματα του νερού συλλέχθηκαν την άνοιξη του 2005 από τα προαναφερθέντα υδάτινα οικοσυστήματα. Η επιλογή της θέσης των παράκτιων σταθμών σε κάθε υδάτινο οικοσύστημα έγινε σύμφωνα με τη χρήση τους ως περιοχές για ψυκαγωγικές ή αρδευτικές δραστηριότητες.

Τα δείγματα του νερού συλλέχθηκαν με τη βοήθεια δοχείων πολυαιθυλενίου όγκου 500 ml. Η συλλογή των δειγμάτων σε κάθε σταθμό έγινε με την τοποθέτηση των δοχείων 10-20cm κάτω από την επιφάνεια του νερού. Τα δοχεία βυθίζονταν αργά στο νερό ώστε η επιφάνεια του νερού να διαταράσσεται όσο το δυνατόν λιγότερο.

Την ίδια χρονική περίοδο, από κάθε ένα από τα 13 υδάτινα συστήματα, συλλέχθηκαν δέκα (10) άτομα του είδους *Carassius gibelio*. Η συλλογή τους έγινε με τη χρήση μανωμένου δικτυού με εσωτερικό άνοιγμα 60 mm και εξωτερικό άνοιγμα 300 mm. Η κάθε δειγματοληψία ολοκληρωνόταν με τη μεταφορά των ιχθύων στο εργαστήριο, με τη χρήση φορητών ψυγείων.

Στην προσπάθεια να ενισχυθεί η εγκυρότητα των αποτελεσμάτων, πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο τεχνητή αναπαραγωγή ατόμων του ίδιου είδους. Οι απόγονοι των παραπάνω τοποθετήθηκαν σε ενυδρεία με νερό που ανακυκλωνόταν και παρέμειναν εκεί για χρονικό διάστημα 16 μηνών. Οι ιστοί των παραπάνω ατόμων χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες της παρουσίας μικροκυστινών.

4.2.4 Επεξεργασία και αποθήκευση δειγμάτων

Οι μικροκυστίνες που περιέχονταν στα δείγματα του νερού αναλύθηκαν σε 2 μορφές: διαλυμένες στο νερό (εξωκυττάρια) και στο εσωτερικό των κυττάρων του αιωρούμενου υλικού (ενδοκυττάρια). Η επεξεργασία και αποθήκευση των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε όπως έχει ήδη περιγραφθεί στην προηγούμενη ενότητα.

Μετά τη μεταφορά των ιχθύων στο εργαστήριο, αυτοί ζυγίστηκαν με ακρίβεια 0.01g. Στη συνέχεια, έγινε ανατομή και ακολούθησε η λήψη των παρακάτω ιστών: μυϊκός ιστός, νεφρός, ήπαρ, έντερο, γονάδες και

εγκέφαλος. Οι ιστοί ζυγίστηκαν με ζυγό ακριβείας (0.001g) και διατηρήθηκαν στους -80 °C μέχρι την περαιτέρω επεξεργασία τους.

4.2.5 Εκχύλιση μικροκυστινών

4.2.5.1 Δείγματα νερού

Η εκχύλιση των εσωκυττάρων μικροκυστινών από τους ηθμούς πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας ως διαλύτη μεθανόλη 100% (v/v) (Lawton et al., 1994; Carmichael & An, 1999) και έχει περιγραφεί αναλυτικά σε προηγούμενη ενότητα. Η συγκέντρωση των μικροκυστινών που περιέχονταν στα δείγματα του νερού, εκφράστηκε ως νανογραμμάρια ισοδυνάμων μικροκυστίνης-LR ανα λίτρο (ng MC-LReq/l) (Hawkins et al., 2005).

4.2.5.2 Δείγματα ιστών του ιχθύος *Carassius gibelio*

Η μέθοδος που ακολουθήθηκε για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης μικροκυστινών στους ιστούς των ιχθύων, είναι μια τροποποιημένη μέθοδος η οποία βασίστηκε σε αυτές των Carmichael, (1995), Williams et al., (1997), Magalhães et al., (2001) και Sipiä et al., (2002). Κάθε ιστός που εξήχθη από τους ιχθύες, ομογενοποιήθηκε ξεχωριστά με τη βοήθεια αυτόματου ομογενοποιητή (IKA T18 basic, ULTRA TURRAX). Οι μικροκυστίνες που περιέχονταν στο ομογενοποιημένο υλικό των ιστών εκχυλίστηκαν τρεις φορές με μεθανόλη 100% σύμφωνα με τους Carmichael, (1995), Williams et al., (1997) Magalhães et al., (2001). Ακολούθησε ομογενοποίηση με ανάδευση για 1 h. Το εναιώρημα τοποθετήθηκε σε κατεργασία με υπερήχους (Vibra Cell Sonicator, Sonics and Material Inc.) για 15 λεπτά και φυγοκεντρήθηκε στις 1300 rpm για 15 λεπτά (Sipiä et al., 2002). Το υπερκείμενο συλλέχθηκε και η παραπάνω διαδικασία: προσθήκη μεθανόλης-ανάδευση-κατεργασία με υπερήχους-φυγοκέντρωση-συλλογή του υπερκειμένου επαναλήφθηκε άλλες δύο φορές σύμφωνα με τους Sipiä et al., (2002). Στη συνέχεια, το υπερκείμενο συλλέχθηκε και αποθηκεύθηκε στους 4 °C για 12 ώρες

σύμφωνα με τους Sipiä et al., (2002). Ποσότητα ίση με 5 ml του υπερκείμενου τοποθετήθηκε σε ρεύμα αζώτου προκειμένου να εξατμιστεί πλήρως η μεθανόλη (Metcalf et al., 2000). Το προσυγκεντρωμένο δείγμα επαναδιαλύθηκε σε ελάχιστο όγκο μεθανόλης 100%. Ακολούθησε αραίωση του δείγματος με απεσταγμένο νερό έτσι ώστε να μειωθεί ο όγκος της μεθανόλης στο 2% (Carmichael & An, 1999). Το τελικό δείγμα διηθήθηκε μέσω μεμβρανώδους ηθμού (μέγεθος πόρων: 0.45 μm, διάμετρος: 4mm) (Sipiä et al., 2002). Ο ποσοτικός προσδιορισμός των μικροκυστινών που περιέχονται στο παραπάνω διήθημα, πραγματοποιήθηκε μέσω της ενζυμοσυνδεόμενης ανοσοπροσοροφητικής τεχνικής (ELISA), όπως έχει ήδη περιγραφθεί σε προηγούμενη ενότητα. Το όριο ανίχνευσης της ELISA ήταν ίσο με 100ng μικροκυστίνη-LReq /l. Η συγκέντρωση των μικροκυστινών που περιέχεται στους ιστούς των ιχθύων, εκφράστηκε ως νανογραμμάρια ισοδυνάμων μικροκυστίνης-LR/ γραμμάριο ιστού (ng μικροκυστίνης-LR eq/g ιστού) (Hawkins et al., 2005).

4.3. ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ

Η στατιστική επεξεργασία των δεδομένων έγινε με τη χρήση του στατιστικού προγράμματος SPSS 17.0 for Windows. Το Γενικό Γραμμικό Μοντέλο (GLM) χρησιμοποιήθηκε για την εξέταση τυχόν σημαντικών διαφορών ανάμεσα στις λίμνες και στους ιστούς, ως προς τη συγκέντρωση των μικροκυστινών.

Η Ανάλυση Συσχέτισης (Correlation Analysis) κατά Spearman χρησιμοποιήθηκε για την εξεύρεση πιθανών συσχετίσεων των συγκεντρώσεων των μικροκυστινών ανάμεσα στους διάφορους ιστούς, αλλά και πιθανών συσχετίσεων των ενδοκυττάρων και εξωκυττάρων μικροκυστινών στα δείγματα του νερού.

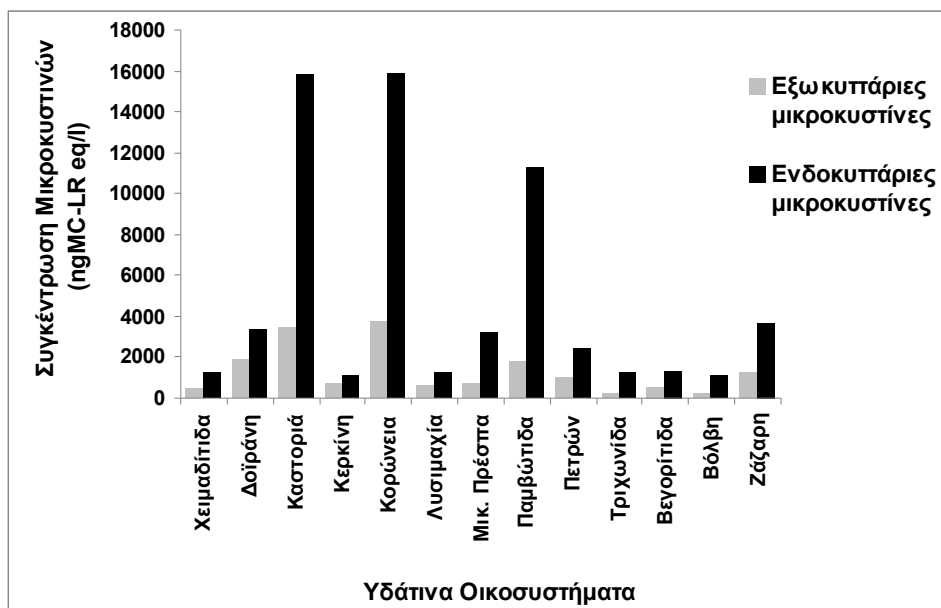
4.4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4.4.1 Συγκεντρώσεις μικροκυστινών των υδάτινων οικοσυστημάτων

Σε όλα τα υπό μελέτη υδάτινα οικοσυστήματα ανιχνεύθηκαν συγκεντρώσεις μικροκυστινών. Η συγκέντρωση των ενδοκυττάρων μικροκυστινών ήταν μεγαλύτερη από τη συγκέντρωση των εξωκυττάρων μικροκυστινών (Εικόνα 4.3). Η ανάλυση του γενικού γραμμικού μοντέλου (GLM) έδειξε ότι οι συγκεντρώσεις των μικροκυστινών διέφεραν σημαντικά ανάμεσα στις λίμνες ($F=37.34$, $df=12$; $P<0.01$) (Πίνακας 4.3).

Πίνακας 4.3 Αποτελέσματα Γενικού Γραμμικού Μοντέλου					
Table 4.3 Results from General Linear Model					
Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	2252817.319	75	30037.564	30.647	.000
Intercept	767528.321	1	767528.321	783.103	.000
lake	439142.972	12	36595.248	37.338	.000
tissue	499289.631	5	99857.926	101.884	.000
lake * tissue	975570.721	58	16820.185	17.162	.000
Error	434189.334	443	980.111		
Total	3768499.617	519			
Corrected Total	2687006.653	518			

Στη Λίμνη Κορώνεια εντοπίστηκαν οι υψηλότερες συγκεντρώσεις εξωκυττάρων (15896 ng/l) και ενδοκυττάρων μικροκυστινών (3748.6 ng/l), σε σχέση με τα υπόλοιπα υδάτινα οικοσυστήματα. Αντιθέτως, στη Λίμνη Βόλβη εντοπίστηκαν οι χαμηλότερες συγκεντρώσεις εξωκυττάρων (209.56 ng/l) και ενδοκυττάρων μικροκυστινών (1086 ng/l). Στα υπόλοιπα υδάτινα οικοσυστήματα, εντοπίστηκαν ενδιάμεσες συγκεντρώσεις εξωκυττάρων και ενδοκυττάρων μικροκυστινών. Από αυτές, υψηλές συγκεντρώσεις μικροκυστινών βρέθηκαν στις Λίμνες Καστοριά και Παμβώτιδα. Στην ομάδα των Λιμνών Δοιράνη, Μεγάλη Πρέσπα, Πετρών και Ζάζαρη εντοπίστηκαν οι αμέσως χαμηλότερες συγκεντρώσεις μικροκυστινών. Χαμηλότερες συγκεντρώσεις εντοπίστηκαν στην ομάδα των υδάτινων οικοσυστημάτων Χειμαδίτιδα, Κερκίνη, Λυσιμαχία, Τρικωνίδα και Βεγορίτιδα. Επιπλέον, υπήρξε ισχυρή συσχέτιση ανάμεσα στη συγκέντρωση των ενδοκυττάρων και των εξωκυττάρων μικροκυστινών των υδάτινων οικοσυστημάτων που εξετάστηκαν ($r=0.94$, $P<0.01$).



Εικόνα4.3. Συγκέντρωση εξωκυττάρια και ενδοκυττάρια μικροκυστίνων στα υπό εξέταση υδάτινα συστήματα
Figure4. 3. Microcystin concentration in water and scum from the examined lakes.

4.4.2 Συγκέντρωση μικροκυστίνων στους ιστούς του ιχθύος *C. gibelio*

Όλα τα άτομα του ιχθύος *C. gibelio* που εξετάστηκαν, αποδείχθηκε ότι συσώρευσαν στους ιστούς τους ποσότητες μικροκυστίνων. Αντιθέτως, στους ιστούς των ατόμων του *C. gibelio*, που χρησιμοποιήθηκαν ως αρνητικοί μάρτυρες, δεν ανιχνεύθηκαν μικροκυστίνες.

Οι μέσες τιμές του βάρους των ιστών που εξετάστηκαν ήταν: ήπαρ: 0.56 g, νεφροί: 0.97 g, έντερο: 3.84 g, γονάδες: 5.6 g, εγκέφαλος: 0.46 g, μυϊκός ιστός: 5.98 g, ενώ οι αντίστοιχες τιμές για τα άτομα που χρησιμοποιήθηκαν ως αρνητικοί μάρτυρες ήταν: ήπαρ: 0.8 g, νεφροί: 0.72 g, έντερο: 2.58 g, γονάδες: 3.46 g, εγκέφαλος: 0.42 g, μυϊκός ιστός: 4.88 g. Η ανάκτηση των μικροκυστίνων σύμφωνα με την αναλυτική μέθοδο που χρησιμοποιήθηκε, υπολογίστηκε ίση με 74%.

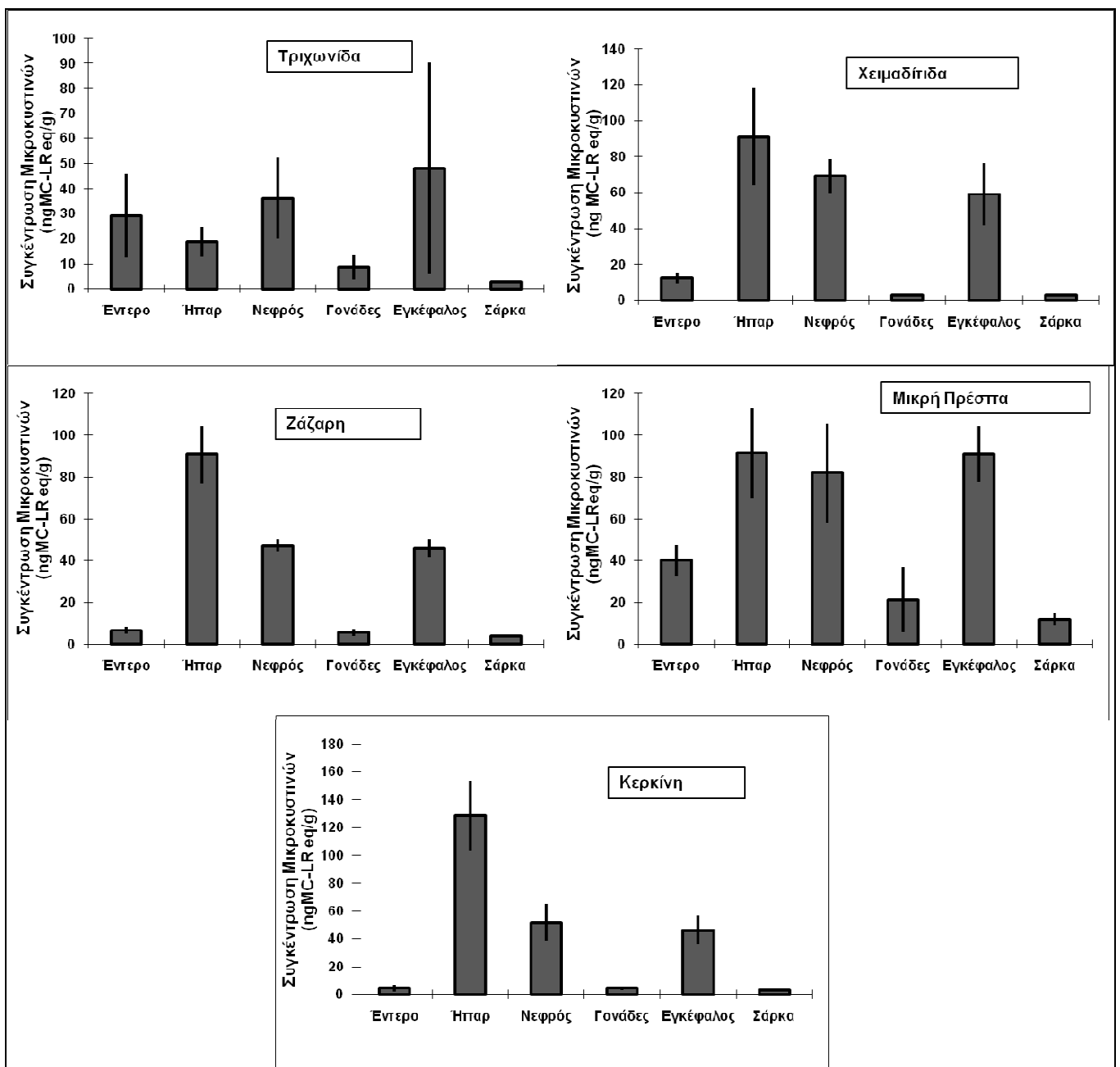
Στις εικόνες 4.4, 4.5 και 4.6 παρουσιάζεται η κατανομή της συγκέντρωσης των μικροκυστίνων στους ιστούς του ιχθύος *C. gibelio* σε κάθε υδάτινο οικοσύστημα που μελετήθηκε. Η ανάλυση του γενικού

γραμμικού μοντέλου (GLM) έδειξε ότι υπήρχαν σημαντικές διαφορές ανάμεσα στις συγκεντρώσεις των μικροκυστινών στους διάφορους ιστούς ($F=101.88$; $df=5$; $P<0.001$). Επιπλέον σημαντικές διαφορές υπήρχαν και ανάμεσα στους ιστούς ιχθύων διαφορετικών λιμνών ($F=17.162$; $df=58$; $P<0.001$) (Πίνακας 4.3).

Ανάμεσα στους ιστούς, οι υψηλότερες συγκεντρώσεις μικροκυστινών ανιχνεύθηκαν στο ήπαρ και τον νεφρό (124.4 ± 23.4 ng/g και 63.3 ± 12.2 ng/g αντιστοίχως). Οι αμέσως χαμηλότερες συγκεντρώσεις μικροκυστινών εντοπίστηκαν στον εγκέφαλο, το έντερο και τις γονάδες (43.8 ± 10.2 ng/g, 35.3 ± 15.7 ng/g και 9.27 ± 5.2 ng/g αντιστοίχως). Οι χαμηλότερες συγκεντρώσεις μικροκυστινών εντοπίστηκαν στο μυϊκό ιστό (7.1 ± 2.5 ng/g).

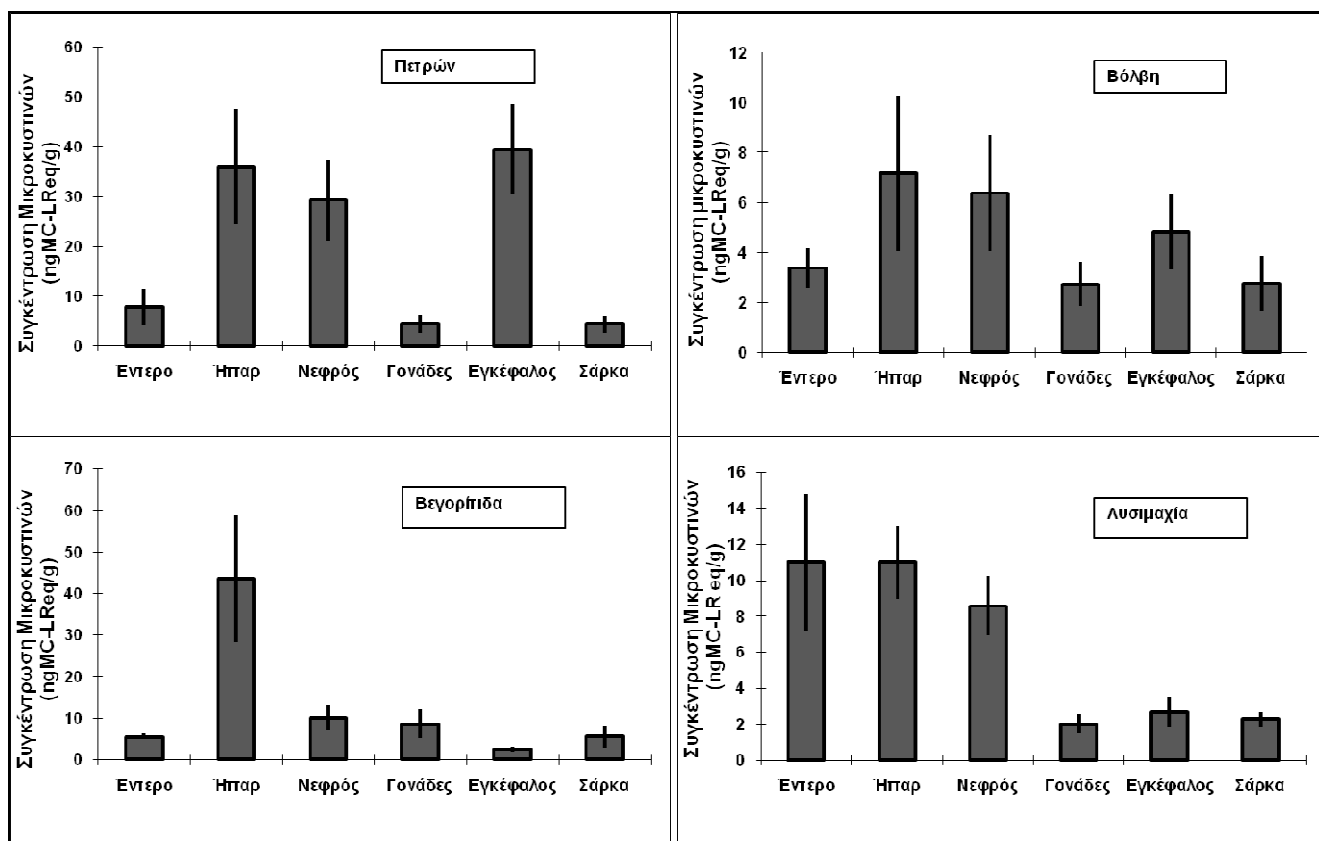
Στους ιχθύες από τις λίμνες Κορώνεια, Καστοριά, Παμβώτιδα και Δοϊράνη εντοπίστηκαν οι υψηλότερες συγκεντρώσεις μικροκυστινών (Εικόνα 4.6). Στους ιχθύες των υδάτινων οικοσυστημάτων: Τριχωνίδα, Χειμαδίτιδα, Ζάζαρη, Μικρή Πρέσπα και Κερκίνη εντοπίστηκαν οι αμέσως χαμηλότερες συγκεντρώσεις (Εικόνα 4.4). Οι χαμηλότερες συγκεντρώσεις μικροκυστινών εντοπίστηκαν στους ιχθύες των Λιμνών: Πετρών, Βόλβη, Βεγορίτιδα και Λυσιμαχία (Εικόνα 4.5).

Οι συγκεντρώσεις των μικροκυστινών στο ήπαρ και τον εγκέφαλο, εμφάνισαν σημαντική συσχέτιση με τη συγκέντρωση των μικροκυστινών στο νεφρό ($r=0.639$ and $r=0.802$ αντιστοίχως). Το σχετικό βάρος του ήπατος είχε θετική συσχέτιση με το σχετικό βάρος του νεφρού ($r=0.72$). Επίσης θετική συσχέτιση εμφανίστηκε μεταξύ της συγκέντρωσης των μικροκυστινών στο ήπαρ και του σχετικού βάρους του ήπατος ($r=0.76$).

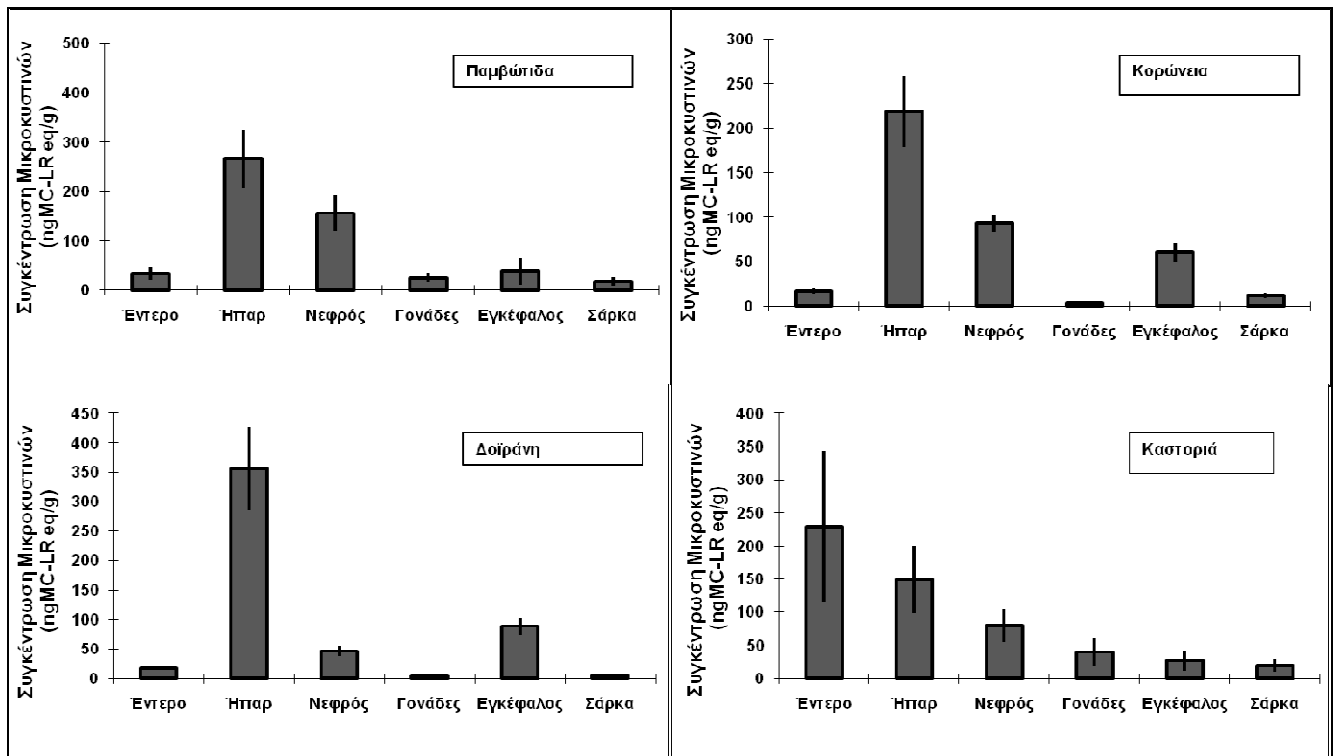


Εικόνα 4.4. Συγκέντρωση μικροκυστινών (ng MC-LR eq/g) στους ιστούς του *Carassius gibelio*, από τα υδάτινα συστήματα: Τριχωνίδα, Χειμαδίτιδα, Ζάζαρη, Μικρή Πρέσπα, Κερκίνη

Figure 4.4 Microcystin concentrations (ng MC-LR eq/g) in the tissues of *Carassius gibelio*, collected from: Trichonis, Chimaditis, Zazari, Mikri Prespa, Kerkini



Εικόνα 4.5. Συγκέντρωση μικροκυστινών (ng MC-LR eq/g) στους ιστούς του *Carassius gibelio*, από τα υδάτινα συστήματα: Πειρών, Βόλβη, Βεγορίτιδα, Λυσιμαχία
Figure 4.5 Microcystin concentrations (ng MC-LR eq/g) in the tissues of *Carassius gibelio*, collected from: Petron, Volvi, Vegoritida, Lysimachia



Εικόνα 4.6 Συγκέντρωση μικροκυστινών (ng MC-LR eq/g) στους ιστούς του *Carassius gibelio*, από τα υδάτινα συστήματα: Παμβώτιδα, Κορώνεια, Δοϊράνη, Καστοριά

Figure 4.6 Microcystin concentrations (ng MC-LR eq/g) in the tissues of *Carassius gibelio*, collected from: Pamvotis, Koronia, Doirani, Kastoria

4.5 ΣΥΖΗΤΗΣΗ

4.5.1 Παρουσία μικροκυστινών στα εσωτερικά υδάτινα οικοσυστήματα της Ελλάδος

Η παρούσα ενότητα καταδεικνύει την εκτεταμένη παρουσία των μικροκυστινών στα υδάτινα οικοσυστήματα της Ελλάδας. Το μεσογειακό κλίμα με την υψηλότερη ηλιακή ακτινοβολία, την υψηλότερη θερμοκρασία και τις λιγότερες βροχοπτώσεις σε σχέση με τα βορειότερα εύκρατα κλίματα, ευνοεί την αύξηση των κυανοβακτηρίων για μεγαλύτερη χρονική περίοδο και αυξάνει την πιθανότητα της δημιουργίας επιφανειακών κυανοβακτηριακών συσσωρεύσεων (Cook et al., 2004). Πρόσφατες μελέτες που αφορούν τον πληθυσμό των κυανοβακτηρίων σε λίμνες της Ελλάδας, έχουν αποδείξει ότι η άνθηση των κυανοβακτηρίων μπορεί να διαρκέσει μέχρι και 9 μήνες (Mitraki et al., 2004). Σύμφωνα με αυτές, ο πληθυσμός των κυανοβακτηρίων στις ελληνικές λίμνες αποτελείται από μια ποικιλία ειδών (Πίνακας 4.1). Το κυρίαρχο είδος των εύτροφων και υπερεύτροφων λιμνών είναι το *Microcystis* sp., ενώ το είδος *Aphanizomenon* sp. είναι πιο πιθανό να αναπτυχθεί σε μεσότροφες- ολιγότροφες λίμνες (Vardaka et al., 2000; 2005; Cook et al., 2004).

Στη Λίμνη Κορώνεια εντοπίστηκαν οι υψηλότερες συγκεντρώσεις μικροκυστινών. Την περίοδο 1985-1995, συνέβη σημαντική αλλαγή στην τροφική κατάσταση της λίμνης, η οποία από εύτροφη, μετατράπηκε σε υπερεύτροφη (Crisman et al., 2005). Την περίοδο 2003-2004, το σύστημα χαρακτηριζόταν από μη προβλέψιμες πληθυσμιακές εκρήξεις τοξικών φυτοπλαγκτονικών οργανισμών και παρουσία μικροκυστινών (Moustaka-Gouni et al., 2004). Τον Αύγουστο του 2004 υπήρξε μαζικός θάνατος πτηνών και ιχθύων, πιθανώς ως αποτέλεσμα του ευτροφισμού, καθώς εκείνο το διάστημα το φυτοπλαγκτό της λίμνης αποτελούνταν αποκλειστικά από κυανοβακτήρια (Moustaka-Gouni et al., 2004).

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της παρούσας ενότητας, οι εξωκυττάρια μικροκυστινες στις Λίμνες Καστοριά και Παμβώτιδα ξεπέρασαν τη συγκέντρωση των 8000 ng MC-LR eq/l, ενώ οι ενδοκυττάρια μικροκυστινες ξεπέρασαν τη συγκέντρωση των 1000 ng

MC-LR eq/l. Η Λίμνη Καστοριά είναι μια αστική λίμνη, η οποία για πολλά χρόνια μέχρι το 1995 δέχονταν αστικά απόβλητα (Moustaka et al., 2006). Σε αυτή, η άνθηση των κυανοβακτηρίων είναι συνηθισμένο φαινόμενο ενώ οι μικροκυστίνες αποτελούν χαρακτηριστικό συστατικό του νερού της λίμνης (Gkelis et al., 2005). Για πρώτη φορά κυανοτοξίνες στη λίμνη, παρατηρήθηκαν το 1987 (Lanaras et al., 1989), ενώ το 1996 η συγκέντρωση των μικροκυστινών στο νερό της λίμνης αντιστοιχούσε στα 11624 $\mu\text{g/g}$ (Gkelis, 2005).

Μικρότερες συγκεντρώσεις μικροκυστινών προσδιορίστηκαν στις υπόλοιπες λίμνες. Οι λίμνες Βόλβη και Τρικωνίδα ήταν αυτές με τις μικρότερες συγκεντρώσεις. Η Λίμνη Βόλβη χαρακτηρίζεται από περιοδικότητα στο πρότυπο διαδοχής του φυτοπλαγκτού, όμως η μείωση των εισροών οδήγησε σε ανεπιθύμητη αύξηση των κυανοβακτηρίων (Gkelis et al., 2004). Τα αποτελέσματα της παρούσας ενότητας είναι σε συμφωνία με τις μελέτες των Gkelis et al., (2004), οι οποίοι κατέγραψαν τοξικά είδη και χαμηλές συγκεντρώσεις μικροκυστινών στη Λίμνη Βόλβη. Η Λίμνη Τρικωνίδα είναι η μεγαλύτερη φυσική λίμνη στην Ελλάδα και έχει μεγάλη οικολογική και οικονομική σημασία. Η παρουσία κυανοβακτηρίων σε αυτή έχει καταγραφεί από τους Cook et al., (2004) οι οποίοι μέτρησαν μικρό όγκο κυανοβακτηρίων (0.003 $\mu\text{L/L}$).

Οι συγκεντρώσεις των μικροκυστινών που μετρήθηκαν στις ελληνικές λίμνες είναι παραπλήσιες με αυτές που μετρήθηκαν σε άλλες μεσογειακές περιοχές όπως η Τουρκία (1.0-3.65 $\mu\text{g/L}$) (Albay et al., 2003) και η Πορτογαλία (1.0-37.0 $\mu\text{g/L}$), (Ueno et al., 1996). Όμως, είναι μικρότερες από αυτές των λιμνών της Αυστραλίας (3-1800 $\mu\text{g/L}$) (Jones and Orr, 1994) και της Βραζιλίας (1-980 $\mu\text{g/L}$) (Magalhães et al., 2001). Στον Πίνακα 4.4 παρουσιάζονται οι συγκεντρώσεις των μικροκυστινών από λίμνες διαφόρων χωρών.

Πίνακας 4.4 Συγκεντρώσεις μικροκυστινών από διάφορες χώρες**Table 4. 4** Occurrence of microcystins in different countries

Χώρα	Αριθμός δειγμάτων (% τοξικά)	Συγκέντρωση ($\mu\text{g/g}$ ξηρού βάρους ή $\mu\text{g/L}$)	Βιβλιογραφικές αναφορές
Αργεντινή	35 (97)	5.8-2400	Conti et al., 2005
Βραζιλία	7	0.08-3.70	Hirooka et al., 1999
Βραζιλία	50 (18)	0.003-10.0 ($\mu\text{g/L}$)	Hirooka et al., 1999
Χιλή	2 (100)	8-130	Neumann et al., 2000
Χιλή	1 (100)	20	Neumann et al., 2000
Κίνα	6 (100)	24.5-97.3	Zhang et al., 1991; Chen et al., 2005
Γερμανία	11 (100)	500-6500	Ueno et al., 1996
Γερμανία	129 (100)	0.14-119 ($\mu\text{g/L}$)	Fastner, 1998; Chorus et al., 1998
Γερμανία	1 (100)	14700	Kurmayer et al., 2003
Γαλλία	25 (72)	0-5.2 ($\mu\text{g/L}$)	Vezie et al., 1997
Κένυα	4 (100)	310-19822	Mwaura et al., 2004
Κορέα	25 (100)	0-0.2($\mu\text{g/L}$)	Oh et al., 2001
Μαρόκο	9 (89)	700-8800	Sabour et al., 2002
Ολλανδία	48 (96)	0-2420	Janse et al., 2005
Οχάιο(ΗΠΑ)	5 (?)	1200	Hotto et al., 2005;
Φιλιππίνες	3 (100)	649-4019	Cuvin-Aralar et al., 2002

4.5.2 Συγκεντρώσεις μικροκυστινών στους ιστούς του ιχθύος *C. gibelio*

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της παρούσας ενότητας, αποδείχθηκε ότι το είδος *Carassius gibelio* των ελληνικών λιμνών, συσσωρεύει μικροκυστίνες κυρίως στο ήπαρ, αλλά και στους υπόλοιπους ιστούς που εξετάστηκαν. Επιπλέον, παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές στα υδάτινα οικοσυστήματα όσο αναφορά τη συγκέντρωση των μικροκυστινών στους ιστούς του ιχθύος. Είναι πολύ πιθανόν αυτή η διακύμανση να σχετίζεται με το διαφορετικό τροφικό επίπεδο των λιμνών. Αυτό με τη σειρά του επηρεάζει αρκετά χαρακτηριστικά της βιολογίας των ιχθύων (Leonardos & Kagalou, 2005) και πιθανώς την ικανότητά τους να αντιμετωπίζουν τις δυσμενείς επιδράσεις των κυανοβακτηρίων.

Οι ιχθύες συσσωρεύουν μικροκυστίνες στους ιστούς τους κυρίως διαμέσου της διατροφής τους και δευτερευόντως, παθητικά όταν οι τοξίνες περάσουν από τα βράγχια τους (Kankaanpää et al., 2005; Karjalainen et al., 2005; Smith & Haney, 2006; Xie et al., 2005). Τα είδη των ιχθύων που διηθούν το νερό προκειμένου να συλλέξουν την τροφή τους (κυρίως τα πλαγκτονοφάγα είδη), διατρέχουν μεγαλύτερο κίνδυνο να καταναλώσουν τοξικά κυανοβακτήρια, σε σχέση με τα είδη που συλλέγουν επιλεκτικά την τροφή τους (κυρίως τα ιχθυοφάγα και παμφάγα είδη) (Adamovsky et al., 2007). Τα νεαρά άτομα του *Carassius gibelio* καταναλώνουν μεγάλες ποσότητες κυανοβακτηρίων καθώς αυτά αποτελούν μέρος της διαίτας τους (Specziar et al., 1997). Τα μεγαλύτερα άτομα καταναλώνουν συναθροίσεις κυανοβακτηρίων είτε παθητικά, μαζί με την τροφή που επιλέγουν, είτε κατά την διαδικασία της αναπνοής. Τα κυανοβακτήρια που εισέρχονται στον οργανισμό των ιχθύων, λύονται από τα οξέα του πεπτικού συστήματος, απελευθερώνοντας μεγάλες ποσότητες μικροκυστινών (Ernst, 2008).

Καθώς οι μικροκυστίνες είναι πολύ ανθεκτικές στα οξέα και στην ενζυμική αποδόμηση, όταν απελευθερωθούν στο έντερο, η διάσπαση τους πραγματοποιείται πολύ αργά, με αποτέλεσμα να υπάρχει μεγάλη διαθεσιμότητα μικροκυστινών (Ernst, 2008). Οι μικροκυστίνες

απορροφούνται από το επιθήλιο του ειλεού και φτάνουν στη φλεβική κυκλοφορία διαμέσου της μεταφοράς τους από τους μεμβρανικούς μεταφορείς των χολικών οξέων (Boaru et al., 2006; Fischer & Dietrich, 2000; Meier-Abt et al., 2007). Εντούτοις, το ποσοστό της απορρόφησης των μικροκυστινών στο αίμα, εξαρτάται από τη χρονική διάρκεια, τη συγκέντρωση, την οδό έκθεσης και τις χημικές ιδιότητες της κάθε μικροκυστίνης (Bury et al., 1998b; Fischer & Dietrich, 2000; Tencalla, 1994; Williams et al., 1997a; Williams et al., 1995; Xie et al., 2004). Επίσης, το ποσοστό της απορρόφησης των μικροκυστινών επηρεάζεται από τη δομή και το μήκος του εντέρου των ιχθύων. Η πέστροφα, ως σαρκοφάγο είδος, η οποία έχει μικρού μήκους έντερο είναι λιγότερο ευαίσθητη στις μικροκυστίνες σε σύγκριση με τα κυπρινοειδή, όπως το *Carassius gibelio*, τα οποία διαθέτουν πολύ μεγαλύτερο μήκος εντέρου (Fischer & Dietrich, 2000; Tencalla, 1994).

Στην παρούσα έρευνα οι μεγαλύτερες συγκεντρώσεις μικροκυστινών εντοπίστηκαν στο ήπαρ του *Carassius gibelio*. Σε εργαστηριακά πειράματα με κυπρίνους και πέστροφες που εκτέθηκαν σε τοξικά κυανοβακτήρια αποδείχθηκε ότι μεγάλες συγκεντρώσεις μικροκυστινών συσσωρεύθηκαν στο ήπαρ των παραπάνω ιχθύων (Fischer & Dietrich, 2000, Tencalla et al., 1997). Οι ιστοπαθολογικές έρευνες της ιχθυοτοξικότητας των μικροκυστινών στο ήπαρ, έχουν δείξει ηπατοκυτταρική πύκνωση, μεγαλοκύστεις και ηπατοκυτταρική νέκρωση. Αυτά τα παθολογικά ευρήματα συνήθως συνοδεύονται από διήθηση των λευκοκυττάρων και των μακροφάγων, με αποτέλεσμα τη δημιουργία φλεγμονών (Andersen et al., 1993; Bury et al., 1997; Carbis et al., 1996a, 1997; Fischer & Dietrich, 2000; Fournie & Courtney, 2002).

Οι τοξίνες οι οποίες εισέρχονται στο ήπαρ μέσω της ηπατικής πυλαίας φλέβας, απομακρύνονται από τον οργανισμό με μια διαδικασία που ονομάζεται συστηματική ηπατική ελαχιστοποίηση (presystematic hepatic elimination). Σύμφωνα με αυτή, οι τοξίνες που έχουν εισέρθει στο ήπαρ, ελαχιστοποιούνται, όταν οι συνθήκες είναι βέλτιστες. Η διαδικασία αυτή προλαμβάνει ή ελαχιστοποιεί την κατανομή των τοξινών σε άλλα μέρη του σώματος (Klaassen & Watkins, 1984). Εντούτοις, τα

υπόλοιπα όργανα ή οι ιστοί ενός οργανισμού είναι δυνατόν να εκτεθούν στις μικροκυστίνες όταν η παραπάνω διαδικασία κατακλυστεί η παρακαμφθεί από υψηλές συγκεντρώσεις μικροκυστινών (Klaassen & Watkins, 1984). Παρόλαυτα, δεν έχει ακόμα διευκρινιστεί εάν η κατανομή των μικροκυστινών στους υπόλοιπους ιστούς γίνεται μόνο από την παράκαμψη της παραπάνω διαδικασίας, ή και από την απευθείας μεταφορά των μικροκυστινών διαμέσου του αίματος (Carbis et al., 1996b; Fischer & Dietrich, 2000). Παρόλο που το κύριο όργανο-στόχος των μικροκυστινών είναι το ήπαρ, όλα τα άτομα του *Carassius gibelio* που εξετάστηκαν, συσώρευσαν μικροκυστίνες όχι μόνο στο ήπαρ, αλλά και στους υπόλοιπους ιστούς. Έρευνες έχουν αποδείξει την παρουσία των μικροκυστινών στη γαστροεντερική οδό, στους νεφρούς, στα βράγχια, στο αίμα, στη σάρκα και στον εγκέφαλο των ιχθύων (Cazenave et al., 2005; Fischer & Dietrich, 2000; Williams et al., 1995; Xie et al., 2005; Kagalou et al., 2008).

Συγκεντρώσεις μικροκυστινών έχουν εντοπιστεί στους νεφρούς πολλών ειδών ιχθύων όπως στη *Tilapia rendalli* (Magalhaes et al., 2001) και τον *Cyprinus carpio* (Mohamed et al., 2003). Οι υψηλές συγκεντρώσεις μικροκυστινών που εντοπίστηκαν στους νεφρούς του *C. gibelio*, ενισχύουν την άποψη ότι εκτός από την ηπατική παθολογία, οι μικροκυστίνες μπορούν να διεγείρουν και τη νεφρική παθολογία. Σύμφωνα με ιστοπαθολογικές μελέτες, το οπίσθιο μέρος των νεφρών είναι αυτό που επηρεάζεται περισσότερο (Fischer & Dietrich, 2000; Kotak et al., 1996), ενώ έχουν παρατηρηθεί μεσογλοιακά οιδήματα και νέκρωση των επιθηλιακών κυττάρων των νεφρικών σωλήνων (Carbis et al., 1996a; Fischer & Dietrich, 2000; Kotak et al., 1996).

Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι στον εγκέφαλο του *Carassius gibelio* εντοπίστηκε υψηλή συγκέντρωση μικροκυστινών. Προηγούμενες μελέτες έχουν επίσης εντοπίσει μικροκυστίνες στον εγκέφαλο ιχθύων, αλλά η συγκέντρωσή τους ήταν ιδιαίτερα χαμηλή (Fisher & Dietrich 2000; Dietrich & Hoeger 2005; Kankaanpää et al. 2005). Οι υψηλές συγκεντρώσεις μικροκυστινών που εντοπίστηκαν στον εγκέφαλο του ιχθύος, ενισχύουν την άποψη ότι αυτές οι τοξίνες είναι ικανές να

περάσουν τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό. Επίσης, πρόσφατες έρευνες έχουν αποδείξει πολλές αλλαγές στη συμπεριφορά των ιχθύων που εκτέθηκαν σε μικροκυστίνες (Baganz et al., 1998; 2004). Από τα παραπάνω, εγείρονται πολλά ερωτήματα σχετικά με την πιθανή νευροτοξική δράση των μικροκυστινών.

Μικρότερες συγκεντρώσεις μικροκυστινών εντοπίστηκαν στις γονάδες και στη σάρκα του ιχθύος. Η συσσώρευση των μικροκυστινών έχει αποδειχθεί στις γονάδες υδρόβιων ασπόνδυλων οργανισμών, όπως στο γαστερόποδο *Bellamyia aeruginosa* και σε γαρίδες της Λίμνης Chaohu (Chen & Xie, 2005; Zhang et al., 2007). Στους ιχθύες όμως οι αντίστοιχες πληροφορίες είναι ελάχιστες. Συγκεντρώσεις μικροκυστινών στις γονάδες του *Carassius gibelio* της Λίμνης Παμβώτιδας έχουν επίσης εντοπιστεί από τους Kagalou et al., (2008). Οι Zhang et al., (2009), εντόπισαν χαμηλό ποσοστό μικροκυστινών στις γονάδες των ιχθύων *C. carpio* and *C. auratus*. Η συγκέντρωση των μικροκυστινών στις γονάδες των ιχθύων εγκυμονεί πιθανούς κινδύνους για το αναπαραγωγικό σύστημα των ιχθύων, ιδίως όταν αυτοί εκτίθενται συνεχώς στις μικροκυστίνες.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της παρούσας ενότητας, στη σάρκα του ιχθύος *Carassius gibelio*, ανιχνεύθηκαν σημαντικές συγκεντρώσεις μικροκυστινών. Συγκεντρώσεις μικροκυστινών έχουν μετρηθεί στη σάρκα διαφόρων ειδών ιχθύων όπως στο είδος *Hypophthalmichthys molitrix* της Λίμνης Taihu στην Κίνα καθώς και στο είδος *Oncorhynchus Mykiss* της Λίμνης Rotoiti στη Νέα Ζηλανδία. Επίσης, οι Gkelis et al., (2006), ανίχνευσαν το έτος 2000, συγκρίσιμες συγκεντρώσεις μικροκυστινών στη σάρκα των ειδών *Carassius auratus*, *Cyprinus carpio*, *Silurus aristotelis* και *Silurus glanis*, διαφόρων ελληνικών λιμνών. Παρόλαυτα, οι μελέτες σχετικά με τη συγκέντρωση των μικροκυστινών στη σάρκα ιχθύων με εμπορική αξία είναι ελάχιστες (Magalhaes et al., 2001; Xie et al., 2004; Wood et al., 2006). Η σάρκα καθώς αποτελεί το εδώδιμο μέρος του οργανισμού, έχει άμεση συσχέτιση με την πιθανή τοξίκωση του ανθρώπινου πληθυσμού από τις μικροκυστίνες. Το γεγονός αυτό

συνιστά ότι ο έλεγχος των μικροκυστινών στη σάρκα των ιχθύων είναι
υψίστης σπουδαιότητας.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

Υπάρχει συσχέτιση της συγκέντρωσης των μικροκυστινών στους ιστούς ενός ιχθύος των εσωτερικών υδάτων, με το μήκος σώματος του οργανισμού;



5.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Στις εύτροφες λίμνες, τα κυανοβακτήρια αποτελούν πλούσια και άφθονη πηγή θρεπτικών συστατικών για ορισμένα είδη ιχθύων, τα οποία και κυριαρχούν στις παραπάνω λίμνες (Kamujunke et al., 2002; Turker et al., 2003; Bwanika et al., 2004). Εντούτοις, τα παραπάνω είδη ιχθύων βρίσκονται εκτεθειμένα σε σημαντικές ποσότητες μικροκυστινών οι οποίες είναι δυνατόν να συσσωρεύονται στους ιστούς τους (Tencalla & Dietrich, 1997; Mohamed et al., 2003; Zhao et al., 2006).

Η ευαισθησία των ιχθύων στις μικροκυστινές διαφέρει ανάμεσα στα είδη των ιχθύων, αλλά πολλές φορές διαφέρει ακόμα και σε άτομα του ίδιου είδους (Malbrouck & Kestemont 2006). Επιπλέον, ανάμεσα στα άτομα του ίδιου είδους, έχει αποδειχθεί ότι τα νεαρά στάδια των ιχθύων είναι πιο ευαίσθητα στις μικροκυστινές σε σύγκριση με τα ενήλικα άτομα (Oberemm et al., 1999).

Οι ιχθύες του είδους *Rutilus rutilus*, έχουν την ικανότητα να χρησιμοποιούν τα κυανοβακτήρια ως τροφή (Prejs, 1984), και βρίσκονται στη Λίμνη Παμβώτιδα σε μεγάλη αφθονία (Leonardos et al., 2008). Εντούτοις, ο παραπάνω οργανισμός εκτίθεται στις υψηλές συγκεντρώσεις των ενδοκυττάρων και εξωκυττάρων μικροκυστινών της Λίμνης Παμβώτιδας ιδιαίτερα στις περιόδους άνθησης των κυανοβακτηρίων. Η πιθανή συσσώρευση των μικροκυστινών στο σώμα του παραπάνω είδους δεν έχει μελετηθεί σε καμιά λίμνη, στην οποία ενδιαφέρει, όπως επίσης δεν έχει μελετηθεί και η συσχέτιση των συγκεντρώσεων με το μέγεθος ή την ηλικία του ιχθύος.

Σκοπός της παρούσας ενότητας ήταν η ανίχνευση των συγκεντρώσεων των μικροκυστινών σε διάφορους ιστούς του ιχθύος *Rutilus rutilus* της Λίμνης Παμβώτιδας. Επίσης, διερευνήθηκε η πιθανή συσχέτιση των παραπάνω συγκεντρώσεων, με το μήκος σώματος του ιχθύος.

5.2 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

5.2.1 Χαρακτηριστικά του είδους *Rutilus ramosi*

Το είδος *Rutilus ramosi* (δρομίτσα) (Εικόνα 5.1) είναι ενδημικό της Δυτικής Ελλάδας, απειλούμενο και συγκαταλέγεται στα προστατευόμενα είδη σύμφωνα με την ευρωπαϊκή οδηγία EU Habitat Directive 92 / 43 (Kottelat & Freyhof, 2007). Ανήκει στην οικογένεια των *Cyprinidae* (Πίνακας 5.1). Παλαιότερα εμφανίζονταν με το όνομα *Rutilus rubilio* (Daoulas, 1981) και ως *Rutilus ramosi* (Economidis, 1991). Σύμφωνα με τη διατροφή του, ανήκει στους πλαγκτονοφάγους ιχθύες (Bogutskaya & Pliadou, 2006). Η κατανομή του περιλαμβάνει τις Λίμνες Τριχωνίδα, Λυσιμαχία, Αμβρακία και Οζερό όπως επίσης και τον ποταμό Αχελώο (Kotellat & Freyhof, 2007). Στα μέσα της δεκαετίας του 50' άτομα του είδους από τη λίμνη Τριχωνίδα μεταφέρθηκαν στη λίμνη Παμβώτιδα. Εγκαταστάθηκε, εκμεταλλεύθηκε τον κενό θώκο του πλαγκτονοφάγου είδους και σήμερα έχει δημιουργήσει ένα ιδιαίτερα μεγάλο πληθυσμό. (Leonardos et al., 2008). Το είδος θηρεύει το ζωοπλαγκτό και συμβάλει σε μεγάλο βαθμό στην αύξηση των πληθυσμών των φυτοπλαγκτονικών κοινωνιών (Papastergiadou et al., 2010). Η μεγάλη αφθονία του δικαιολογείται από το γεγονός ότι είναι ένα οικολογικά ανθεκτικό είδος το οποίο μπορεί να αναπαραχθεί ακόμα και σε συνθήκες ευτροφισμού (Leonardos et al., 2005).



Εικόνα 5.1. Χαρακτηριστικός εκπρόσωπος του είδους *Rutilus rutilus* (από www.Wikimedia.org)
Figure 5.1. *Rutilus rutilus* (from www.Wikimedia.org)

Πίνακας 5.1. Κατάταξη του ιχθύος *Rutilus rutilus*, σύμφωνα με τους Bogutskaya & Iliadou, (2006).

Table 5.1. Classification of *Rutilus rutilus*, according to Bogutskaya & Iliadou, (2006).

Kingdom	<i>Animalia</i>
Phylum	<i>Chordata</i>
Class	<i>Actinopterygii</i>
Order	<i>Cypriniformes</i>
Family	<i>Cyprinidae</i>
Genus	<i>Rutilus</i>
Species	<i>panosi</i>

Το είδος έχει μικρή εμπορική αξία στις παραλίμνιες περιοχές της Αιτωλοακαρνανίας και της Ηπείρου. Στη περιοχή των Ιωαννίνων και ιδιαίτερα στο νησί, τα νεαρά άτομα μικρού μεγέθους καταναλώνονται σε αντικατάσταση του μικρόσωμου, ιδιαίτερα δημοφιλούς στη περιοχή είδους *Pelagus epiroticus* (τσιμα) το οποίο μάλλον έχει εξαφανιστεί.

Από τα παραπάνω φαίνεται ότι το *Rutilus rutilus* αποτελεί ένα είδος με ιδιαίτερη σημαντική οικολογική, και κάποια μικρή έστω οικονομική αξία.

5.2.2 Συλλογή δειγμάτων ιχθύων

Τα δείγματα συλλέχθηκαν από τη Λίμνη Παμβώτιδα με τη βοήθεια μανωμένων δικτυών με διαφορετικό άνοιγμα ματιού (8 mm, 12 mm, 21 mm και 32 mm), ώστε να εξασφαλιστεί ότι στα δείγματα θα περιλαμβάνονταν όλες οι κλάσεις μεγεθών. Η συλλογή των δειγμάτων έγινε εποχικά κατά τη διάρκεια του 2005. Η κάθε δειγματοληψία ολοκληρωνόταν με τη μεταφορά των ιχθύων στο εργαστήριο, με τη χρήση φορητών ψυγείων.

Στην προσπάθεια ενίσχυσης της εγκυρότητας των αποτελεσμάτων, χρησιμοποιήθηκαν ως αρνητικοί μάρτυρες της παρουσίας των μικροκυστινών, 10 άτομα του είδους *Carassius gibelio*, που προέρχονταν από τεχνητή αναπαραγωγή, όπως αναφέρθηκε σε προηγούμενη ενότητα.

5.2.3 Επεξεργασία και αποθήκευση δειγμάτων

Μετά τη μεταφορά των ιχθύων στο εργαστήριο, αυτοί ζυγίστηκαν με ακρίβεια 0.01g και μετρήθηκε το ολικό μήκος τους με ακρίβεια 0.1cm. Τα παραπάνω άτομα ομαδοποιήθηκαν ανάλογα με την ηλικία τους και την αντιστοιχία μήκους-ηλικίας. Η ηλικία, προσδιορίστηκε διαμέσου της μελέτης των λεπιών που αφαιρέθηκαν από την αριστερή πλευρά του σώματος από την περιοχή που ορίζεται μεταξύ του τέλους του θωρακικού πτερυγίου και της καθέτου που ορίζεται από την έναρξη του ραχιαίου πτερυγίου. Επιλέχθηκε η διερεύνηση των συγκεντρώσεων των μικροκυστινών σε σχέση με το μήκος του σώματος (Πίνακας 5.2), αντί της ηλικίας για το λόγο ότι η συλλογή, εμπορία και κατανάλωση καθορίζονται από το μέγεθος.

Στη συνέχεια έγινε ανατομή 10 ατόμων από κάθε κλάση μήκους και ακολούθησε η λήψη των παρακάτω ιστών: μυϊκός ιστός, νεφρός, ήπαρ και εγκέφαλος. Οι ιστοί ζυγίστηκαν σε ζυγό ακριβείας (0.001g) και διατηρήθηκαν στους -80 °C μέχρι την περαιτέρω επεξεργασία τους.

5.2.4 Εκχύλιση και ποσοτικός προσδιορισμός των μικροκυστινών από τους ιστούς των ιχθύων

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε για την εκχύλιση των μικροκυστινών από τους ιστούς των ιχθύων έχει περιγραφεί αναλυτικά σε προηγούμενη ενότητα. Περιληπτικά περιλαμβάνει την ομογενοποίηση των ιστών σε απόλυτη μεθανόλη (100%), ανάδευση, κατεργασία με υπερήχους, φυγοκέντρηση. Ακολούθησε εξάτμιση της μεθανόλης, επαναδιάλυση σε πολύ μικρό όγκο μεθανόλης, αραιώση των δειγμάτων με απεσταγμένο νερό και διήθηση αυτών διαμέσου μεμβρανώδους ηθμού (Carmichael, 1995; Williams et al., 1997; Magalhães et al., 2001; Sipiä et al., 2002).

Ο ποσοτικός προσδιορισμός των μικροκυστινών που περιέχονταν στους ιστούς των ιχθύων, πραγματοποιήθηκε διαμέσου της ενζυμοσυνδεόμενης ανοσοπροσοροφητικής τεχνικής (ELISA). Η συγκέντρωση των μικροκυστινών που περιέχεται στους ιστούς των ιχθύων, εκφράστηκε ως νανογραμμάρια ισοδυνάμων μικροκυστίνης-LR ανα γραμμάριο ιστού (ng MC-LR eq /g ιστού) (Hawkins et al., 2005).

Πίνακας 5.2. Μέση τιμή(και τυπική απόκλιση) Ολικού Μήκους, Μέση τιμή Βάρους ατόμων του *Rutilus rutilus* διαφορετικών κλάσεων μήκους

Table 5.2. Average total length(and standard deviation) and average mass (and standard deviation) of *Rutilus rutilus* from different length classes

	Χειμώνας		Άνοιξη		Καλοκαίρι		Φθινόπωρο	
	Μέση τιμή Ολικού Μήκους(cm)	Μέση τιμή Βάρους (g)	Μέση τιμή Ολικού Μήκους(cm)	Μέση τιμή Βάρους (g)	Μέση τιμή Ολικού Μήκους(cm)	Μέση τιμή Βάρους (g)	Μέση τιμή Ολικού Μήκους(cm)	Μέση τιμή Βάρους (g)
Πρώτη Κλάση	6.50±1.22	3.05±0.76	8.00±0.92	3.94±1.01	8.73±1.94	5.19±1.47	9.12±1.14	7.23±1.92
Δεύτερη Κλάση	10.20±1.31	11.05±2.13	11.33±1.87	13.11±2.23	11.63±1.56	14.78±2.90	12.02±2.37	13.54±2.43
Τρίτη Κλάση	14.90±1.56	43.25±3.91	16.89±2.13	51.80±2.19	18.08±2.08	65.96±2.45	19.43±2.15	72.32±2.61
Τέταρτη Κλάση	19.60±2.13	114.30±2.56	22.19±2.98	126.33±2.76	23.90±2.24	187.84±1.87	24.60±1.96	215.65±2.94

5.3. ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ

Η στατιστική επεξεργασία των δεδομένων έγινε με τη χρήση του στατιστικού προγράμματος SPSS 17.0 for Windows. Το Γενικό Γραμμικό Μοντέλο (GLM) χρησιμοποιήθηκε για την εξέταση σημαντικών διαφορών μεταξύ των διαφορετικών κλάσεων μήκους του ιχθύος, των ιστών και των εποχών ως προς τη συγκέντρωση των μικροκυστινών.

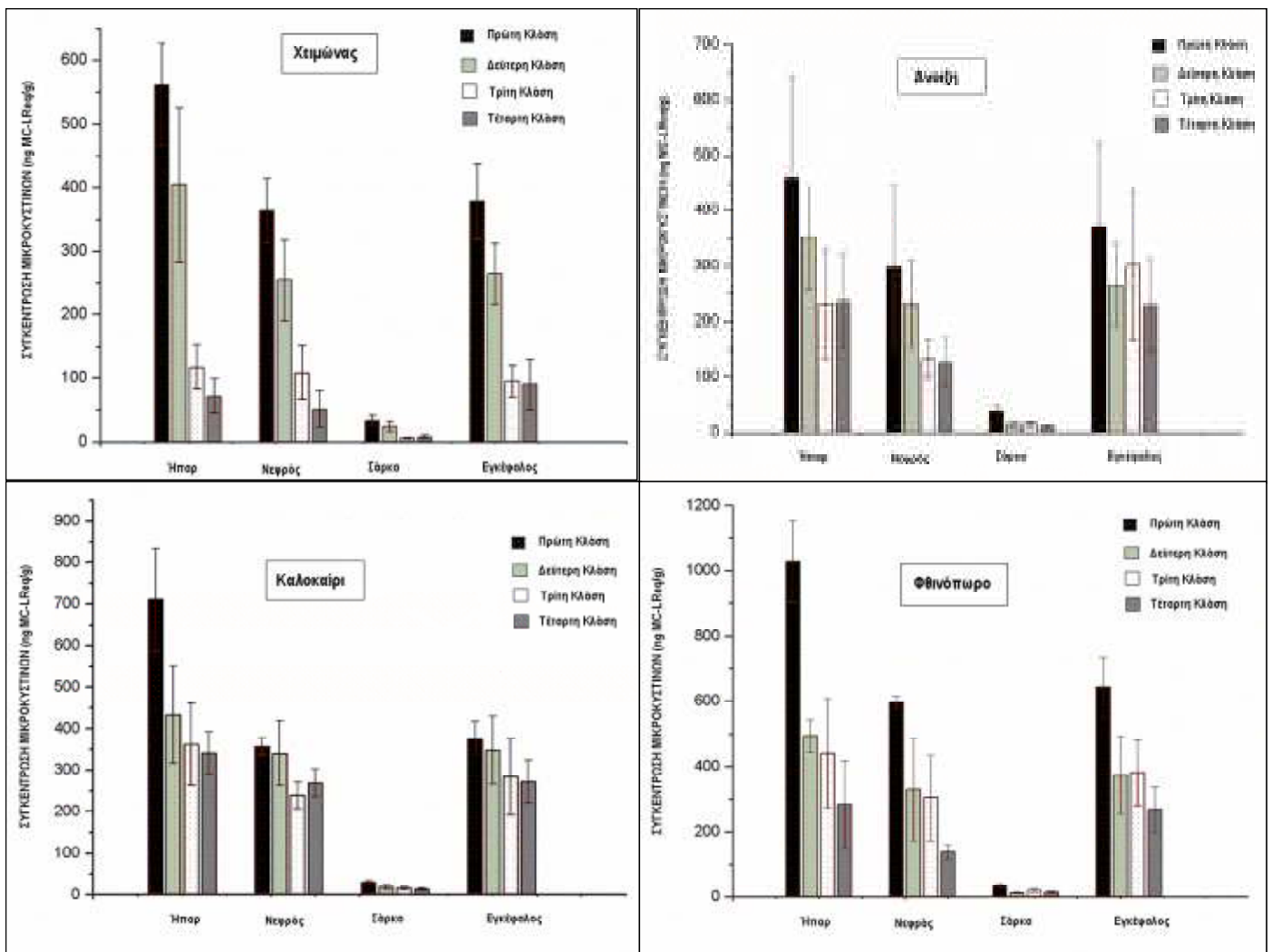
Η Ανάλυση Συσχέτισης (Correlation Analysis) κατά Spearman χρησιμοποιήθηκε για την εξεύρεση πιθανών συσχετίσεων των συγκεντρώσεων των μικροκυστινών των ιστών με τις διάφορες κλάσεις μήκους των ιχθύων.

5.4 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Ο προσδιορισμός της ηλικίας των ιχθύων διαμέσου της μελέτης των λεπιών, έδειξε ότι τα άτομα της πρώτης κλάσης ηλικίας είχαν μήκος 6.50cm-9.12cm, της δεύτερης κλάσης ηλικίας είχαν μήκος 10.20 cm - 12.02 cm, της τρίτης 14.90 cm -19.43 cm και της τέταρτης 19.60-24.60 (Πίνακας 5.2).

Όλα τα άτομα που εξετάστηκαν, βρέθηκε ότι συσώρευσαν στους ιστούς τους ποσότητες μικροκυστινών. Αντιθέτως, στους ιστούς των ατόμων που χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες, δεν ανιχνεύθηκαν μικροκυστίνες.

Στην εικόνα 5.2 παρουσιάζεται η κατανομή της συγκέντρωσης των μικροκυστινών στους ιστούς σε σχέση με την κλάση μεγέθους, κατά τη διάρκεια των τεσσάρων εποχών του έτους. Η ανάλυση του γενικού γραμμικού μοντέλου (GLM) έδειξε ότι υπήρχαν σημαντικές διαφορές στις συγκεντρώσεις των μικροκυστινών στους ιστούς του σώματος ($F=691.48$; $df=3$; $P<0.05$), σε σχέση με τις κλάσεις μήκους (και κατά συνέπεια ηλικίας) ($F=277.78$; $df=3$; $P<0.05$) και τις εποχές του έτους ($F=126.42$; $df=3$; $P<0.05$). Επιπλέον σημαντικές διαφορές διαπιστώθηκαν και ως προς την αλληλεπίδραση εποχής και κλάσης μεγέθους όσον αφορά τη συγκέντρωση των μικροκυστινών ($F=21.66$; $df=9$; $P<0.05$). (Πίνακας 5.3).



Εικόνα 5.2. Συγκέντρωση μικροκυστινών (ng MC-LR eq/g) στους ιστούς του *Rutilus panosi* σε σχέση με την κλάση μεγέθους, κατά τη διάρκεια Α) του χειμώνα, Β) της άνοιξης, Γ) του καλοκαιριού και Δ) του φθινοπώρου.

Figure 5.2. Microcystin Concentration (ng MC-LR eq/g) in fish tissues of *Rutilus panosi* of different Length Classes, during: A) Winter, B) Spring, C) Summer and D) Autumn.

Πίνακας 5.3 Αποτελέσματα Γενικού Γραμμικού Μοντέλου
Table 5.3 Results from General Linear Model

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	2,606E7	63	413604,192	65,566	,000
Intercept	3,938E7	1	3,938E7	6242,708	,000
season	2392494,531	3	797498,177	126,423	,000
class	5257000,347	3	1752333,449	277,787	,000
tissue	1,309E7	3	4362021,546	691,486	,000
season * class	1241440,158	9	137937,795	21,866	,000

Μεταξύ των ιστών, οι υψηλότερες συγκεντρώσεις μικροκυστινών εντοπίστηκαν στο ήπαρ (τον χειμώνα: 288.46 ± 34.87 ngMC-LR eq/g, την άνοιξη: 320.29 ± 41.31 ngMC-LReq/g, το καλοκαίρι: $462.03.53 \pm 32.98$ ng/g και το φθινόπωρο: 561.13 ± 42.12 ngMC-LR eq/g).

Ο εγκέφαλος ήταν ο ιστός ο οποίος ακολουθούσε (τον χειμώνα: 206.57 ± 17.92 ngMC-LR eq/g, την άνοιξη: 291.96 ± 42.98 ngMC-LR eq/g, το καλοκαίρι: 320.40 ± 81.76 ngMC-LReq/g και το φθινόπωρο: 416.08 ± 47.33 ngMC-LR eq/g).

Στους νεφρούς εντοπίστηκαν οι αμέσως επόμενες χαμηλότερες συγκεντρώσεις μικροκυστινών (τον χειμώνα: 194.32 ± 14.96 ngMC-LR eq/g, την άνοιξη: 197.56 ± 45.71 ngMC-LR eq/g, το καλοκαίρι: 301.73 ± 32.17 ngMC-LR eq/g και το φθινόπωρο: 542.20 ± 54.26 ngMC-LR eq/g).

Στον μυϊκό ιστό τέλος, εντοπίστηκαν οι χαμηλότερες συγκεντρώσεις μικροκυστινών (τον χειμώνα: 17.30 ± 2.74 ngMC-LR eq/g, την άνοιξη: 18.94 ± 4.91 ngMC-LR eq/g, το καλοκαίρι: 19.76 ± 3.13 ngMC-LR eq/g και το φθινόπωρο: 20.15 ± 3.64 ngMC-LR eq/g). Η συγκέντρωση των μικροκυστινών στους ιστούς των ιχθύων εμφάνισε σημαντική αρνητική συσχέτιση με τις κλάσεις μήκους των ιχθύων ($P < 0.05$, $r = -0.92$).

5.5 ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Τα είδη του γένους *Rutilus* κατέχουν ένα σημαντικό ρόλο στις εύτροφες λίμνες, καθώς έχουν την ικανότητα να τρέφονται με πολλά είδη τροφής όταν οι συνθήκες είναι ιδιαίτερα ανταγωνιστικές (Persson 1983; Brabrand, 1985). Επιπλέον, μελέτες έχουν αποδείξει τη σημασία των πλαγκτονοφάγων ειδών στη βιολογική διαχείριση της άνθησης των κυανοβακτηρίων (Opuszynski & Shireman, 1995; Xie & Liu, 2001). Εντούτοις, η γνώση της επίδρασης των τοξικών κυανοβακτηρίων στα παραπάνω είδη, είναι περιορισμένη και βασίζεται κυρίως σε εργαστηριακές μελέτες (Kamjunke et al., 2002a, b).

Το ήπαρ του *R. panosi*, ως όργανο-στόχος των μικροκυστινών, συσσωρεύει τις υψηλότερες συγκεντρώσεις. Η παράκαμψη της συστηματικής ηπατικής ελαχιστοποίησης των μικροκυστινών αλλά πιθανώς και η απευθείας μεταφορά των τοξινών μέσω του αίματος (Carbis et al., 1996b; Fischer & Dietrich, 2000), οδήγησαν στη συσσώρευση αυτών και στα υπόλοιπα όργανα. Οι συγκεντρώσεις των μικροκυστινών στους ιστούς, φάνηκε ότι ήταν υψηλότερες από τις αντίστοιχες συγκεντρώσεις στους ιστούς του είδους *Carassius gibelio* στην ίδια λίμνη (Παμβώτιδα), οι τιμές των οποίων αναφέρονται σε προηγούμενη ενότητα. Η παραπάνω διαφορά, πιθανώς οφείλεται στο γεγονός ότι τα κυανοβακτήρια αποτελούν βασικό συστατικό στη διαίτα του *R. panosi*, (Prejs, 1984), ενώ αντιθέτως στο είδος *C. gibelio* τα κυανοβακτήρια προσλαμβάνονται, εμμέσως, από τη διήθηση του νερού που γίνεται στην προσπάθεια του οργανισμού να συλλέξει την τροφή του (Xie et al., 2005). Οι Gkelis et al., (2006), επίσης μελέτησαν τη συσσώρευση των μικροκυστινών στα σπλάχνα του *R. panosi* της Λίμνης Παμβώτιδας. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της παραπάνω μελέτης, εντοπίστηκαν 391 ng MC-LReq/g ιστών (Gkelis et al., 2006).

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της παρούσας ενότητας, παρατηρήθηκε μια εποχιακή διακύμανση της συγκέντρωσης των μικροκυστινών στους ιστούς του *R. panosi* (Εικόνα 5.2). Εποχιακές

διακυμάνσεις της συγκέντρωσης των μικροκυστινών έχουν παρατηρηθεί και στους ιστούς του είδους *Tilapia rendalli*, των εσωτερικών υδάτων της Βραζιλίας (Magalhaes et al., 2001). Οι παραπάνω διακυμάνσεις πιθανώς αντανakλούν τις εποχιακές διακυμάνσεις των ενδοκυττάρων και εξωκυττάρων μικροκυστινών των εσωτερικών υδάτων. Οι Kagalou et al., (2008), απέδειξαν την παρουσία ενδοκυττάρων και εξωκυττάρων μικροκυστινών στο νερό της Λίμνης Παμβώτιδας κατά τη διάρκεια του έτους 2005. Οι συγκεντρώσεις των παραπάνω μικροκυστινών χαρακτηρίζονταν από εποχιακή διακύμανση, καθώς υψηλότερες συγκεντρώσεις μικροκυστινών εντοπίστηκαν στο νερό της λίμνης κατά τη διάρκεια των θερμών μηνών (Kagalou et al., 2008). Επίσης, οι Gkelis et al., (2006), απέδωσαν τη χρονική διακύμανση των συγκεντρώσεων των μικροκυστινών σε διάφορα είδη ιχθύων των ελληνικών λιμνών, σε αντίστοιχη διακύμανση των συγκεντρώσεων των ενδοκυττάρων και εξωκυττάρων μικροκυστινών των παραπάνω λιμνών. Φαίνεται όμως ότι οι διακυμάνσεις σχετίζονται με την οντογενετική ανάπτυξη, καθώς και με τις μεταβολές στις διατροφικές συνήθειες.

Η μελέτη της συσσώρευσης των μικροκυστινών στους ιστούς του *R. rapanosi* διαφορετικών κλάσεων μήκους, απέδειξε ότι τα μικρού μεγέθους άτομα συσσώρευσαν υψηλότερες συγκεντρώσεις μικροκυστινών σε σχέση με τα μεγαλύτερα άτομα. Είναι γνωστό ότι τα νεαρά στάδια είναι πιο ευαίσθητα στις κυανοτοξίνες σε σχέση με τα ενήλικα άτομα (Oberemm et al., 1999). Αυτή η ευαισθησία πιθανώς προέρχεται από το γεγονός ότι αυτά έχουν πολύ λεπτή επιδερμική στοιβάδα, μεγαλύτερη επιφάνεια σώματος σε σχέση με τον όγκο τους (Malbrouck & Kestemont, 2006) και μεγαλύτερο μεταβολικό ρυθμό (Von Westernhagen, 1988).

Η συσσώρευση των μικροκυστινών στους υδρόβιους οργανισμούς εξαρτάται κατά κύριο λόγο από το ποσό των μικροκυστινών που περιέχεται στη τροφή τους (Malbrouck & Kestemont, 2006). Οι Magalhaes et al. (2003), παρατήρησαν ότι στη Λίμνη Sepetiba της Βραζιλίας οι συγκεντρώσεις των ενδοκυττάρων μικροκυστινών, συσχετιζόνταν θετικά με τις συγκεντρώσεις των μικροκυστινών στη σάρκα των ιχθύων. Σύμφωνα με τα παραπάνω, οι διαφορετικές διαιτητικές

απαιτήσεις των νεαρών και ενήλικων ατόμων του *R. panosi* (Niederholzer & Hofer, 1980; Eie & Borgström, 1981; Brabrand, 1985; Rask, 1989; Horrpila, 1994), πιθανώς σχετίζονται με τον διαφορετικό ποσοστό συσσώρευσης των μικροκυστινών ανάμεσα στα διαφορετικού μεγέθους άτομα.

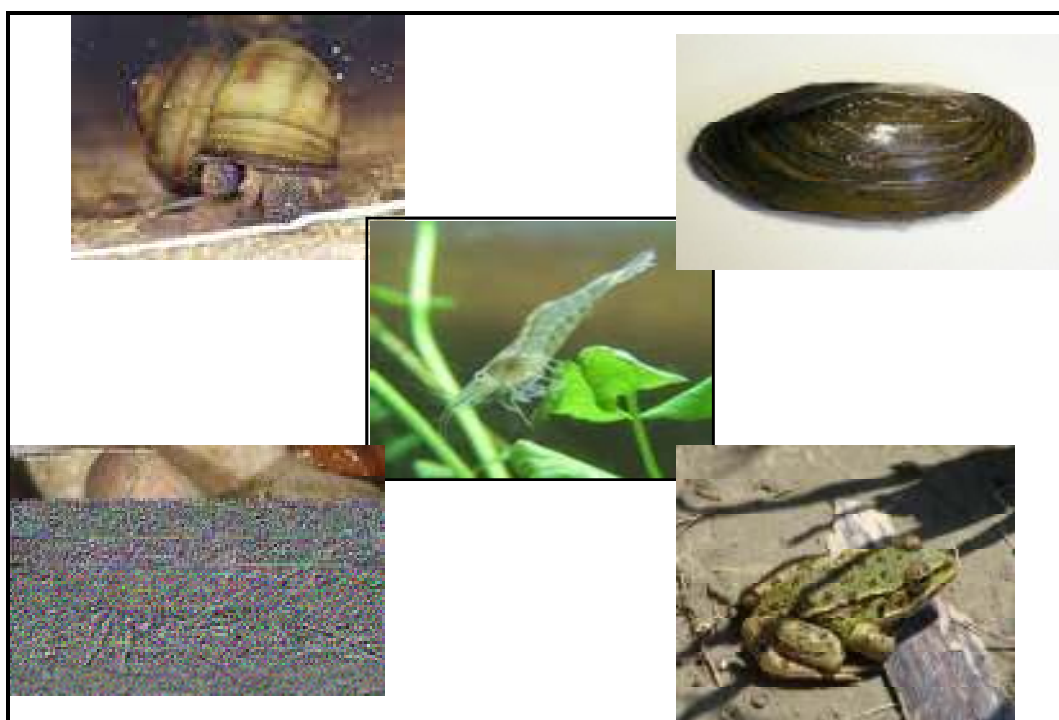
Ο Prejs (1984), απέδειξε ότι το είδος *Rutilus rutilus* από τρεις εύτροφες λίμνες της Πολωνίας στηρίζονταν σε διαιτολόγιο στο οποίο οι φυτοπλαγκτονικοί οργανισμοί είχαν διαφορετικό ποσοστό συμμετοχής ανάλογα με το μέγεθος των ατόμων. Τα άτομα με μικρότερο μέγεθος, τρέφονταν σε μεγαλύτερο ποσοστό (70-90%) με νηματοειδείς φυτοπλαγκτονικούς οργανισμούς, σε σχέση με τα μεγαλύτερα μεγέθους άτομα (60%). Ο Daoulas (1981), μελέτησε την τροφική συμπεριφορά του *R. panosi* από την Λίμνη Τριχωνίδα και απέδειξε ότι επιλέγει διαφορετικό είδος τροφής ανάλογα με το μήκος του. Τα άτομα με μικρότερο μήκος τρέφονται κυρίως με φυτοπλαγκτό, ενώ τα άτομα με μεγαλύτερο μέγεθος τρέφονται κυρίως με ζωικούς οργανισμούς, όπως τα μαλάκια. Το φυτοπλαγκτό της Λίμνης Παμβώτιδας αποτελείται κυρίως από κυανοβακτήρια (Kagalou et al., 2008; Vareli et al., 2009), με αποτέλεσμα να είναι πολύ πιθανή η κατανάλωσή τους από τα μικρού μεγέθους άτομα του *R. panosi*, και κατά συνέπεια η συσσώρευση σε αυτά υψηλών συγκεντρώσεων μικροκυστινών.

Ιδιαίτερης βαρύτητας για την υψηλότερη συγκέντρωση των μικροκυστινών στα άτομα μικρότερου μεγέθους είναι και το γεγονός της διαφορετικής αποτελεσματικότητας του μηχανισμού αποτοξίκωσης των νεαρών και ενήλικων ιχθύων. Ο μηχανισμός αποτοξίκωσης πραγματοποιείται σε πολλούς οργανισμούς και τους επιτρέπει να επιβιώνουν κάτω από συνθήκες καταπόνησης (Pflugmacher et al., 1998; 2001). Οι μικροκυστινές μπορούν να μεταβολιστούν σε λιγότερο τοξικές ενώσεις, μετά από την συμπλοκοποίηση τους με τη γλουταθειονίνη διαμέσου ενζύμων όπως η γλουταθειονική τρανσφεράση ή η γλουταθειονική υπεροξειδάση (Pflugmacher et al., 1998). Η αποτελεσματικότητα της γλουταθειονικής υπεροξειδάσης εξαρτάται κατά κύριο λόγο από το μέγεθος του ατόμου, όπως έχει ήδη αποδειχθεί σε

άλλες τοξικές ενώσεις που προσβάλουν τους ιχθύες (Egaas et al., 1999). Από τα παραπάνω προκύπτει ότι οι υψηλότερες συγκεντρώσεις μικροκυστινών στα άτομα με μικρότερο μέγεθος μπορεί να είναι αποτέλεσμα του λιγότερου αναπτυγμένου ανοσοποιητικού τους συστήματος και κατά συνέπεια της μικρότερης αποτελεσματικότητας του μηχανισμού αποτοξίκωσης από τις μικροκυστίνες.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6

Δυναμική των συγκεντρώσεων των μικροκυστινών στους υδρόβιους οργανισμούς της Λίμνης Παμβώτιδας.



6.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Λαμβάνοντας υπ'όψιν τη δυναμική των τοξικών κυανοβακτηρίων και την έντονη παρουσία μικροκυστινών, είναι κατανοητό το γεγονός της ευρείας επίδρασής τους σε οργανισμούς διαφορετικών τροφικών επιπέδων. Η τοξικότητα των κυανοβακτηρίων είναι καλά μελετημένη σε χερσαίους οργανισμούς, λόγω της συσχέτισής τους με την πιθανή απειλή της ανθρώπινης υγείας (Martins & Vasconcelos, 2009). Οι χερσαίοι οργανισμοί είναι δυνατόν να εκτεθούν στις μικροκυστινές διαμέσου επιβαρυμένου νερού ή επιβαρυμένης τροφής (Briand et al., 2003; Dietrich & Hoeger, 2005). Ενώ, οι υδρόβιοι οργανισμοί εκτίθενται στις μικροκυστινές διαμέσου πολλαπλών οδών και η διάρκεια της έκθεσής τους είναι μεγαλύτερη σε σύγκριση με τους χερσαίους οργανισμούς (Ernst, 2008).

Οι ζωοπλαγκτονικοί οργανισμοί αποτελούν πολύ σημαντικό κρίκο ανάμεσα στους πρωτογενείς παραγωγούς και στους καταναλωτές των υδάτινων οικοσυστημάτων (Wetzel, 2001). Επομένως, το ζωοπλαγκτόν είναι δυνατόν να δράσει ως «διαμεσολαβητής» των μικροκυστινών προς τα ανώτερα επίπεδα της υδρόβιας τροφικής αλυσίδας (Ibelings et al., 2005, Chen et al., 2005). Εντούτοις, σημαντικοί οργανισμοί στη μεταφορά των μικροκυστινών διαμέσου της τροφικής αλυσίδας θεωρούνται και άλλοι οργανισμοί, όπως τα δίθυρα. Οι παραπάνω οργανισμοί είναι δυνατόν να συσσωρεύουν στο σώμα τους υψηλές συγκεντρώσεις μικροκυστινών ως διηθηματοφάγοι οργανισμοί (Yokoyama & Park, 2002; Wood et al., 2006). Από τους υπόλοιπους ασπόνδυλους υδρόβιους οργανισμούς σημαντικές ποσότητες μικροκυστινών έχει βρεθεί ότι συσσωρεύονται στα γαστερόποδα (Kotak et al., 1996; Zurawell et al., 1999; Ozawa et al., 2003) και σε ορισμένα καρκινοειδή όπως οι κολυμβητικά και βαδιστικά δεκάποδα (Zimba et al., 2006).

Από τους υδρόβιους σπονδυλωτούς οργανισμούς, οι ιχθύες είναι δυνατόν να επηρεάζονται σε υψηλό βαθμό από τις συγκεντρώσεις των μικροκυστινών, καθώς αυτοί βρίσκονται στην κορυφή της τροφικής αλυσίδας (Xie et al., 2005). Καθώς οι ιχθύες αποτελούν σημαντική πηγή τροφής, η συσσώρευση των μικροκυστινών σε αυτούς είναι δυνατόν να

οδηγήσει σε σοβαρές οικονομικές απώλειες που σχετίζονται με τις ιχθυοκαλλιέργειες (Andersen et al., 1993; Kent, 1990; Toranzo et al., 1990; Zimba et al., 2001). Η επίδραση των μικροκυστινών στα αμφίβια είναι ελάχιστα μελετημένη παρόλο που αυτοί οι οργανισμοί μπορούν να δράσουν ως οργανισμοί-μοντέλα σε διάφορες τοξικολογικές μελέτες (Tyler, 1999).

Σκοπός της παρούσας ενότητας ήταν η ανίχνευση των συγκεντρώσεων των μικροκυστινών σε διάφορους υδρόβιους οργανισμούς της Λίμνης Παμβώτιδας. Επιπλέον έγινε προσπάθεια εκτίμησης της πιθανής βιομεγένθυσης των μικροκυστινών διαμέσου της τροφικής αλυσίδας.

6.2 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

6.2.1. Περιοχή μελέτης

Η μελέτη πραγματοποιήθηκε στη Λίμνη Παμβώτιδα, αναλυτική περιγραφή της οποίας έχει γίνει σε προηγούμενη ενότητα.

6.2.2. Περιγραφή δειγματοληψιών

Προκειμένου να πραγματοποιηθεί η παρούσα μελέτη, έλαβαν χώρα δειγματοληψίες α) φυτοπλαγκτού, β) ζωοπλαγκτού, γ) διθύρων, δ) γαστερόποδων, ε) κολυμβητικών δεκάποδων, στ) βαδιστικών δεκάποδων, ζ) ιχθύων και η) αμφιβίων. Οι δειγματοληψίες πραγματοποιήθηκαν τη θερινή και χειμερινή περίοδο του 2008 (Αύγουστος και Ιανουάριος αντίστοιχα). Οι δυο περίοδοι δειγματοληψίας επιλέχθηκαν προκειμένου να ελεγχθεί και να συγκριθεί η δυναμική της συγκέντρωσης των μικροκυστινών στους υδρόβιους οργανισμούς, κατά τη διάρκεια άνθησης των κυανοβακτηρίων (Αύγουστος) και κατά τη διάρκεια της μικρότερης αφθονίας τους (Ιανουάριος).

6.2.2.1 Συλλογή φυτοπλαγκτού και επιπολασμών κυανοβακτηρίων

Προκειμένου να πραγματοποιηθεί ο ποιοτικός προσδιορισμός των κυανοβακτηρίων, διηθήθηκαν συνολικά 200l νερού από έναν παρόχθιο σταθμό σημαντικής οικολογικής σπουδαιότητας, στην περιοχή του Περάματος (39° 41' 21 36''N, 20° 50' 38 66''E), ο οποίος φιλοξενεί μεγάλη ποικιλία νεαρών υδρόβιων οργανισμών, καρκινοειδών, ιχθύων και γαστερόποδων. Η διήθηση πραγματοποιήθηκε δυο φορές τον μήνα Αύγουστο και δυο φορές τον μήνα Ιανουάριο, με τη βοήθεια πλαγκτονικού διχτυού (27μm). Το προσυγκεντρωμένο δείγμα που προέκυψε (όγκου 50 ml), διατηρήθηκε σε διάλυμα φορμαλδεΐδης 37%, προκειμένου να πραγματοποιηθεί η μικροσκοπική παρατήρηση του σε ανάστροφο μικροσκόπιο Zeiss (Axiovert 40 CFL), σύμφωνα με το ταξινομικό σύστημα των Anagnostidis & Komarek (1985, 1988) και Komarek & Anagnostidis (1986, 1989).

Επιπλέον, από τον ίδιο σταθμό, την ίδια χρονική περίοδο, συλλέχθηκαν δείγματα με επιπολασμούς κυανοβακτηρίων (αθροίσεις κυανοβακτηρίων) από το επιφανειακό στρώμα νερού του σταθμού με δοχεία χωρητικότητας 250 ml. Ο συνολικός όγκος που συλλέχθηκε ήταν 40 l και ακολούθησε η λυοφιλοποίηση του σε συσκευή λυοφίλισης τύπου ALPHA 1-4 (Martin Christ, Gefriertrocknungsan-langen GmbH) σε θερμοκρασία και πίεση που κυμαινόταν από -49 έως -54 °C και 0.10 έως 0.03 mbar, αντίστοιχα. Η χρονική διάρκεια της λυοφίλισης ήταν 72 h. Τα λυοφιλοποιημένα δείγματα αποθηκεύτηκαν στους -20 °C μέχρι την εκχύλισή τους και τον ποσοτικό προσδιορισμό των μικροκυστινών που περιέχονταν σε αυτά.

6.2.2.2 Συλλογή ζωοπλαγκτού

Η συλλογή του ζωοπλαγκτού έλαβε χώρα στον ίδιο σταθμό δειγματοληψίας με αυτόν του φυτοπλαγκτού. Η συλλογή πραγματοποιήθηκε δυο φορές τον μήνα Αύγουστο και δυο φορές τον μήνα Ιανουάριο. Διηθήθηκαν συνολικά 200l νερού με τη βοήθεια πλαγκτονικού διχτυού (150 μm). Το προσυγκεντρωμένο δείγμα που προέκυψε (όγκου 100 ml), χωρίστηκε σε δύο ίσα μέρη (όγκου 50 ml, το

καθένα). Το ένα μέρος διατηρήθηκε σε διάλυμα φορμαλδεΐδης 37%, προκειμένου να πραγματοποιηθεί η μικροσκοπική παρατήρησή του. Το άλλο μέρος χρησιμοποιήθηκε για το διαχωρισμό του ζωοπλαγκτού από το φυτοπλαγκτόν και τελικά για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης των μικροκυστινών στους ζωοπλαγκτονικούς οργανισμούς.

6.2.2.2.1 Ποιοτικός προσδιορισμός ζωοπλαγκτού

Τα δείγματα του ζωοπλαγκτού που διατηρήθηκαν στο διάλυμα της φορμόλης χωρίστηκαν σε υποδείγματα μεγέθους ίσου με το 1/16 και 1/32 του αρχικού δείγματος. Ο χωρισμός των υποδειγμάτων έγινε με εμπειρική μέθοδο. Η μέθοδος αυτή συνίσταται στη συνεχή ανάμειξη του δείγματος με τη βοήθεια δυο ποτηριών ζέσης (ίδιου όγκου κάθε φορά) και το γρήγορο χωρισμό του σε δύο ίσα μέρη. Κάθε φορά το ένα από τα δύο υποδείγματα χωριζόταν σε ακόμη μικρότερα κλάσματα (1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32). Τα είδη με μεγάλη αφθονία μετρούνταν σε κάποιο από τα άλλα υποδείγματα μέχρι την καταμέτρηση τουλάχιστον 100 ατόμων. Πάντως, από την καταμέτρηση των ειδών στα δύο τελικά υποδείγματα 1/16 ή 1/32, αναλόγως της αφθονίας, μπορούσε να γίνει επαλήθευση της ακρίβειας του διαχωρισμού του αρχικού συντηρημένου δείγματος. Ο προσδιορισμός των ειδών έγινε σε μικροσκόπιο Zeiss Axioskop 40 με προσοφθάλμιους φακούς x 20, με τη βοήθεια ενός ειδικά διαμορφωμένου, πλακιδίου καταμέτρησης ζωοπλαγκτού τύπου Bogorov-trough, διαστάσεων 80x100mm χωρητικότητας έως 22ml, από υλικό Plexiglas. Για τον προσδιορισμό των ζωοπλαγκτονικών ειδών χρησιμοποιήθηκαν τα εγχειρίδια των Tregouboff & Rose (1957), Le Cren (1978) και Mizuno (1990).

6.2.2.2.2 Διαχωρισμός ζωοπλαγκτού από το φυτοπλαγκτό

Προκειμένου να προσδιοριστεί η συγκέντρωση των μικροκυστινών στους ζωοπλαγκτονικούς οργανισμούς της Λίμνης Παμβώτιδας, πραγματοποιήθηκε ο διαχωρισμός του ζωοπλαγκτού από το φυτοπλαγκτό. Ο διαχωρισμός έγινε σύμφωνα με τη μέθοδο των Kotak et

al., (1996) και Ibelings et al., (2005). Σύμφωνα με αυτή, ένα μέρος (50ml) των προσυγκεντρωμένων δειγμάτων που προέκυψαν από τη διήθηση του νερού της λίμνης με τη βοήθεια του πλαγκτονικού δικτυού, επαναδιαλύθηκε σε 1l απιονισμένου νερού και εμπλουτίστηκε με H₂CO₃ για να αναισθητοποιηθούν οι ζωοπλαγκτονικοί οργανισμοί. Στη συνέχεια το ερμητικό κλείσιμο των δοχείων οδήγησε το ζωοπλαγκτόν στον πυθμένα του δοχείου και τα κυανοβακτήρια στην επιφάνεια. Ακολούθησε η απομάκρυνση των κυανοβακτηρίων από την επιφάνεια με τη βοήθεια σιφωνίου, χωρίς να αναταράσσεται το δείγμα. Έπειτα πραγματοποιήθηκε η επαναδιάλυση του δείγματος με απιονισμένο νερό και η παραπάνω διαδικασία της προσθήκης του H₂CO₃ -κλεισίματος του δοχείου-απομάκρυνσης των κυανοβακτηρίων επαναλήφθηκε τρεις φορές. Η απομακρύνση των κυανοβακτηρίων επιβεβαιώθηκε με την μικροσκοπική παρατήρηση του δείγματος. Το δείγμα που προέκυψε και το οποίο περιείχε μόνο τους ζωοπλακτονικούς οργανισμούς, λυοφιλοποιήθηκε και στη συνέχεια συντηρήθηκε στους -20°C μέχρι την περαιτέρω επεξεργασία του, για τον ποσοτικό προσδιορισμό των μικροκυστινών.

6.2.2.3 Συλλογή μακροασπόνδυλων οργανισμών

Τον Αύγουστο και τον Ιανουάριο του 2008, συλλέχθηκαν αντιπροσωπευτικοί υδρόβιοι μακροασπόνδυλοι οργανισμοί της Λίμνης Παμβώτιδας, προκειμένου να εξεταστούν ως προς το περιεχόμενό τους σε μικροκυστίνες. Από αυτούς τους οργανισμούς, τα κολυμβητικά δεκάποδα (*Atyaephyra desmaresti*) (Εικόνα 6.1) συλλέχθηκαν στην παρόχθια ζώνη της λίμνης με τη βοήθεια απόχης, τα γαστερόποδα (*Viviparus contectus*) (Εικόνα 6.2) με προσεκτική συλλογή, ενώ τα δίθυρα (*Anodonta cygnea*) (Εικόνα 6.3) και τα βαδιστικά δεκάποδα (*Astacus astacus*) (Εικόνα 6.4) συλλέχθηκαν από τοπικούς επαγγελματίες αλιείς. Τη μεταφορά τους στο εργαστήριο ακολούθησε ο προσδιορισμός τους σύμφωνα με τον Hendrickx (1995). Δέκα άτομα από καθένα από τα παραπάνω είδη ζυγίστηκαν με ακρίβεια 0.01g. Στη συνέχεια έγινε ανατομή των караβίδων και των δίθυρων. Από τις караβίδες πραγματοποιήθηκε η λήψη των παρακάτω ιστών: βράγχια,

ηπατοπάγκρεας, εγκέφαλος, σάρκα, στόμαχος, γονάδες. Από τα δίθυρα πραγματοποιήθηκε η λήψη των παρακάτω ιστών: βράγχια, ηπατοπάγκρεας, πόδας, μανδύας, στόμαχος. Οι ιστοί ζυγίστηκαν σε ζυγό ακριβείας (0.001g) και διατηρήθηκαν στους -80 °C μέχρι την περαιτέρω επεξεργασία τους. Από τις γαρίδες και τα γαστερόποδα, δεν πραγματοποιήθηκε η λήψη ξεχωριστών ιστών, καθώς εξετάστηκε ολόκληρο το σώμα τους.



Ανήκει στην οικογένεια των *Atyidae* και συναντάται στα εσωτερικά ύδατα της Ευρώπης, της Βόρειας Αμερικής και της Μέσης Ανατολής (Anastasiadou, 2004). Στην Ελλάδα, έχει παρατηρηθεί στα εσωτερικά ύδατα των δυτικών περιοχών (Anastasiadou, 2004). Ζει σε καλά οξυγονομένα περιβάλλοντα και τρέφεται με φυτοπλαγκτόν και αποσυντιθέμενα υλικά (Anastasiadou, 2004).

Εικόνα 6.1. Άτομο *Atyaephyra desmaresti*

Figure 6.1. *Atyaephyra desmaresti*

(from www.Ittiofauna.org)



Ανήκει στην οικογένεια των *Viviparidae* και είναι γαστερόποδο των εσωτερικών υδάτων. Συναντάται κυρίως στην Ευρώπη και στη Δυτική Σιβηρία. Χαρακτηρίζεται από την παρουσία επιπωματίου και βραγχίου (Horst,1965). Είναι είδος που διηθεί την τροφή του, η οποία περιλαμβάνει οργανικό υλικό, φυτοπλαγκτόν και βακτήρια (Horst,1965).

Εικόνα 6.2. Άτομο *Viviparus contectus* (από www.Weichtiere.at)

Figure 6.2. *Viviparus contectus* (from www.Weichtiere.at)



Ανήκει στην οικογένεια των *Unionidae* και είναι δίθυρο των εσωτερικών υδάτων της Ευρώπης (Graf and Cummings, 2007). Πρόκειται για οργανισμούς που διηθούν την τροφή τους, η οποία περιλαμβάνει φυτοπλαγκτό και ζωοπλαγκτό. Χαρακτηρίζονται από την ικανότητα τους να «καθαρίζουν» τη στήλη του νερού (Garton et al., 1993), καθώς μπορούν να ανεχθούν τις ευτροφικές συνθήκες.

Εικόνα 6.3. Άτομο *Anodonta cygnea* (από [www. Biolib.cz](http://www.Biolib.cz))
Figure 6.3. *Anodonta cygnea* (from www. Biolib.cz)



Ανήκει στην οικογένεια των *Astacidae* και θεωρείται το πιο γνωστό είδος οστρακόδερμων των εσωτερικών υδάτων της Ευρώπης (Scheffel and Sceiba, 1992). Τρέφεται με σκουλήκια, έντομα, μαλάκια και φυτοπλαγκτονοκούς οργανισμούς (Scheffel and Sceiba, 1992; Hollows et al., 2002). Ο ευτροφισμός της Λίμνης Παμβώτιδας οδήγησε στη μείωση του πληθυσμού του (Leonardos et al., 2008)

Εικόνα 6.4. Άτομο *Astacus astacus* (από [www. Biopix.com](http://www.Biopix.com))
Figure 6.4. *Astacus astacus* (from www. Biolib.cz)

6.2.2.4 Συλλογή ιχθύων και αμφιβίων

Η συλλογή των ιχθύων και των αμφιβίων πραγματοποιήθηκε τις ίδιες χρονικές περιόδους με τις συλλογές των υπόλοιπων οργανισμών, με τη βοήθεια τοπικών επαγγελματιών αλιέων. Από τους ιχθύες συλλέχθηκε το πλαγκτονοφάγο είδος *Rutilus rutilus*, τα παμφάγα είδη: *Carassius gibelio*, *Cyprinus carpio* (Εικόνα 6.5) και το σαρκοφάγο είδος *Silurus asotus* (Εικόνα 6.6). Από τα αμφίβια, συλλέχθηκε το ενδημικό είδος *Rana epirotica* (Εικόνα 6.7). Τη μεταφορά των οργανισμών στο εργαστήριο ακολούθησε ο προσδιορισμός τους σύμφωνα με τους Kottelat & Freyhof (2007) και τους Frost et al., (2006). Δέκα άτομα από καθένα από τα παραπάνω είδη ζυγίστηκαν με ακρίβεια 0.01g, ενώ στη συνέχεια ακολούθησε η λήψη ιστών. Από τους ιχθύες έγινε η λήψη του εντέρου,

του ήπατος, του νεφρού, του εγκεφάλου, των γονάδων και της σάρκας. Από τα αμφίβια έγινε η λήψη του εντέρου, του ήπατος, του παγκρέατος, των γονάδων, του δέρματος και της σάρκας. Οι ιστοί διατηρήθηκαν στους -80 °C μέχρι την περαιτέρω επεξεργασία τους.



Ανήκει στην οικογένεια των *Cyprinidae* και ζει σε εύτροφες λίμνες και μεγάλους ποταμούς στην Ευρώπη και την Ασία (Kottelat & Freyhof, 2007). Πρόκειται για εισβολικό είδος και η εισαγωγή του στη Λίμνη Παμβώτιδα έγινε το 1930, από την Ιταλία (Stephanidis, 1937). Είναι παμφάγο είδος και τρέφεται κυρίως με υδρόβια καρκινοειδή, όπως οι γαρίδες, με έντομα, με σκουλήκια, με υδρόβια φυτά και φύκια (Cihar, 1991). Καταναλώνεται σε πολλές περιοχές του κόσμου, συμπεριλαμβανομένης και της περιοχής της Ηπείρου.

Εικόνα 6.5. Άτομο *Cyprinus carpio* (από www.cyprusffa.com)

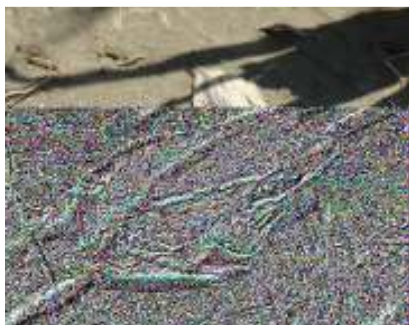
Figure 6.5. *Cyprinus carpio*(from www.cyprusffa.com)



Ανήκει στην οικογένεια των *Siluridae* και ζει στα εσωτερικά ύδατα της Ευρώπης και της Ασίας (Crivelli, 2006). Στη Λίμνη Παμβώτιδα εισήχθη το 1950, από τη Λίμνη Τριωνίδα (Leonardos, 2009). Εντάσσεται στα προστατευόμενα είδη (Leonardos et al., 2007). Είναι σαρκοφάγο είδος και τρέφεται κυρίως με μικρότερους ιχθύες και δευτερευόντως με καρκινοειδή, γαστερόποδα, μικρά βατράχια και φίδια (Πιαδου & Ondrias, 1986).

Εικόνα 6.6. Άτομο *Silurus aristotelis* (από Ντάκης Αλέξανδρος)

Figure 6.6. *Silurus aristotelis* (from Ntakis Alexandros)



Ανήκει στην οικογένεια των *Ranidae* και ζει στην Ελλάδα και στην Αλβανία. Τα φυσικά ενδιαίτηματά του είναι τα ποτάμια, οι λίμνες και οι βάλτοι. Ανήκει στα είδη που κινδυνεύουν με εξαφάνιση (Uzzell, 2004). Στην πόλη των Ιωαννίνων καταναλώνεται ευρέως. Στη διατροφή των ειδών που ανήκουν στο γένος *Rana*, περιλαμβάνονται έντομα και γαστερόποδα (Nikoara et al., 2004).

Εικόνα 6.7. Άτομο *Rana epirotica* (από Αντωνόπουλος Αντώνης)
Figure 6.7. *Rana epirotica* (from Antonopoulos Antonis)

6.2.3 Εκχύλιση και ποσοτικός προσδιορισμός μικροκυστινών

Η εκχύλιση των μικροκυστινών από τα δείγματα του φυτοπλαγκτού, του ζωοπλαγκτού, των μακροασπόνδυλων οργανισμών, των ιχθύων και των αμφιβίων πραγματοποιήθηκε όπως έχει ήδη περιγραφθεί αναλυτικά σε προηγούμενες ενότητες. Συνοπτικά περιλαμβάνει την ομογενοποίηση των ιστών με 100% μεθανόλη, ανάδευση, κατεργασία με υπερήχους, φυγοκέντρηση. Ακολούθησε εξάτμιση της μεθανόλης, επαναδιάλυση σε πολύ μικρό όγκο μεθανόλης, αραιώση των δειγμάτων με απεσταγμένο νερό και διήθηση αυτών μέσω μεμβρανώδους ηθμού σύμφωνα με τους Carmichael, (1995), Williams et al., (1997), Magalhães et al., (2001), Sipiä et al., (2002).

Ο ποσοτικός προσδιορισμός των μικροκυστινών που περιέχονταν στους ιστούς των οργανισμών, πραγματοποιήθηκε μέσω της ενζυμοσυνδεδεόμενης ανοσοπροσοροφητικής τεχνικής (ELISA). Η ικανότητα ανάκτησης της μεθόδου μετρήθηκε με την ανάλυση πραγματικών δειγμάτων κάθε οργανισμού, πριν και μετά την προσθήκη προτύπων διαλυμάτων μικροκυστίνης- LR. Για τα δείγματα του φυτοπλαγκτού η ικανότητα ανάκτησης υπολογίστηκε στο 97%. Για τα δείγματα του ζωοπλαγκτού ήταν ίση με 76%, ενώ για τα δείγματα των

μακροανοπόδουλων οργανισμών ήταν 72%. Για τα δείγματα των ιχθύων και των αμφιβίων ήταν 74%.

6.3 ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ

Η στατιστική επεξεργασία των δεδομένων έγινε με τη χρήση του στατιστικού προγράμματος SPSS 17.0 for Windows. Το γενικό γραμμικό μοντέλο (GLM) χρησιμοποιήθηκε για την εξέταση τυχόν σημαντικών διαφορών ανάμεσα στα είδη των οργανισμών που εξετάστηκαν, ανάμεσα στους διάφορους ιστούς και στις δύο περιόδους δειγματοληψίας, ως προς τη συγκέντρωση των μικροκυστινών. Επίσης, τα δεδομένα ελέγχθηκαν ως προς την κατανομή τους προκειμένου να εφαρμοστεί σε αυτά η ανάλυση της διακύμανσης (ANOVA). Όσα δεν εμφάνιζαν κανονική κατανομή, λογαριθμούνταν και έπειτα εφαρμοζόταν η ANOVA. Με την εφαρμογή της ANOVA, εξετάζονταν τυχόν σημαντικές διαφορές ανάμεσα στους ιστούς ως προς τη συγκέντρωση των μικροκυστινών που ανιχνεύθηκε σε κάθε είδος οργανισμού.

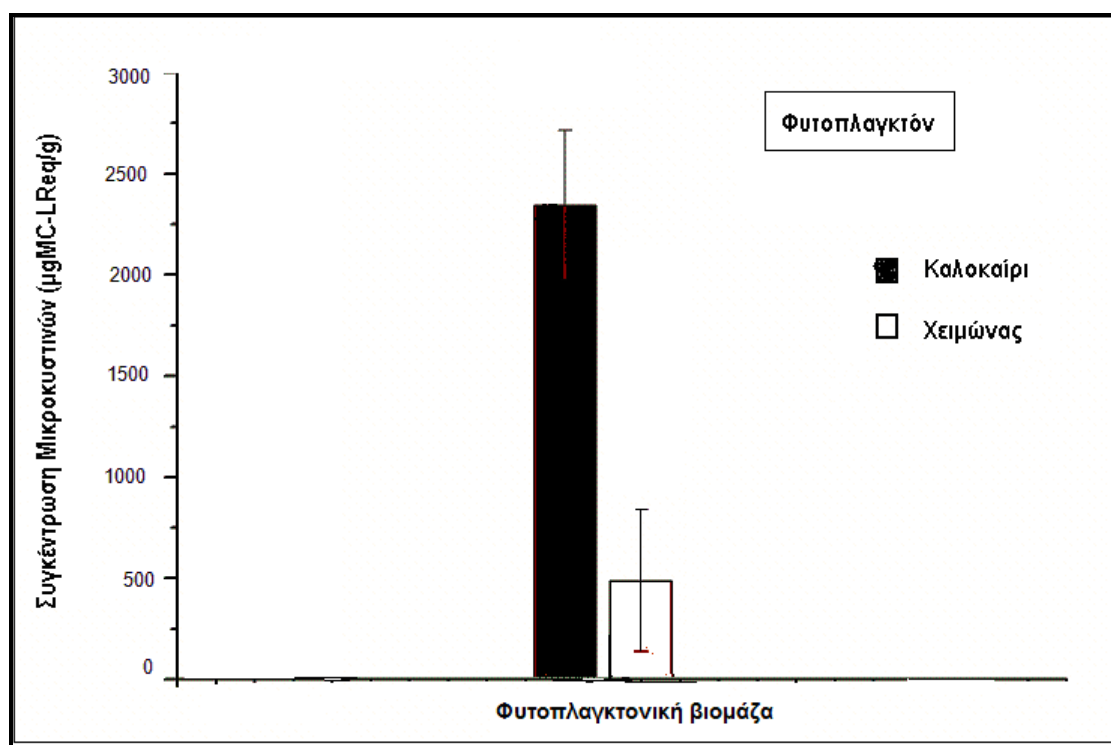
Στην παρούσα ενότητα, έγινε προσπάθεια να εκτιμηθεί ο βαθμός βιομεγέθυνσης των μικροκυστινών. Για το λόγο αυτό υπολογίστηκε ο δείκτης βιομεγέθυνσης (Biomagnification Factor, BMF) για τη χειμερινή και θερινή περίοδο. Ο παραπάνω δείκτης, αναφέρεται στη συγκέντρωση μιας ουσίας σε έναν οργανισμό, ως ποσοστό (%) της συγκέντρωσης της ίδιας ουσίας στη διατροφή του (Ibelings et al., 2005). Σύμφωνα με τα παραπάνω, προκειμένου να υπολογιστεί ο δείκτης βιομεγέθυνσης των μικροκυστινών στη Λίμνη Παμβώτιδα, χρησιμοποιήθηκε ο παρακάτω λόγος:

Δείκτης βιομεγέθυνσης (BMF)= *Συγκέντρωση μικροκυστινών σε ορισμένο είδος οργανισμού / συγκέντρωση μικροκυστινών στη διαίτά του.*

6.4 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

6.4.1 Κυρίαρχοι φυτοπλαγκτονικοί και ζωοπλαγκτονικοί οργανισμοί και συγκέντρωση μικροκυστινών στο φυτοπλαγκτόν και στο ζωοπλαγκτόν της Λίμνης Παμβώτιδας.

Σύμφωνα με τη μικροσκοπική παρατήρηση των δειγμάτων του φυτοπλαγκτού, κυρίαρχο γένος στις κυανοβακτηριακές αθροίσεις της Λίμνης Παμβώτιδας, τον Ιανουάριο αλλά και τον Αύγουστο του 2008, ήταν το *Microcystis*. Τα τοξικά είδη του παραπάνω γένους, συνέβαλαν στη διαμόρφωση των συγκεντρώσεων των μικροκυστινών που ανιχνεύθηκαν σε όλα τα δείγματα του φυτοπλαγκτού που εξετάστηκαν στην παρούσα μελέτη. Οι συγκεντρώσεις των μικροκυστινών στο φυτοπλαγκτόν κυμάνθηκαν από 502 ± 64 $\mu\text{g MC-LReq/g D.W.}$ τον μήνα Ιανουάριο, μέχρι 2300 ± 105 $\mu\text{g MC-LReq/g D.W.}$ τον μήνα Αύγουστο (Εικόνα 6.8).



Εικόνα 6.8. Συγκεντρώσεις μικροκυστινών ($\mu\text{gMC-LReq/g}$) στο φυτοπλαγκτό της Λίμνης Παμβώτιδας τη χειμερινή και θερινή περίοδο.

Figure 6.8. Microcystin concentration ($\mu\text{gMC-LReq/g}$) in phytoplankton during summer and winter.

Η μικροσκοπική παρατήρηση των δειγμάτων του ζωοπλαγκτού έδειξε ότι τον Ιανουάριο και τον Αύγουστο του 2008 κυρίαρχο ζωοπλαγκτονικό είδος στη Λίμνη Παμβώτιδα ήταν το *Polyarthra vulgaris* (Εικόνα 6.9), το οποίο ανήκει στα τροχόζωα. Εντούτοις, τον Αύγουστο του 2008, ήταν έντονη η παρουσία των κωπήποδων στη Λίμνη Παμβώτιδα. Τα κλαδόκερα, τα οποία θεωρούνται ως οι πιο αποτελεσματικοί ζωοπλαγκτονικοί θηρευτές του φυτοπλαγκτού, είχαν σημαντική παρουσία στη Λίμνη Παμβώτιδα μόνο τον μήνα Αύγουστο.

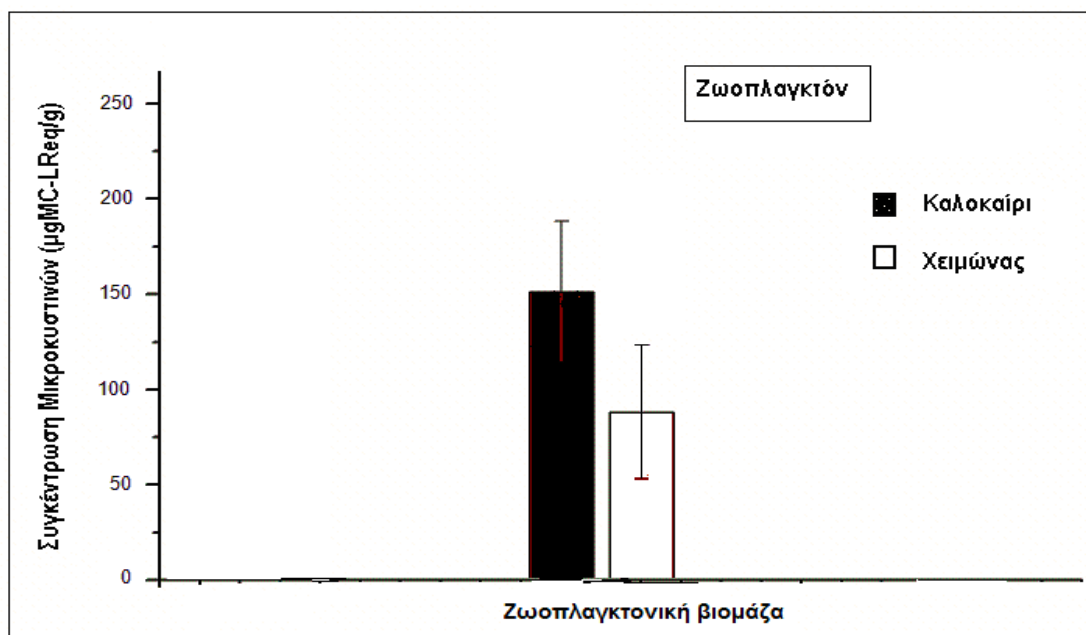


Ανήκει στην οικογένεια των *Synchaetidae* και πρόκειται για ψευδοκοιλωματικούς ασπόνδυλους οργανισμούς. Εμφανίζει μεγάλη αφθονία σε εύτροφες λίμνες και έχει μέγεθος 0.1-0.5 mm (Bağcı et al., 2000). Τρέφεται με φυτοπλαγκτόν, βακτήρια και πρωτόζωα (Towle, 1989)

Εικόνα 6.9. *Polyarthra vulgaris*, κυρίαρχο ζωοπλαγκτονικό είδος της Λίμνης Παμβώτιδας (από www.lbm.go.jp).

Figure 6.9. *Polyarthra vulgaris*, dominant species in Lake Pamvotis (after www.lbm.go.jp).

Οι συγκεντρώσεις των μικροκυστινών στα δείγματα του ζωοπλαγκτού κυμάνθηκαν μεταξύ 80 ± 12.3 $\mu\text{g MC-LR eq/g D.W}$ το μήνα Ιανουάριο και 152 ± 36.9 $\mu\text{g MC-LR eq/g D.W}$ το μήνα Αύγουστο (Εικόνα 6.10).



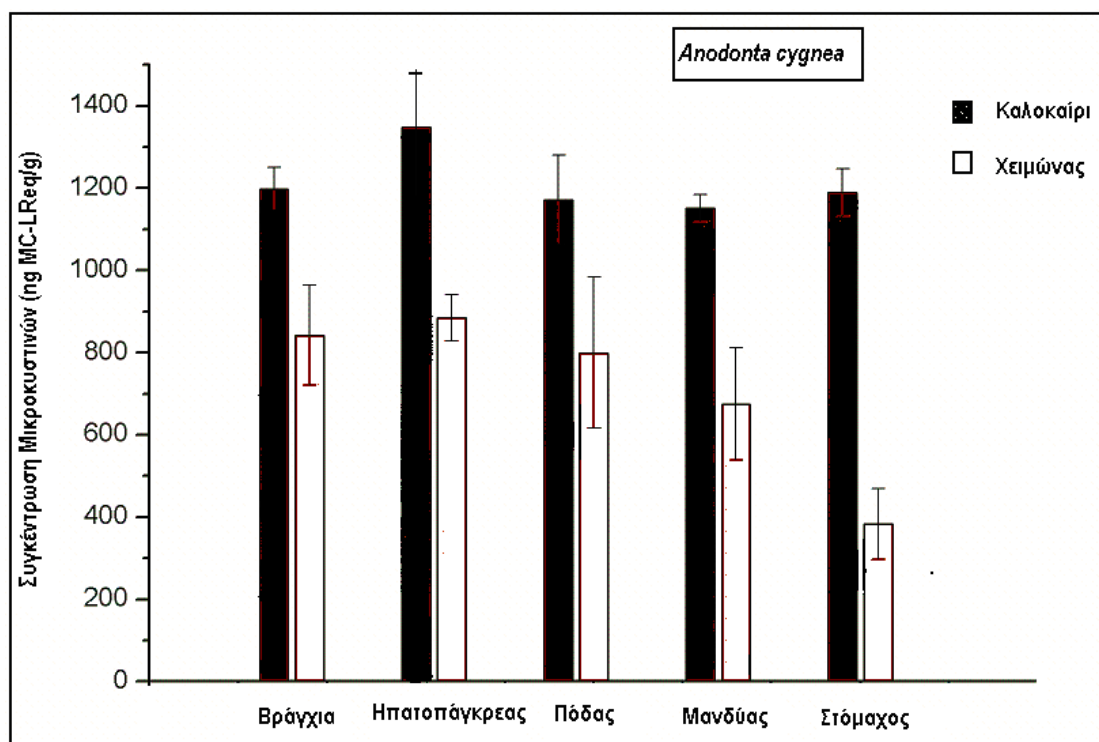
Εικόνα 6.10. Συγκεντρώσεις μικροκυστινών (µg MC-LR eq/g) στο ζωοπλαγκτόν της Λίμνης Παμβώτιδας τη χειμερινή και θερινή περίοδο.

Figure 6.10. Microcystin concentration (µg MC-LR eq/g) in zooplankton during summer and winter.

6.4.2 Συγκεντρώσεις μικροκυστινών στους μακροασπόνδυλους οργανισμούς

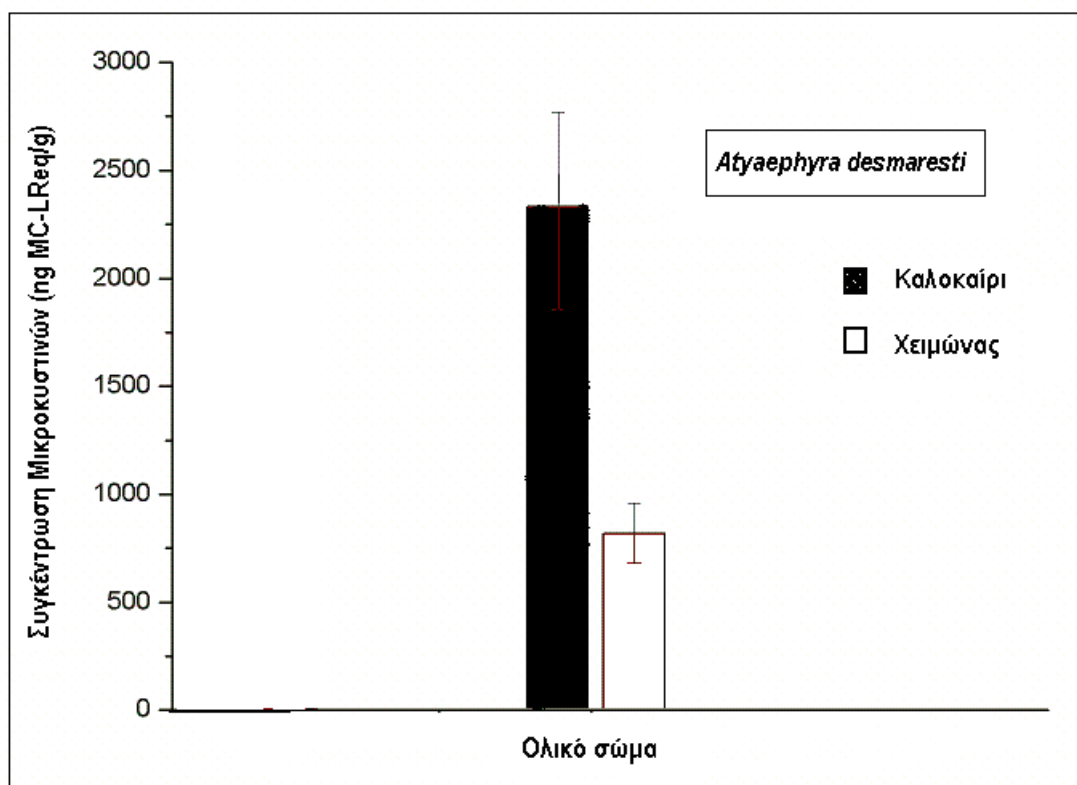
Οι υψηλότερες συγκεντρώσεις μικροκυστινών ανιχνεύθηκαν στο δίθυρο *Anodonta cygnea* ($P < 0.05$, $F = 5.02$). Στην Εικόνα 6.11 παρουσιάζεται η κατανομή της συγκέντρωσης των μικροκυστινών στους ιστούς του δίθυρου *Anodonta cygnea* κατά τη διάρκεια της θερινής και χειμερινής περιόδου. Η ανάλυση της διακύμανσης (ANOVA) έδειξε ότι υπήρχαν σημαντικές διαφορές στις συγκεντρώσεις των μικροκυστινών ανάμεσα στους διάφορους ιστούς ($F = 132.81$; $P < 0.05$). Ανάμεσα στους ιστούς, τη θερινή περίοδο οι υψηλότερες συγκεντρώσεις μικροκυστινών ανιχνεύθηκαν, στο ηπατοπάγκρεας και στο στόμαχο (1346.98 ± 164.78 ng MC-LR eq/g και 1188.53 ± 58.23 ng MC-LR eq/g αντιστοίχως). Οι αμέσως χαμηλότερες συγκεντρώσεις μικροκυστινών εντοπίστηκαν στα βράγχια και τον πόδα (1197.52 ± 52.17 ng MC-LR eq/g, 1171.55 ± 108

ngMC-LReq/g, αντιστοίχως). Οι χαμηλότερες συγκεντρώσεις μικροκυστινών εντοπίστηκαν στο μανδύα (1150.49 ± 33.65 ng MC-LR eq/g). Τη χειμερινή περίοδο οι υψηλότερες συγκεντρώσεις μικροκυστινών ανιχνεύθηκαν στο ηπατοπάγκρεας και στα βράγχια (884.97 ± 56.37 ng MC-LR eq /g, 841.69 ng MC-LR eq /g αντιστοίχως). Οι αμέσως χαμηλότερες συγκεντρώσεις μικροκυστινών εντοπίστηκαν στον πόδα και στο μανδύα (799.07 ± 184.03 ng MC-LReq/g, 674.69 ± 137.38 ngMC-LReq/g). Οι χαμηλότερες συγκεντρώσεις μικροκυστινών εντοπίστηκαν στο στόμαχο (382.53 ± 86.01 ng MC-LReq /g).



Εικόνα 6.11. Συγκεντρώσεις μικροκυστινών (ng MC-LR eq/g) στο δίθυρο *Anodonta cygnea* της Λίμνης Παμβώτιδας τη χειμερινή και θερινή περίοδο.
Figure 6.11. Microcystin concentration (ng MC-LR eq/g) in *Anodonta cygnea* during summer and winter.

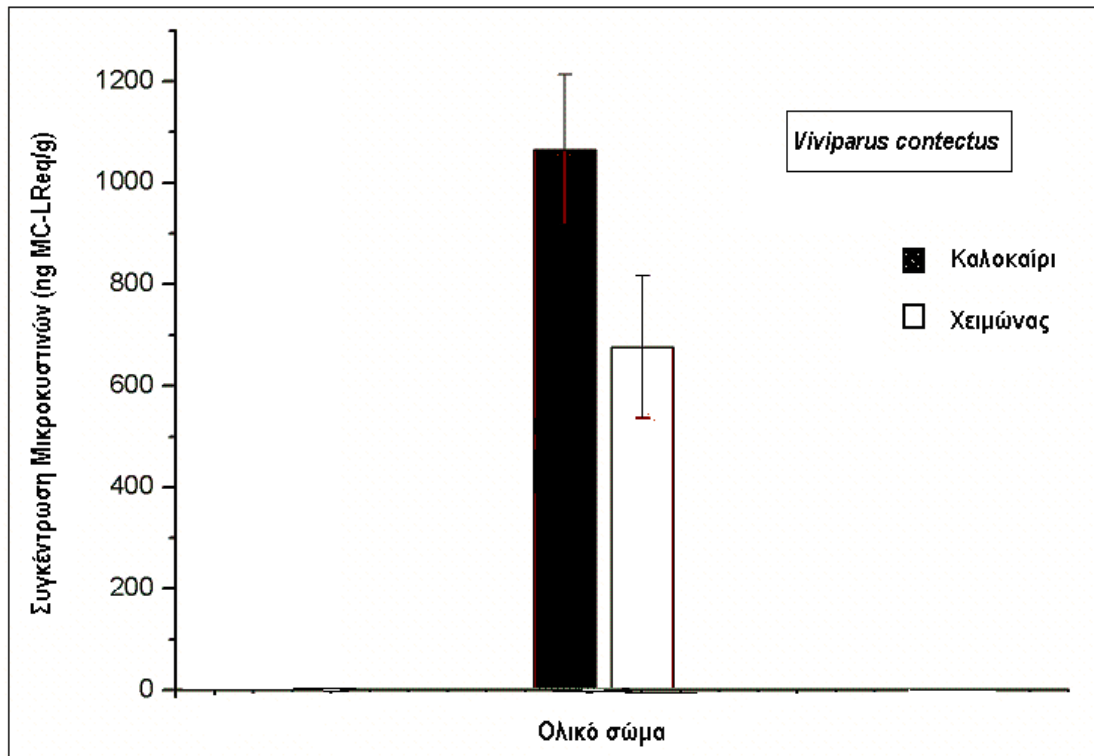
Υψηλές συγκεντρώσεις μικροκυστινών εντοπίστηκαν και στο κολυμβητικό δεκάποδο *Atyaephyra desmaresti*. Τη θερινή περίοδο, η τιμή των μικροκυστινών στο σώμα του δεκαπόδου ανέρχόταν στα 2050.48 ± 123.78 ng MC-LR eq /g, ενώ τη χειμερινή περίοδο, η τιμή μειώθηκε στα 749.15 ± 83.61 ng MC-LR eq /g (Εικόνα 6.12).



Εικόνα 6.12. Συγκεντρώσεις μικροκυστινών (ng MC-LR eq/g) στο δεκάποδο *Atyaephyra desmaresti* της Λίμνης Παμβώτιδας τη χειμερινή και θερινή περίοδο.

Figure 6.12. Microcystin concentration (ng MC-LR eq/g) in *Atyaephyra desmaresti*

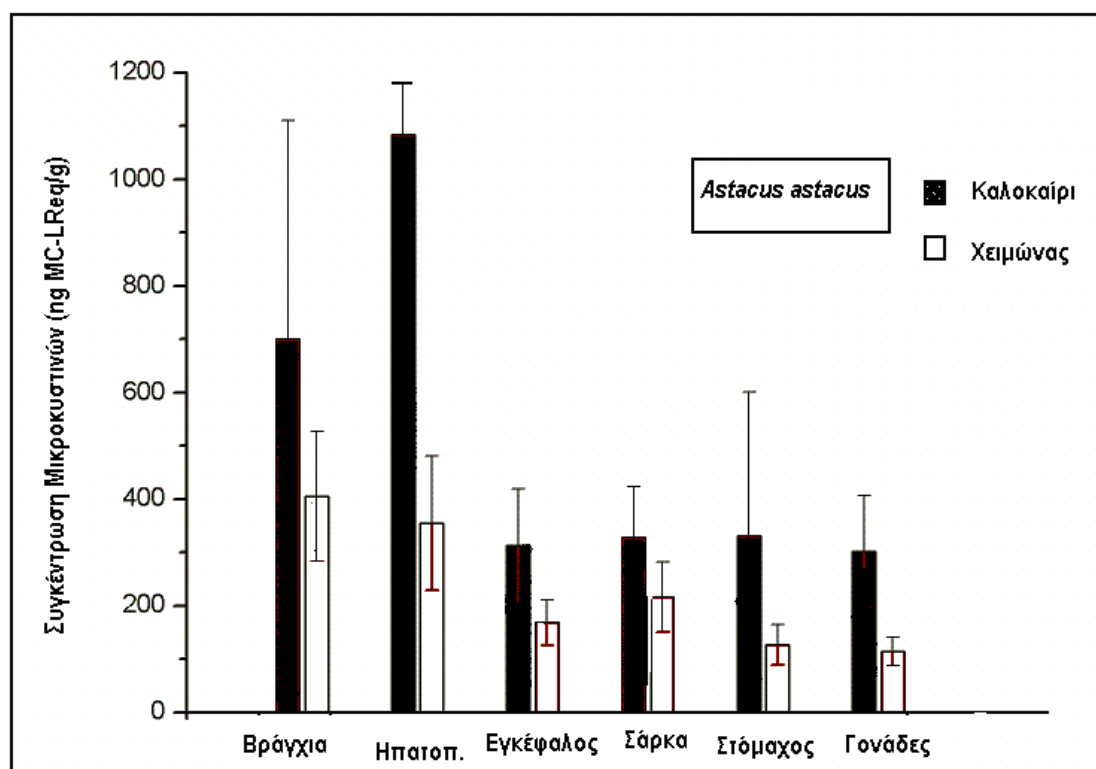
Στο γαστερόποδο *Viviparus contectus* τη θερινή περίοδο ανιχνεύθηκαν συγκεντρώσεις μικροκυστινών (1074.07 ± 147.84 ngMC-LR eq/g) υψηλότερες των αντίστοιχων της χειμερινής περιόδου (684.96 ± 40.11 ngMC-LR eq /g) (Εικόνα 6.13).



Εικόνα 6.13. Συγκεντρώσεις μικροκυστινών (ng MC-LR eq/g) στο γαστερόποδο *Viviparus contectus* της Λίμνης Παμβώτιδας τη χειμερινή και θερινή περίοδο.
Figure 6.13. Microcystin concentration (ng MC-LR eq/g) in *Viviparus contectus* during summer and winter.

Στην Εικόνα 6.14 παρουσιάζεται η κατανομή της συγκέντρωσης των μικροκυστινών στους ιστούς του βαδιστικού δεκαπόδου *Astacus astacus* κατά τη διάρκεια της θερινής και της χειμερινής περιόδου. Η ανάλυση της διακύμανσης (ANOVA) έδειξε ότι υπήρχαν σημαντικές διαφορές στις συγκεντρώσεις των μικροκυστινών ανάμεσα στους διάφορους ιστούς ($F=108.65$; $P<0.05$). Ανάμεσα στους ιστούς, τη θερινή περίοδο οι υψηλότερες συγκεντρώσεις μικροκυστινών ανιχνεύθηκαν, στο ηπατοπάγκρεας και στα βράγχια (766.99 ± 148 ngMC-LReq/g και 701.09 ± 176.98 ngMC-LReq/g αντιστοίχως). Οι αμέσως χαμηλότερες συγκεντρώσεις μικροκυστινών εντοπίστηκαν στο στόμαχο και στη σάρκα (331.25 ± 70.41 ngMC-LReq/g, 328.61 ± 95.29 ngMC-LReq/g αντιστοίχως). Οι χαμηλότερες συγκεντρώσεις μικροκυστινών εντοπίστηκαν στον εγκέφαλο και τις γονάδες (312.93 ± 67.09 ngMC-LReq/g, 301.76 ± 85.65 ng/g αντιστοίχως). Τη χειμερινή περίοδο οι υψηλότερες συγκεντρώσεις μικροκυστινών ανιχνεύθηκαν στα βράγχια και το

ηπατοπάγκρεας (405.43 ± 91.46 ng MC-LR eq /g, 354.82 ± 98.34 ng MC-LR eq /g αντιστοίχως). Οι αμέσως χαμηλότερες συγκεντρώσεις μικροκυστινών εντοπίστηκαν στη σάρκα και στον εγκέφαλο (216.41 ± 65.71 ng MC-LR eq /g, 168.54 ± 42.64 ng MC-LR eq /g). Οι χαμηλότερες συγκεντρώσεις μικροκυστινών εντοπίστηκαν στο στόμαχο και τις γονάδες (126.94 ± 37.73 ng MC-LR eq /g, 113.74 ± 26.45 ng MC-LR eq /g αντιστοίχως).



Εικόνα 6.14. Συγκεντρώσεις μικροκυστινών (ng MC-LR eq/g) στο δεκάποδο *Astacus astacus* της Λίμνης Παμβώτιδας τη χειμερινή και θερινή περίοδο.

Figure 6.14. Microcystin concentration (ng MC-LR eq/g) in *Astacus astacus* during summer and winter.

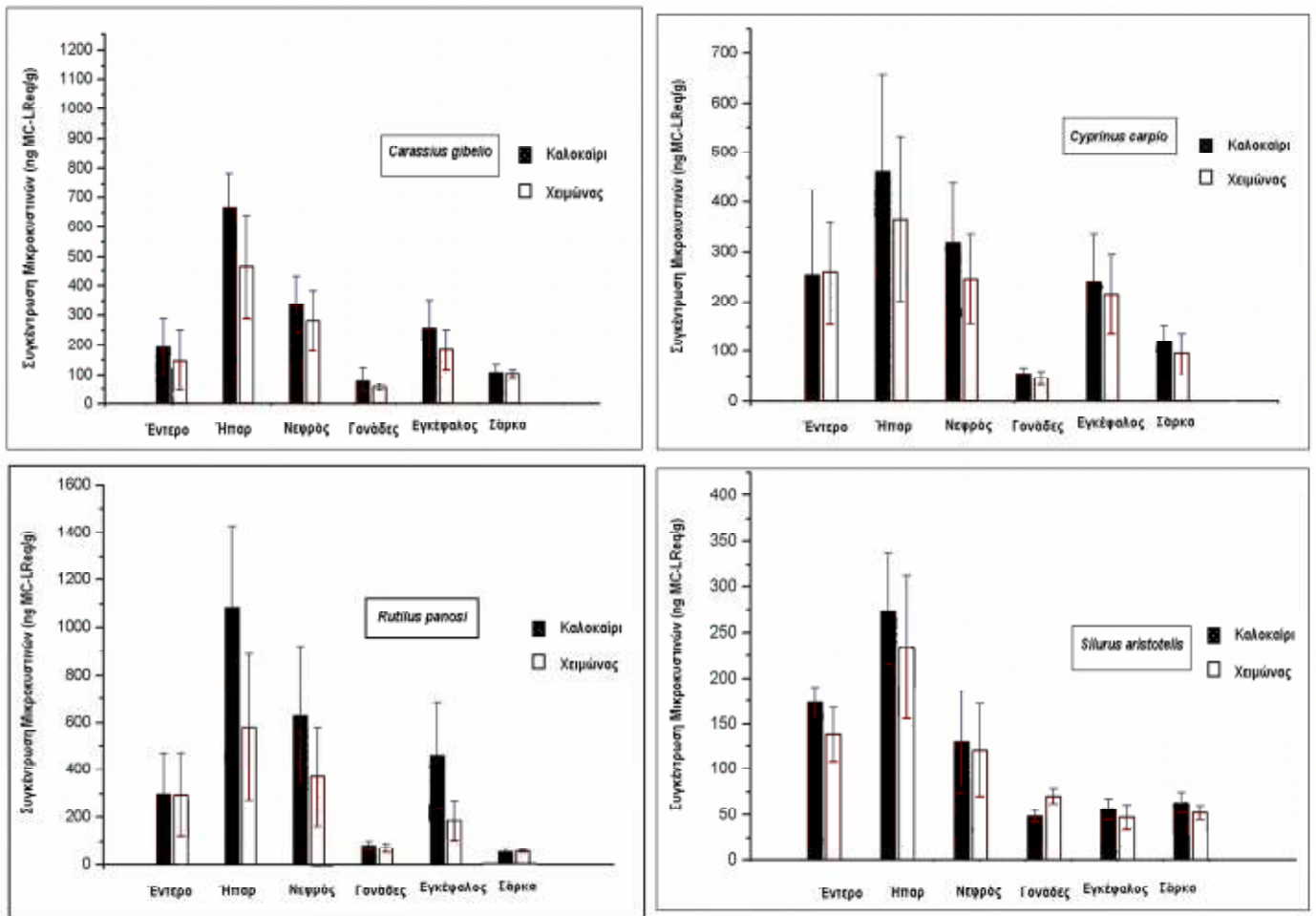
6.4.3 Συγκεντρώσεις μικροκυστινών στους ιχθύες και τα αμφίβια

Η ανάλυση του γενικού γραμμικού μοντέλου (GLM) έδειξε ότι οι συγκεντρώσεις των μικροκυστινών διέφεραν σημαντικά ανάμεσα στα διάφορα είδη ιχθύων ($P < 0.05$, $F = 151.48$), ανάμεσα στους ιστούς

($P < 0.05$, $F = 132.31$) και τις περιόδους δειγματοληψίας ($P < 0.05$, $F = 29.85$) (Πίνακας 6.1).

Πίνακας 6.1. Αποτελέσματα γενικού γραμμικού μοντέλου				
Table 6.1. Results of general linear model				
Source	Type III Sum of Squares	df	F	Sig.
Corrected Model	2657812	54	42.86	,000
Intercept	3198175	1	4518.81	,000
species	2761082	3	151.48	,000
tissue	6923841	5	132.31	,000
season	1615283	1	29.85	,000
season * species	1381803	15	20.32	,000

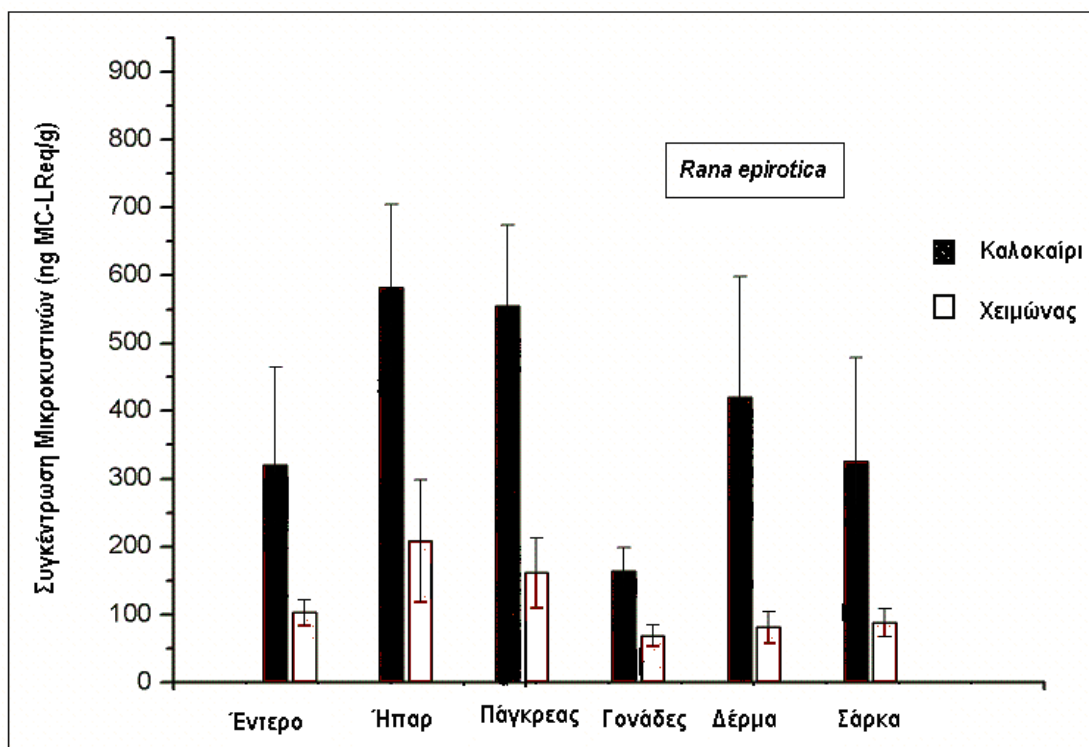
Στο πλαγκτονοφάγο είδος *Rutilus ramosi* εντοπίστηκαν οι υψηλότερες συγκεντρώσεις μικροκυστινών, σε σύγκριση με τα υπόλοιπα είδη. Οι αμέσως χαμηλότερες συγκεντρώσεις ανιχνεύθηκαν στα παμφάγα είδη *Carassius gibelio* και *Cyprinus carpio*. Οι χαμηλότερες συγκεντρώσεις ανιχνεύθηκαν στο σαρκοφάγο είδος *Silurus aristotelis* (Εικόνα 6.15). Ανάμεσα στους ιστούς, τη θερινή και τη χειμερινή περίοδο, οι υψηλότερες συγκεντρώσεις μικροκυστινών ανιχνεύθηκαν στο ήπαρ των ιχθύων. Οι αμέσως χαμηλότερες συγκεντρώσεις μικροκυστινών εντοπίστηκαν στο νεφρό, τον εγκέφαλο και το έντερο των ιχθύων. Οι χαμηλότερες συγκεντρώσεις μικροκυστινών εντοπίστηκαν στις γονάδες και τη σάρκα των ιχθύων (Εικόνα 6.15). Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι οι συγκεντρώσεις των μικροκυστινών στους ιστούς των ιχθύων *Rutilus ramosi* και *Carassius gibelio*, το έτος 2008, ήταν αρκετά υψηλότερες από τις αντίστοιχες συγκεντρώσεις στους ιχθύες των ίδιων ειδών που συλλέχθηκαν το έτος 2005.



Εικόνα 6.15. Συγκεντρώσεις μικροκυστινών (ng MC-LR eq/g) στους ιχθύες *Rutilus rutilus*, *Carassius gibelio*, *Cyprinus carpio* *Silurus aristotelis* της Λίμνης Παμβώτιδας τη χειμερινή και θερινή περίοδο.

Figure 6.15. Microcystin concentration (ng MC-LR eq/g) in *Rutilus rutilus*, *Carassius gibelio*, *Cyprinus carpio*, *Silurus aristotelis* during summer and winter.

Στην Εικόνα 6.16 παρουσιάζεται η κατανομή της συγκέντρωσης των μικροκυστινών στους ιστούς του αμφίβιου *Rana epirotica* κατά τη διάρκεια της θερινής και της χειμερινής περιόδου. Η ανάλυση της διακύμανσης (ANOVA) έδειξε ότι υπήρχαν σημαντικές διαφορές ανάμεσα στις συγκεντρώσεις των μικροκυστινών στους διάφορους ιστούς ($P < 0.05$; $F = 121.98$). Ανάμεσα στους ιστούς, τη θερινή και τη χειμερινή περίοδο οι υψηλότερες συγκεντρώσεις μικροκυστινών ανιχνεύθηκαν στο ήπαρ ($581.46 \pm 92.83 \text{ ngMC-LReq/g}$, $208.69 \pm 80.35 \text{ ngMC-LReq/g}$, αντιστοίχως) και στο πάγκρεας ($554.06 \pm 98.06 \text{ ngMC-LReq/g}$ και $141.59 \pm 51.32 \text{ ngMC-LReq/g}$ αντιστοίχως). Χαμηλότερες συγκεντρώσεις μικροκυστινών εντοπίστηκαν στο έντερο ($320.56 \pm 63.98 \text{ ng MC-LR eq/g}$ και $102.59 \pm 18.74 \text{ ngMC-LReq/g}$ αντιστοίχως), στο δέρμα ($419.52 \pm 91.62 \text{ ngMC-LReq/g}$ και $80.92 \pm 23.56 \text{ ngMC-LReq/g}$ αντιστοίχως), στη σάρκα ($325.49 \pm 87.01 \text{ ng MC-LR eq/g}$, $88.12 \pm 20.85 \text{ ng MC-LR eq/g}$ αντιστοίχως) και στις γονάδες ($164.62 \pm 34.02 \text{ ng MC-LR eq/g}$, $68.97 \pm 15.74 \text{ ng MC-LR eq/g}$ αντιστοίχως).



Εικόνα 6.16. Συγκεντρώσεις μικροκυστινών (ng MC-LR eq/g) στο αμφίβιο *Rana epirotica* της Λίμνης Παμβώτιδας τη χειμερινή και θερινή περίοδο.

Figure 6.16. Microcystin concentration (ng MC-LR eq/g) in *Rana epirotica* during summer and winter.

6.4.4 Βιομεγέθυνση των μικροκυστινών

Προκειμένου να υπολογιστούν οι δείκτες βιομεγέθυνσης των μικροκυστινών, αναζητήθηκε στη διεθνή βιβλιογραφία η σύσταση της διαίτας των οργανισμών που μελετήθηκαν. Σύμφωνα με τον Wetzel (2001), το διαιτολόγιο του ζωοπλαγκτού αποτελείται από 100% φυτοπλαγκτονικούς οργανισμούς. Η *Atyaephyra desmaresti* τρέφεται με φυτοπλαγκτόν και αποσυντιθέμενα υλικά (Anastasiadou, 2004). Εκτιμήθηκε ότι το φυτοπλαγκτόν συμμετέχει κατά 80% στο διαιτολόγιο του παραπάνω κολυμβητικού δεκαπόδου. Σύμφωνα με μελέτες των Mackie et al., (1989), το δίθυρο *Anodonta cygnea* τρέφεται κατά 70% από φυτοπλαγκτονικούς οργανισμούς και κατά 30% από

ζωοπλαγκτονικούς οργανισμούς. Οι παμφάγοι ιχθύες *Cyprinus carpio* και *Carassius gibelio* τρέφονται κυρίως με υδρόβια καρκινοειδή, όπως τα κολυμβητικά δεκάποδα, με έντομα, σκουλήκια, υδρόβια φυτά και φύκη (Cihar,1991). Επιπλέον ο Khan, (2003), απέδειξε ότι στο διαιτολόγιο του *Cyprinus carpio* το ζωοπλαγκτόν συμμετέχει κατά 25%, η *Atyaephyra desmaresti* κατά 36.6% και το γαστερόποδο *Viviparus contectus* συμμετέχει κατά 13.8%. Στο διαιτολόγιο του *Carassius gibelio* το ζωοπλαγκτόν συμμετέχει κατά 36.9%, το γαστερόποδο *Viviparus contectus* κατά 15.7% και το δίθυρο *Anodonta cygnea* κατά 2.5% (Balik et al., 2003). Σύμφωνα με μελέτες του Daoulas, (1981), το είδος *Rutilus ramosi* είναι πλαγκτονοφάγο και το ζωοπλαγκτόν είναι κυρίαρχο συστατικό της διαίτας του καθώς συμμετέχει σε αυτή με ποσοστό 81.8%. Το είδος *Silurus aristotelis*, είναι σαρκοφάγο και τρέφεται κυρίως με μικρότερους ιχθύες και δευτερευόντως με καρκινοειδή, γαστερόποδα, μικρά βατράχια και φίδια (Πιαδου & Ondrias, 1986). Οι Copp et al.,(2009) και οι Carol et al., (2009), απέδειξαν ότι στο διαιτολόγιο ειδών του γένους συμμετέχει κατά 60% το δεκάποδο *Atyaephyra desmaresti*, κατά 30% τα νεαρά άτομα του ιχθύος *Cyprinus carpio* και κατά 10% τα νεαρά άτομα του ιχθύος *Rutilus ramosi* (Πίνακας 6.2).

Πίνακας 6.2 Εκατοστιαία σύσταση (%) της διαίτας των οργανισμών που ελέγχθηκαν

Table 6.2 Diet (%) of the organisms examined

	Φυτοπλαγκτόν	Ζωοπλαγκτόν	<i>Atyaephyra desmaresti</i>	<i>Viviparus contectus</i>	<i>Anodonta cygnea</i>	<i>Cyprinus carpio</i>	<i>Carassius gibelio</i>	<i>Rutilus panosi</i>	<i>Silurus aristotelis</i>	Βιβλιογραφία
Ζωοπλαγκτόν	100									Wetzel,2001
<i>Atyaephyra desmaresti</i>	80									Anastasiadou et al., 2004
<i>Anodonta cygnea</i>	70	30								Mackie et al., 1989
<i>Cyprinus carpio</i>		25	36.6	13.8						Khan,2003
<i>Carassius gibelio</i>		36.9		15.7	2.5					Balik et al.,2003
<i>Rutilus panosi</i>		81.8								Daoulas,1981
<i>Silurus aristotelis</i>			60			30		10		Copp et al.,2009

Από τις συγκεντρώσεις των μικροκυστινών που υπολογίστηκαν στους οργανισμούς-καταναλωτές της Λίμνης Παμβώτιδας, συμπεραίνεται ότι κανείς από αυτούς δεν ξεπέρασε τη συγκέντρωση των μικροκυστινών που ανιχνεύθηκε στους φυτοπλαγκτονικούς οργανισμούς. Επιπλέον, οι δείκτες βιομεγέθυνσης κυμάνθηκαν από (0.003) στο δίθυρο *Anodonta cygnea* έως (0.63) στο σαρκοφάγο ιχθύ *Silurus aristotelis* (Πίνακας 6.3). Το γεγονός αυτό φανερώνει ότι δεν υπάρχει βιομεγέθυνση των μικροκυστινών στη Λίμνη Παμβώτιδα.

Πίνακας 6.3. Δείκτες βιομεγέθυνσης των μικροκυστινών σε οργανισμούς της τροφικής αλυσίδας της Λίμνης Παμβώτιδας.

Table 6.3. Biomagnification factors of microcystins in foodweb components of Lake Pamvotis.

Οργανισμός	Καλοκαίρι	Χειμώνας
Ζωοπλαγκτόν	0.06	0.15
<i>Atyaephyra desmaresti</i>	0.011	0.0018
<i>Anodonta cygnea</i>	0.003	0.009
<i>Rutilus rutilus</i>	0.023	0.024
<i>Carassius gibelio</i>	0.029	0.04
<i>Cyprinus carpio</i>	0.03	0.06
<i>Silurus aristotelis</i>	0.39	0.63

6.5 ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Από τον Πίνακα 6.3 μπορεί κανείς να συμπεράνει ότι συγκεντρώσεις μικροκυστινών έχουν καταγραφεί σε ένα πλήθος υδρόβιων οργανισμών σε όλο τον κόσμο.

Πίνακας 6.3. Συγκεντρώσεις μικροκυστινών σε υδρόβιους οργανισμούς διαφόρων χωρών
Table 6.3. Microcystin concentrations in aquatic organisms

Οργανισμός	Ιστός	Συγκέντρωση μικροκυστινών(μg/g)	Περιοχή	Βιβλιογραφία
Μαλάκια				
<i>Bellamya aeruginosa</i>	Ηπατοπάγκρεας	7.42	Κίνα	Chen et al.,(2005)
	Πεπτική οδός	4.54		
	Γονάδες	2.62		
	Πόδας	0.06		
<i>Anodonta woodiana,</i> <i>Hyriopsis cumingii,</i> <i>Cristaria plicata,</i> <i>Lamprotula leai</i>	Έντερο	20.65	Κίνα	Chen and Xie(2005)
	Ηπατοπάγκρεας	38.48		
	Σπλάχνα	1.7		
	Βράγχια	0.64		
	Πόδας	0.58		
<i>Dreissena polymorpha</i>	Ολικό σώμα	30	Ολλανδία	Ibelings et al.,(2005)
<i>Anodonta grandis simpsoniana</i>	Ολικό σώμα	1.35	Καναδάς	Prepas et al.,(1997)
<i>Unio douglasiae</i>	Ηπατοπάγκρεας	420	Ιαπωνία	Yokoyama and Park(2002)
<i>Cristaria plicata</i>	Ηπατοπάγκρεας	297	Ιαπωνία	Yokoyama and Park(2002)
<i>Lymnaea stagnalis</i>	Ολικό σώμα	140	Καναδάς	Zurawell et al.,(1999)
Καρκινοειδή				
<i>Palaemon modestu,</i> <i>Macrobrachium nipponensis</i> <i>Procambarus clarkii</i>	Ηπατοπάγκρεας	8.40	Κίνα	Chen and Xie(2005)
	Σάρκα	0.53		
	Σάρκα	0.05		
	Στομάχι	9.97	Κίνα	Chen and Xie(2005)
Ιχθύες				
<i>Tilapia rendalli</i>	Ήπαρ	31.1	Βραζιλία	Magalhaes et al.,(2001)
	Σπλάχνα	67.8		
	Σάρκα	0.026		
<i>Carassius auratus</i>	Σάρκα	3.19	Κίνα	Xie et al.,(2005)
<i>Odontesthes bonariensis</i>	Ήπαρ	1.01	Αργεντινή	Cazenave et al.,(2005)
<i>Silverside</i>				
<i>Osmerus eperlanus</i>	Ήπαρ	874	Ολλανδία	Ibelings et al.,(2005)
<i>Gymnocephalus cernua</i>	Ήπαρ	194		
<i>Perca fluviatilis</i>	Ήπαρ	51		
<i>Cyprinus sp.</i>	Σάρκα	0.3	Πορτογαλία	Vasconelos(1999)
<i>Barbus sp.</i>	Σάρκα	0.1		
<i>Lisa sp.</i>	Σάρκα	0.1		

Η μέτρηση της συγκέντρωσης των μικροκυστινών στο ζωοπλαγκτόν της Λίμνης Παμβώτιδας αποτελεί την πρώτη προσπάθεια ανίχνευσης μικροκυστινών σε ζωοπλαγκτονικούς οργανισμούς λιμνών της Μεσογείου. Πολλές μελέτες έχουν επικεντρωθεί στην τοξική επίδραση των μικροκυστινών στα διάφορα είδη ζωοπλαγκτού (Blom et al., 2001; DeMott et al., 1991; Ferrão-Filho et al., 2000) ενώ ελάχιστες μελέτες ασχολήθηκαν με τη συγκέντρωση των μικροκυστινών στο ζωοπλαγκτόν (Ibelings et al., 2005). Οι συγκεντρώσεις των μικροκυστινών του ζωοπλαγκτού της Λίμνης Παμβώτιδας (80 $\mu\text{g MC-LR eq /g}$ -150 $\mu\text{g MC-LR eq /g d.w}$) είναι παραπλήσιες με τις συγκεντρώσεις των μικροκυστινών (57 $\mu\text{g MC-LR eq /g}$ -192 $\mu\text{g MC-LR eq /g d.w}$) που ανιχνεύθηκαν στο ζωοπλαγκτόν της Λίμνης IJsselmeer, στην Ολλανδία (Ibelings et al., 2005). Χαμηλότερες συγκεντρώσεις μικροκυστινών ανιχνεύθηκαν στη Λίμνη Jacaraguá της Βραζιλίας (0.3 $\mu\text{g MC-LR eq /g}$ -16.4 $\mu\text{g MC-LR eq/g d.w}$) (Ferrão-Filho et al., 2002). Αρκετά υψηλότερες συγκεντρώσεις ανιχνεύθηκαν στη Λίμνη Kasumigaura της Ιαπωνίας (75 $\mu\text{gMC-LReq/g}$ -1387 $\mu\text{g MC-LR eq /g d.w}$). Οι διαφορές στις παραπάνω συγκεντρώσεις πιθανώς σχετίζονται με τη διαφορετική ζωοπλαγκτονική σύνθεση της κάθε λίμνης (Gilbert, 1994; Smith & Gilbert, 1995; Nandini, 2000; Ferrão-Filho et al., 2000; Ferrão-Filho & Azevedo, 2003). Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της ενότητας 3, η συγκέντρωση των συνολικών μικροκυστινών (ενδοκυττάρων και εξωκυττάρων) της Λίμνης Παμβώτιδας, κυμάνθηκε σε χαμηλές τιμές (1.19 $\mu\text{g MC-LR eq /l}$) τους χειμερινούς μήνες του 2008, ενώ αυξήθηκε τους καλοκαιρινούς (8.21 $\mu\text{g MC-LR eq/l}$) του ίδιου έτους. Η αύξηση των μικροκυστινών στο φυτοπλαγκτό της λίμνης την καλοκαιρινή περίοδο, ακολουθήθηκε από την αύξηση της συγκέντρωσης των μικροκυστινών στο ζωοπλαγκτόν. Εντούτοις, σε όλα τα δείγματα των ζωοπλαγκτονικών οργανισμών ανιχνεύθηκαν συγκεντρώσεις μικροκυστινών οι οποίες δεν ξεπέρασαν τις τιμές των αντίστοιχων συγκεντρώσεων των φυτοπλαγκτονικών δειγμάτων.

Οι υψηλές συγκεντρώσεις των μικροκυστινών στο δίθυρο *Anodonta cygnea* της Λίμνης Παμβώτιδας, πιθανώς να σχετίζονται με τη στρατηγική τροφοληψίας του, καθώς πρόκειται για διηθηματοφάγο

οργανισμό. Αποτελέσματα μελετών, έχουν δείξει ότι τα δίθυρα των εσωτερικών υδάτων συσσωρεύουν μικροκυστίνες όταν ζουν σε περιβάλλοντα με έντονη παρουσία τοξικών κυανοβακτηρίων (Prepas et al., 1997; Watanabe et al., 1997; Williams et al., 1997; Yokoyama & Park, 2002; Chen & Xie, 2005b; Ibelings et al., 2005; Gkelis et al., 2006; Wood et al., 2006). Επίσης, η συκέντρωση των μικροκυστινών που είναι δυνατόν να συσσωρευθεί στους ιστούς των διθύρων εξαρτάται από το είδος του δίθυρου (Martins & Vasconcelos, 2009). Το δίθυρο *Anodonta cygnea* της Λίμνης Παμβώτιδας συσώρευσε τις υψηλότερες συγκεντρώσεις μικροκυστινών στο ηπατοπάγκρεας, ενισχύοντας την άποψη ότι αυτό αποτελεί το όργανο-στόχο των μικροκυστινών. Στο ίδιο συμπέρασμα κατέληξαν και οι Chen & Xie, (2005) μελετώντας την κατανομή των συγκεντρώσεων των μικροκυστινών σε τέσσερα διαφορετικά είδη δίθυρων (*A. woodiana*, *Hyriopsis cumingii*, *C. plicata*, και *Lamprotula leai*) της Λίμνης Taihu. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι στη Λίμνη Παμβώτιδα, ο δείκτης βιομεγέθυνσης των μικροκυστινών στους ζωοπλαγκτονικούς οργανισμούς ήταν υψηλότερος από τον αντίστοιχο δείκτη των δίθυρων. Αυτό το γεγονός πιθανώς, να οφείλεται στη μεγαλύτερη ανθεκτικότητα των διθύρων σε σύγκριση με αυτή του ζωοπλαγκτού, όπως επίσης και στον αποδοτικότερο μηχανισμό αποτοξίκωσης που διαθέτουν τα δίθυρα όπως αναφέρουν οι Martins & Vasconcelos, (2009).

Τα αποτελέσματα της παρούσας ενότητας αποδεικνύουν για πρώτη φορά την παρουσία σημαντικών συγκεντρώσεων μικροκυστινών στο κολυμβητικό δεκάποδο *Atyaephyra desmaresti*. Επιπλέον, η παρούσα μελέτη αποτελεί την πρώτη προσπάθεια ανίχνευσης μικροκυστινών στους ιστούς του *Astacus astacus* της Λίμνης Παμβώτιδας, το οποίο είναι είδος με υψηλή εμπορική αξία και καταναλώνεται σε μεγάλο βαθμό. Επίσης, σημαντικές συγκεντρώσεις μικροκυστινών εντόπισαν οι Chen & Xie (2005b), στο ηπατοπάγκρεας (8.40 µg/g) και στη σάρκα (0.53 µg/g) του κολυμβητικού δεκάποδου *Palaemon modestu* αλλά και στη σάρκα (0.05 µg/g), στο στόμαχο (9.97 µg/g) και στο ηπατοπάγκρεας (0.08 µg/g) του βαδιστικού δεκάποδου *Procambarus clarkia* σε μια εύτροφη λίμνη της

Κίνας. Στο βαδιστικό δεκάποδο *Astacus astacus* της Λίμνης Παμβώτιδας, οι υψηλότερες συγκεντρώσεις μικροκυστινών εντοπίστηκαν στο ηπατοπάγκρεας, ενώ χαμηλότερες συγκεντρώσεις εντοπίστηκαν στο εδώδιμο μέρος του οργανισμού, τη σάρκα του. Από μελέτες των Van Buynnder et al., (2001), αποδείχθηκε ότι κατά το βράσιμο καρκινοειδών εκτεθειμένων σε μικροκυστίνες, πραγματοποιήθηκε μια ανακατανομή των μικροκυστινών από τα σπλάχνα προς τη σάρκα, με άγνωστο μηχανισμό. Η παρουσία των μικροκυστινών στις γονάδες του *Astacus astacus* της Λίμνης Παμβώτιδας, υποστηρίζει την άποψη των Chen and Xie, (2005a), ότι τα ενήλικα καρκινοειδή μπορούν να μεταφέρουν ποσότητες μικροκυστινών στα έμβρυά τους. Η ανίχνευση των μικροκυστινών στον εγκέφαλο του *Astacus astacus* της Λίμνης Παμβώτιδας ενισχύει τα συμπεράσματα ερευνών σχετικά με την πιθανή νευροτοξικότητα των μικροκυστινών. Τα αποτελέσματα πολλών εργαστηριακών πειραμάτων έχουν αποδείξει ότι ακόμα και χαμηλές συγκεντρώσεις μικροκυστινών στους ιστούς των καρκινοειδών μπορούν να οδηγήσουν σε φυσιολογικές και βιοχημικές διαταραχές, όπως αύξηση της κατανάλωσης του οξυγόνου, οξειδωτική καταστροφή και αναστολή των ενζύμων, που σχετίζονται με τη μεταφορά των ιόντων νατρίου και καλίου (Vinagre et al., 2003; Pinho et al., 2005).

Από τους μακροασπόνδυλους οργανισμούς, που εξετάστηκαν στην παρούσα ενότητα, ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει το γαστερόποδο *Viviparus contectus*. Πρόκειται για έναν οργανισμό που βρίσκεται σε μεγάλη αφθονία στα λιμναία οικοσυστήματα της Ευρώπης και αποτελεί τροφή για πολλά πτηνά που ζουν στις λίμνες, για τους ιχθύες αλλά και για τα θηλαστικά (Ozawa et al., 2003). Οι συγκεντρώσεις των μικροκυστινών που ανιχνεύθηκαν στον παραπάνω οργανισμό της Λίμνης Παμβώτιδας (684.96ng MC-LReq /g-1074.07ng MC-LR eq /g) είναι συγκρίσιμες με τις αντίστοιχες συγκεντρώσεις (1600 ng MC-LR eq /g - 3300 ng MC-LR eq /g) που ανίχνευσαν οι Gkelis et al., (2006), στον ίδιο οργανισμό της Λίμνης Παμβώτιδας, το 2000. Εντούτοις, είναι πολύ χαμηλότερες από τις συγκεντρώσεις των μικροκυστινών (19.5μg MC-LR eq /g) που ανιχνεύθηκαν στο γαστερόποδο *Sinotaila histrica* της Λίμνης

Biwa στην Ιαπωνία (Ozawa et al., 2003). Η θετική συσχέτιση των μικροκυστινών που περιέχονταν στο φυτοπλαγκτό και στους ιστούς τριών ειδών γαστερόποδων (*Lymnaea stagnalis*, *Physa gyrina*, και *Heliosoma trivolvis*), αποδεικνύει ότι η κύρια οδός πρόσληψης των μικροκυστινών από τα γαστερόποδα είναι μέσω της τροφής τους (Zurawell et al., 1999). Εκτός από τη σημασία των γαστερόποδων ως μέρος της διατροφής πολλών οργανισμών, τα γαστερόποδα διακρίνονται επίσης γιατί διαθέτουν ταχύτατο μηχανισμό αποτοξίκωσης των μικροκυστινών (Yokoyama & Park, 2002; Ozawa et al., 2003; Gerard et al., 2005). Αυτό το χαρακτηριστικό τους πιθανώς σχετίζεται και με τη μεγάλη ανθεκτικότητά τους έναντι στις μικροκυστίνες και την παρουσία τους ακόμη και σε λίμνες με έντονη κυανοβακτηριακή άνθηση.

Σε προηγούμενες ενότητες, έχει δοθεί ιδιαίτερη σημασία στη συσσώρευση των μικροκυστινών σε ιχθύες της Λίμνης Παμβώτιδας όπως οι ιχθύες των ειδών *Carassius gibelio* και *Rutilus rutilus*. Στην παρούσα ενότητα δίνεται έμφαση στη σύγκριση της συσσώρευσης των μικροκυστινών σε είδη της Λίμνης Παμβώτιδας, διαφορετικού τροφικού επιπέδου. Σύμφωνα λοιπόν με τα αποτελέσματά μας, το πλαγκτονοφάγο είδος *Rutilus rutilus* φάνηκε να συσσωρεύει υψηλότερες συγκεντρώσεις μικροκυστινών σε όργανα όπως το ήπαρ και το έντερο, σε σύγκριση με τα παμφάγα είδη *Carassius gibelio* και *Cyprinus carpio* και το σαρκοφάγο, *Silurus aristotelis*. Αυτό το αποτέλεσμα οδηγεί στην άποψη ότι ενδεχομένως είδη κατώτερων τροφικών επιπέδων της Λίμνης Παμβώτιδας δεν εμφανίζουν την τάση να μεταφέρουν τις μικροκυστίνες σε είδη ανώτερων τροφικών επιπέδων. Οι Xie et al., (2005), κατέληξαν σε διαφορετικά συμπεράσματα, όσον αφορά τις μικροκυστίνες που συσσωρεύθηκαν στο ήπαρ ειδών διαφορετικού τροφικού επιπέδου, καθώς στο ήπαρ των σαρκοφάγων ειδών συσσωρεύονταν υψηλότερες συγκεντρώσεις μικροκυστινών. Επιπλέον, οι Ibelings et al. (2005), μελετώντας είδη της Λίμνης IJsselmeer (Ολλανδία) διαφορετικού τροφικού επιπέδου κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι τα πλαγκτονοφάγα είδη ήταν αυτά που συσσωρεύσαν τις υψηλότερες συγκεντρώσεις μικροκυστινών στο ήπαρ τους, ενώ τα σαρκοφάγα είδη συσσωρεύσαν τις

χαμηλότερες συγκεντρώσεις. Οι Fischer & Dietrich (2000), υποστήριξαν ότι οι διαφορές ανάμεσα στο γαστρεντερικό σύστημα των πλαγκτονοφάγων και των σαρκοφάγων ειδών, όπως η μεγαλύτερη επιφάνεια του εντέρου και η μεγαλύτερη προσρόφηση των μικροκυστινών που συναντάται στα πλαγκτονοφάγα είδη, δικαιολογούν τις διαφορές στις συγκεντρώσεις των μικροκυστινών στα διάφορα είδη ιχθύων. Παρόλα αυτά, σε κάθε λίμνη είναι δυνατόν να ισχύουν διαφορετικά αποτελέσματα ως προς τη συσσώρευση των μικροκυστινών, καθώς αυτές χαρακτηρίζονται από διαφορετικούς συνδυασμούς βιοτικών και αβιοτικών παραγόντων (Ibelings et al., 2005). Στην παρούσα ενότητα, αποδείχθηκε ότι όλοι οι ιχθύες ανεξάρτητα του τροφικού επιπέδου που ανήκουν, συσσωρεύουν μικροκυστίνες κατά κύριο λόγο στο ήπαρ και στο έντερο, χαμηλότερες συγκεντρώσεις μικροκυστινών συσσωρεύονται στους νεφρούς και στον εγκέφαλο και οι χαμηλότερες συγκεντρώσεις συσσωρεύονται στις γονάδες και στη σάρκα. Στο ίδιο συμπέρασμα κατέληξαν και οι μελέτες των Kankaanpää et al. (2005), Li et al. (2004), Soares et al. (2004), Xie et al. 2005; Kagalou et al., (2008).

Η συσσώρευση των μικροκυστινών στα αμφίβια είναι σημαντική, δεδομένου ότι τα αμφίβια αποτελούν τους συνδετικούς οργανισμούς ανάμεσα στα υδρόβια και τα χερσαία οικοσυστήματα (White et al., 2007). Στο είδος *Rana epirotica* της Λίμνης Παμβώτιδας ανιχνεύθηκαν σημαντικές ποσότητες μικροκυστινών με τις υψηλότερες συγκεντρώσεις να συσσωρεύονται στο ήπαρ (208.67ng MC-LR eq /g-581.46 ng MC-LR eq /g) και στο πάγκρεας (161.49 ng MC-LR eq /g -554.06 ng MC-LR eq /g), ενώ οι χαμηλότερες συγκεντρώσεις συσσωρεύθηκαν στις γονάδες (68.97 ng MC-LR eq /g -164.62 ng MC-LR eq /g) και στη σάρκα (88.12 ng MC-LR eq /g -325.49 ng MC-LR eq /g) του οργανισμού. Η παρουσία μικροκυστινών στο δέρμα (80.92 ng MC-LR eq /g -419.52 ng MC-LR eq /g) του *Rana epirotica* που παρατηρήθηκε για πρώτη φορά στην παρούσα μελέτη, εγείρει ερωτήματα σχετικά με την πιθανή πρόσληψη των μικροκυστινών διαμέσου του δέρματος του οργανισμού εκτός από την πρόσληψη μέσω της πεπτικής οδού. Οι Fischer & Dietrich, (2000),

ανίχνευσαν συγκεντρώσεις της μικροκυστίνης- LR στα σπλάχνα των λαρβών του αμφιβίου *Xenopus laevis*, όταν αυτές εκτέθηκαν σε συγκέντρωση 450 mg/l της παραπάνω τοξίνης. Επιπλέον, συγκεντρώσεις μικροκυστινών έχουν ανιχνευθεί στο είδος *Rana epirotica* της Λίμνης Παμβώτιδας και από τους Gkelis et al., (2006), οι οποίοι μέτρησαν υψηλές συγκεντρώσεις στα σπλάχνα (465 ng/g) του οργανισμού και χαμηλότερες στη σάρκα (262 ng/g). Με δεδομένη την παγκόσμια μείωση του πληθυσμού των αμφιβίων (Kiesecker et al., 2001), η μελέτη της συσσώρευσης των μικροκυστινών στους ιστούς τους αποτελεί απαραίτητο εργαλείο για την προστασία του πληθυσμού τους.

Η κυριότερη οδός έκθεσης των υδρόβιων οργανισμών στις μικροκυστίνες μέχρι τώρα θεωρείται ότι είναι η διατροφή (Snyder et al., 2002). Επομένως, είναι φυσικό οι οργανισμοί που τρέφονται άμεσα από το φυτοπλαγκτό, όπως το ζωοπλαγκτό, τα δίθυρα και τα φυτοπλαγκτονοφάγα είδη να είναι περισσότερο εκτεθειμένα στα τοξικά κυανοβακτήρια και στις τοξίνες τους. Για αυτούς όμως τους υδρόβιους οργανισμούς, που δεν τρέφονται άμεσα από το φυτοπλαγκτό, η έκθεση στις μικροκυστίνες αναμένεται να λαμβάνει χώρα κυρίως διαμέσου της τροφικής αλυσίδας (Adamovsky et al., 2007). Επιπλέον, ο κίνδυνος της συσσώρευσης μικροκυστινών διαμέσου της τροφικής αλυσίδας είναι ακόμα μεγαλύτερος όταν ισχύει και το φαινόμενο της βιομεγέθυνσης (Ibelings et al., 2005). Από τον υπολογισμό του δείκτη βιομεγέθυνσης των μικροκυστινών, φαίνεται ότι στη Λίμνη Παμβώτιδα δε λαμβάνει χώρα βιομεγέθυνση των μικροκυστινών, καθώς όλοι οι δείκτες είχαν τιμή <1. Αυτό σημαίνει ότι κανένας από τους οργανισμούς που εξετάστηκαν δεν συσσώρευσε στο σώμα του υψηλότερο ποσό μικροκυστινών από αυτό που περιεχόταν στην τροφή του. Οι Ibelings et al., (2005), μελετώντας τους δείκτες βιομεγέθυνσης των μικροκυστινών στη Λίμνη IJsselmeer της Ολλανδίας, παρατήρησαν επίσης ότι όλοι είχαν τιμή <1, συμπεραίνοντας ότι στην παραπάνω λίμνη δεν υπάρχει βιομεγέθυνση των μικροκυστινών. Η διεθνής βιβλιογραφία υποστηρίζει ότι δεν υφίσταται βιομεγέθυνση των μικροκυστινών (Karjalainen et al., 2005). Μια εξήγηση για την απουσία της βιομεγέθυνσης των μικροκυστινών είναι η μεγάλη υδροφιλικότητα

που εμφανίζουν τα περισσότερα ανάλογα των μικροκυστινών (Ward & Codd, 1999). Από το ποσό των μικροκυστινών που λαμβάνει ένας υδρόβιος οργανισμός διαμέσου της τροφής του, στην πραγματικότητα πολύ μικρή ποσότητα συσσωρεύεται στους ιστούς του (Rohrlack et al., 2005). Επιπρόσθετα, κάποια ποσότητα από αυτή που μεταφέρθηκε στους ιστούς του, υπόκειται στην διαδικασία της αποτοξίκωσης. Ο μηχανισμός της αποτοξίκωσης, δρα σε κάθε βήμα μέσα στην τροφική αλυσίδα (Martins & Vasconcelos, 2009). Εντούτοις, οι σημαντικές ποσότητες των μικροκυστινών που έχουν ανιχνευθεί σε οργανισμούς ανώτερων τροφικών επιπέδων, όπως στους οργανισμούς ανώτερων επιπέδων της Λίμνης Παμβώτιδας, υποστηρίζουν ότι πραγματοποιείται μεταφορά των τοξινών ανάμεσα στους οργανισμούς. Μάλιστα, το ποσό που μεταφέρεται είναι δυνατόν να έχει δυσάρεστες επιπτώσεις στους υδρόβιους οργανισμούς, όπως έχει αποδειχθεί από πολλές μελέτες (Ibelings et al., 2005). Από τα παραπάνω, γίνεται φανερό ότι η απουσία βιομεγέθυνσης των μικροκυστινών δε θα πρέπει να αποτελεί λόγο παράκαμψης του ελέγχου των συγκεντρώσεων των μικροκυστινών σε λίμνες που χαρακτηρίζονται από την παρουσία τοξικών κυανοβακτηρίων.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7

**Εκτίμηση της τοξικότητας της κυανοβακτηριακής άνθησης στη
Λίμνη Παμβώτιδα με τη χρήση βιοδοκιμών με διαφορετικά είδη
οργανισμών**



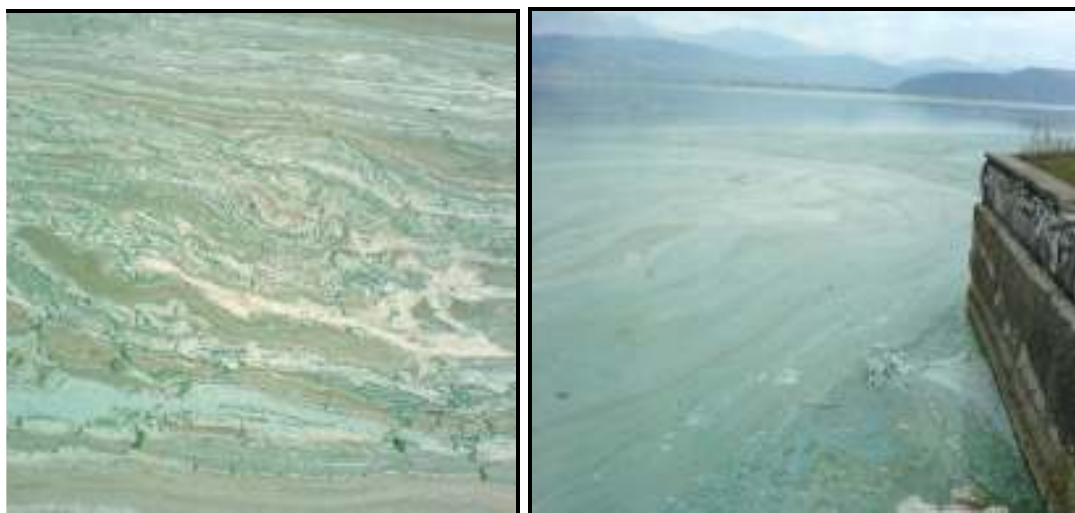
7.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η μείωση των υδάτινων αποθεμάτων, η συνεχόμενη αύξηση του ευτροφισμού των εσωτερικών υδάτων και οι παγκόσμιες κλιματικές αλλαγές, καθιστούν την εκτίμηση της τοξικότητας των κυανοβακτηρίων στα εσωτερικά ύδατα, υψίστης αναγκαιότητας (Beardall & Raven, 2004). Οι βιοδοκιμές με μια σειρά από διαφορετικά είδη οργανισμών αποτελούν τις πιο συχνά χρησιμοποιούμενες μεθόδους για την εκτίμηση της τοξικότητας των κυανοβακτηρίων πολλών εσωτερικών υδάτων (Carmichael, 1997).

Στη Λίμνη Παμβώτιδα το φαινόμενο της άνθησης των τοξικών κυανοβακτηρίων είναι συχνό, ειδικότερα τους θερμούς μήνες (Vardaka et al., 2005; Gkelis et al., 2005; Kagalou et al., 2008; Vareli et al., 2009; Papadimitriou et al., 2009)(Εικόνα 7.1). Παρόλα αυτά, μέχρι σήμερα, δεν έχει γίνει μελέτη της τοξικότητας των κυανοβακτηρίων της λίμνης σε επίπεδο ζωντανών οργανισμών. Επιπλέον, περιστατικά θνησιμότητας ιχθύων κατά τη διάρκεια της εμβρυϊκής και λαρβικής ανάπτυξής τους, έχουν παρατηρηθεί από τη Δημοτική Επιχείρηση της Λίμνης Παμβώτιδας (ΔΕΛΙ), την υπηρεσία Αλιείας της Νομαρχιακής Αυτοδιοίκησης, αλλά και από προσωπικές παρατηρήσεις. Η Λίμνη Παμβώτιδα αποτελεί περιοχή στην οποία λαμβάνουν χώρα διάφορες δραστηριότητες όπως η εκτροφή ζώων, αλιεία, άρδευση και ψυχαγωγικά αθλήματα (Kagalou & Leonardos, 2009). Η παρουσία όμως τοξικών κυανοβακτηρίων στο νερό, πιθανώς να εγκυμονεί κινδύνους για την υγεία των ζώων και των ανθρώπων.

Οι παραπάνω παρατηρήσεις, οδήγησαν στην πραγματοποίηση του ελέγχου της κυανοβακτηριακής τοξικότητας στη Λίμνη Παμβώτιδα. Ο έλεγχος της τοξικότητας πραγματοποιήθηκε με βιοδοκιμές με νεαρά άτομα του είδους *Danio rerio* (zebrafish) και με βιοδοκιμές με επίμυες του είδους *Mus musculus* (Swiss mice). Οι παραπάνω οργανισμοί δεν ανήκουν στην πανίδα του οικοσυστήματος της Λίμνης Παμβώτιδας, εντούτοις, επιλέχθηκαν διότι αποτελούν αξιόπιστους οργανισμούς-μοντέλα σε πληθώρα τοξικολογικών πειραμάτων. Επιπλέον, η χρήση ειδών ιχθύων που διαβιούν στη Λίμνη Παμβώτιδα ήταν αδύνατη, καθώς

δεν υπάρχουν καλλιέργειες των παραπάνω ειδών. Οι οργανισμοί που χρησιμοποιήθηκαν ως μοντέλα στην παρούσα ενότητα, είναι δυνατόν να συμβάλλουν στον εμπλουτισμό των γνώσεων μας σχετικά με την 'πίεση' που πιθανώς ασκείται από τα κυανοβακτήρια στους οργανισμούς που ζουν στη Λίμνη Παμβώτιδα.



Εικόνα 7.1 Άνθηση των κυανοβακτηρίων στη Λίμνη Παμβώτιδα (από *Ντάκης Αλέξανδρος*).

Figure 7.1 Cyanobacterial bloom from Lake Pamvotis (from *Ntakis Alexandros*)

7.2 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

7.2.1 Συλλογή δειγμάτων με επιπολασμούς κυανοβακτηρίων

Προκειμένου να πραγματοποιηθούν οι βιοδοκιμές, συλλέχθηκαν δείγματα με επιπολασμούς κυανοβακτηρίων από έναν παρόχθιο σταθμό της Λίμνης Παμβώτιδας, στην περιοχή του Περάματος. Η οικολογική σημασία του σταθμού, η συγκέντρωση των μικροκυστινών στο νερό του σταθμού καθώς και ο ποιοτικός προσδιορισμός των κυρίαρχων κυανοβακτηριακών γενών του σταθμού, έχουν περιγραφεί αναλυτικά στα Κεφάλαια 3 και 6. Η συλλογή έλαβε χώρα τον Σεπτέμβριο του 2008 από το επιφανειακό στρώμα νερού με δοχεία χωρητικότητας 1500 ml. Ο συνολικός όγκος που συλλέχθηκε ήταν 20 l και ακολούθησε η λυοφιλοποίησή του σε συσκευή λυοφίλισης τύπου ALPHA 1-4 (Martin Christ, Gefriertrocknungsanlagen GmbH). Τα λυοφιλοποιημένα

δείγματα αποθηκεύτηκαν στους -20 °C μέχρι την εκχύλισή τους και τον ποσοτικό προσδιορισμό των μικροκυστινών που περιέχονταν σε αυτά.

7.2.2 Εκχύλιση μικροκυστινών

Η εκχύλιση των μικροκυστινών από τα δείγματα με τους επιπολασμούς των κυανοβακτηριδίων έχει ήδη περιγραφθεί αναλυτικά σε προηγούμενη ενότητα. Περιληπτικά περιλαμβάνει την ομογενοποίηση του λυοφιλοποιημένου υλικού με 100% μεθανόλη, ανάδευση, κατεργασία με υπερήχους, φυγοκέντρηση, διήθηση διαμέσου ηθμών 0.2 μm. Το εκχύλισμα που προέκυψε αραιώθηκε με κατάλληλο όγκο νερού, ώστε η συγκέντρωση της περιεχόμενης μεθανόλης να μειωθεί στο 0.1% σύμφωνα με τους Ghazali et al., (2009). Το παραπάνω αραιωμένο εκχύλισμα προσδιορίστηκε ως προς το περιεχόμενό του σε μικροκυστίνη-LR με τη χρήση Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Πιέσεως (HPLC). Στη συνέχεια, διαφορετικές συγκεντρώσεις του κυανοβακτηριακού εκχυλίσματος χρησιμοποιήθηκαν στις βιοδοκιμές.

7.2.3 Ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός της μικροκυστίνης-LR του κυανοβακτηριακού εκχυλίσματος με τη χρήση Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Πιέσεως (HPLC).

Το κυανοβακτηριακό εκχύλισμα προσδιορίστηκε ποιοτικά και ποσοτικά ως προς την περιεκτικότητά του σε μικροκυστίνη-LR, με τη χρήση της υγρής χρωματογραφίας υψηλής πίεσης. Το παραπάνω εκχύλισμα αποτελείται από μια ποικιλία κυανοβακτηριακών μεταβολιτών. Εντούτοις, επιλέχτηκε ο προσδιορισμός του ως προς τη μικροκυστίνη-LR, καθώς πρόκειται για το πιο ευρέως διαδεδομένο και τοξικό ανάλογο των μικροκυστινών (Rinehart et al., 1994; Carmichael, 1997).

Η υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης είναι η ευρύτερα χρησιμοποιούμενη αναλυτική τεχνική για τον προσδιορισμό των κυανοτοξινών (Lawton et al., 1994a). Η τεχνική αυτή πλεονεκτεί, έναντι της τεχνικής του ενζυμοσυνδεδεμένου ανοσοπροσοροφητικού

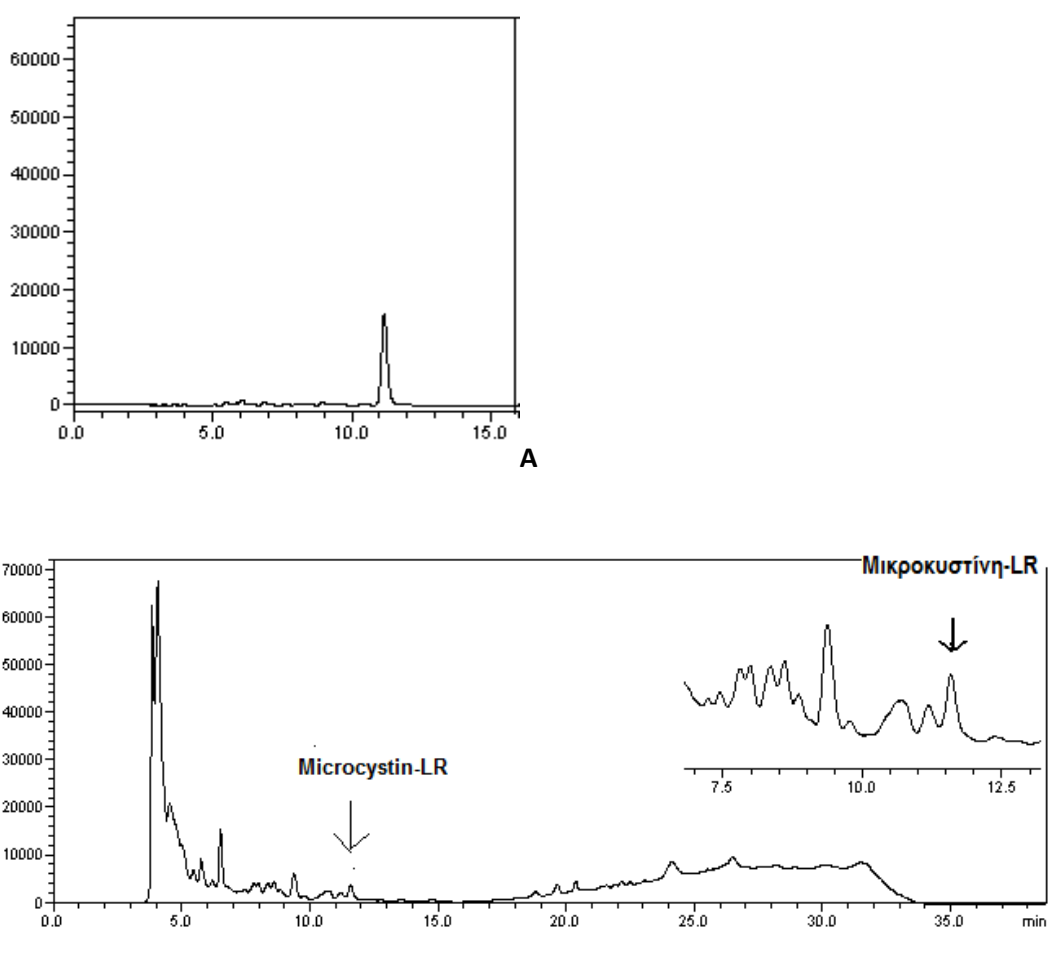
προσδιορισμού, διότι μπορεί να προσδιορίσει ξεχωριστά κάθε ανάλογο μικροκυστίνης. Εντούτοις, μειονέκτημά της είναι η μικρή ευαισθησία της σε σχέση με τις υπόλοιπες αναλυτικές τεχνικές προσδιορισμού των μικροκυστινών (Rapala et al., 2002).

Ο προσδιορισμός έγινε σε χρωματογράφο Shimadzu HPLC system (Duisburg, Germany) συνδεδεμένο με HP UV/Vis ανιχνευτή παράταξης διοδίων (SPD-MZOA), θερμοστάτη CTO 10AS και εξοπλισμένο με αυτοματοποιημένο δειγματολήπτη και σύστημα απαέρωσης. Η στήλη χρωματογραφίας που χρησιμοποιήθηκε ήταν αντίστροφης φάσης ThermoHypersil (ODS) C18 (250mm x 4.6mm, 5μm). Ο προσδιορισμός της μικροκυστίνης- LR έγινε σύμφωνα με τη μέθοδο των Lawton et al., (1994a). Για την έκλυση της μικροκυστίνης- LR χρησιμοποιήθηκε κινητή φάση η οποία αποτελούταν από δυαδικό σύστημα διαλυτών (A) : υδατικό διάλυμα τριφθορικού οξέος (TFA) 0.05% (v/v) και (B): διάλυμα ακετονιτριλίου (CH₃CN) με (TFA) 0.05% (v/v) (Sproof et al., 2001; Lawton et al., 1994a). Προκειμένου να διαπιστωθεί ο βαθμός στον οποίο επηρεάζεται ο χρόνος συγκράτησης των ενώσεων, αλλά και η ποιότητα των κορυφών, πραγματοποιήθηκαν δοκιμές εφαρμόζοντας την ισοκρατική και βαθμωτή έκλυση των ουσιών, μεταβάλλοντας την αναλογία του ακετονιτριλίου στο εκλουστικό σύστημα. Τελικά επιλέχθηκε η βαθμωτή έκλυση, ως κατάλληλη: H₂O: CH₃CN=50:50 v/v για 10 λεπτά, 40:60 v/v για 5 λεπτά, 10:90 v/v για 5 λεπτά και 50:50 v/v για 10 λεπτά.

Η ταχύτητα ροής της κινητής φάσης ρυθμίστηκε σε 0.6 mL min⁻¹ και η στήλη εξισορροπήθηκε στο σύστημα της κινητής φάσης στους 40 °C (Rapala et al., 2002). Ο όγκος του κυανοβακτηριακού εκχυλίσματος που εισήχθη στη στήλη ήταν 50 μl. Ο χρόνος της χρωματογραφικής ανάλυσης ήταν 30 λεπτά. Πριν την ανάλυση του κυανοβακτηριακού εκχυλίσματος, έγινε εισαγωγή στη στήλη πρότυπου διαλύματος μικροκυστίνης-LR (ALEXIS BIOCHEMICALS, Lausen, Switzerland) γνωστής συγκέντρωσης. Επίσης πριν την εισαγωγή του εκχυλίσματος και της πρότυπης ουσίας γίνονταν εισαγωγή τυφλού δείγματος (50% v/v μεθανόλη).

Η ανίχνευση της μικροκυστίνης-LR στα 238nm και η αναγνώρισή της έγιναν βάσει του χρόνου κατακράτησής και του φάσματος UV, σε σύγκριση με την πρότυπη ουσία (Rapala et al., 2002; Lawton et al., 1994a)(Εικόνα 7.2). Τα αποτελέσματα δίνονται σε mg MC-LR g⁻¹ λυοφιλιωμένου υλικού.

Η ανάλυση του λυοφιλιωμένου κυανοβακτηριακού υλικού της λίμνης Παμβώτιδας έδειξε ότι σε αυτό περιέχονταν 0.632mg MC-LR g⁻¹.



Εικόνα 7.2 Χρωματογράφημα (A) πρότυπης ουσίας της μικροκυστίνης- LR και (B) κυανοβακτηριακού εκχυλίσματος από τη Λίμνη Παμβώτιδα
Figure 7.2 HPLC Chromatograms of (A) standard of Microcystin-LR and (B) cyanobacterial bloom from Lake Pamvotis

7.2.4 Βιοδοκιμή με επίμυες

Η βιοδοκιμή με επίμυες είναι μια παραδοσιακή μέθοδος ελέγχου της τοξικότητας των κυανοβακτηριακών εκχυλισμάτων (Carmichael, 1997). Σύμφωνα, λοιπόν, με αυτή, οι κυανοτοξίνες μπορούν να ομαδοποιηθούν σε ηπατοτοξίνες και νευροτοξίνες, αναλόγως με τον χρόνο επιβίωσής τους και τα τοξικά συμπτώματα που εμφανίζουν αυτοί (Skulberg et al., 1994; Carpenter et al., 1999; Underdal et al., 1999; Baker et al., 2001). Τα πλεονεκτήματα της βιοδοκιμής με επίμυες είναι ότι προσφέρει ένα σχετικά γρήγορο αποτέλεσμα και είναι πρότυπη μέθοδος (Falconer, 1993; Premazzi & Volterra, 1993). Επίσης, η μέθοδος προσφέρει πληροφορίες που σχετίζονται με τα συμπτώματα της τοξίκωσης, τον χρόνο επιβίωσης καθώς και ποσοτικές πληροφορίες. Για τους παραπάνω λόγους, η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται ευρέως στην επιβεβαίωση της τοξικότητας των κυανοβακτηριακών εκχυλισμάτων (Oudra et al., 2002; Pan et al., 2008).

Για τον έλεγχο της τοξικότητας του κυανοβακτηριακού εκχυλίσματος, εφαρμόστηκε η βιοδοκιμή σε 20 αρσενικούς επίμυες βάρους 20-25g. Σε αυτούς χορηγήθηκαν ενδοπεριτοναϊκά διαφορετικές συγκεντρώσεις του κυανοβακτηριακού εκχυλίσματος (30, 40, 60 και 80 mg κυανοβακτηριακής βιομάζας ανα kg βάρους σώματος). Οι παραπάνω συγκεντρώσεις του κυανοβακτηριακού εκχυλίσματος περιείχαν ανάμεσα στους κυανοβακτηριακούς μεταβολίτες και διαφορετικές συγκεντρώσεις της μικροκυστίνης- LR (76 μg μικροκυστίνη-LR/kg βάρους σώματος, 105μg μικροκυστίνη-LR/kg βάρους σώματος, 150 μg μικροκυστίνη-LR/kg βάρους σώματος, 200 μg μικροκυστίνη-LR/kg βάρους σώματος, αντιστοίχως). Στη βιοδοκιμή χρησιμοποιήθηκαν και 5 επίμυες ως μάρτυρες, οι οποίοι ενέθηκαν ο καθένας με 1 mL διαλύματος NaCl 0.9% (Εικόνα 7.3).

Η τοξικότητα του κυανοβακτηριακού εκχυλίσματος προσδιορίστηκε μέσω του υπολογισμού της τιμής LD₅₀, η οποία αναφέρεται στη συγκέντρωση του κυανοβακτηριακού εκχυλίσματος, που είναι ικανή να

προκαλέσει το θάνατο του μισού αριθμού πειραματοζώων από τον συνολικό αριθμό στους οποίους χορηγήθηκε. Επίσης, καταγράφηκε ο χρόνος επιβίωσης των πειραματοζώων σε χρονικό διάστημα 24 ωρών, ενώ καταγράφονταν πιθανά συμπτώματα τοξίκωσης. Σε περίπτωση θανάτων των επίμυων, πραγματοποιούνταν μεταθανάτια εξέτασή τους. Στο τέλος της δοκιμής, το ήπαρ των επίμυων απομονωνόταν και ζυγίζονταν προκειμένου να προσδιοριστεί το ποσοστό του σχετικού βάρους του ήπατος.



Εικόνα 7.3 Επίμυες *Mus musculus* που χρησιμοποιήθηκαν στις βιοδοκιμές

Figure 7.3 Mice *Mus musculus*, used in bioassay

7.2.5 Βιοδοκιμή με ιχθύες του είδους *Danio rerio*

7.2.5.1 Χαρακτηριστικά του είδους *Danio rerio*

Οι ιχθύες αποτελούν μετά τα θηλαστικά, τα πιο συχνά χρησιμοποιούμενα σπονδυλωτά στην περιβαλλοντική τοξικολογία (Schirmer, 2006). Ειδικότερα, τα πρώτα στάδια ανάπτυξης των ιχθύων είναι πολύ ευαίσθητα στις τοξίνες, λόγω της οντογένεσης, με αποτέλεσμα αυτοί οι οργανισμοί να είναι πολύτιμοι στη μελέτη διαφόρων τοξικών ουσιών (Buryuskova' et al., 2006). Ανάμεσα στους ιχθύες, το είδος *Danio rerio* (zebrafish) έχει ιδιαίτερα χαρακτηριστικά, τα οποία το κατατάσσουν στα ευρύτερα χρησιμοποιούμενα μοντέλα-οργανισμούς (Keil et al., 2002).

Ο ιχθύς *Danio rerio* είναι ένα τροπικό είδος, το οποίο ζει στα εσωτερικά ύδατα της Βόρειας Ινδίας, του Βόρειου Πακιστάν, του Νεπάλ και της Νότιας Ασίας (Menon, 1999). Ανήκει στην οικογένεια *Cyprinidae* και το σώμα του φέρει παράλληλες γραμμές (Talwar & Jhingran, 1991) (Εικόνα 7.4). Το μήκος των ενήλικων ατόμων του *Danio rerio* είναι πολύ μικρό και κυμαίνεται στα 3-5 cm (Menon, 1999). Επίσης στις τοξικολογικές μελέτες προτιμάται αυτός ο οργανισμός λόγω του μικρού του μεγέθους, το οποίο συνεπάγεται μικρότερο οικονομικό κόστος και χρήση μικρότερου όγκου τοξικών ουσιών (Hill et al., 2005).

Σημαντικό χαρακτηριστικό αυτού του είδους είναι η μεγάλη γονιμότητά του. Όταν οι συνθήκες είναι ευνοϊκές, ένα ενήλικο ζευγάρι είναι δυνατόν να παράξει μέχρι και 200 αυγά μέσα σε μια ημέρα. Το ίδιο ζευγάρι είναι ικανό να γεννήσει ξανά μετά από χρονικό διάστημα 5 ημερών (Hill et al., 2005). Αυτό το χαρακτηριστικό, καθιστά το *Danio rerio* πολύτιμο οργανισμό-μοντέλο στις τοξικολογικές μελέτες που συνήθως απαιτούν μεγάλο αριθμό ατόμων για την επιτυχή διενέργεια των πειραμάτων.

Η ανάπτυξη του *Danio rerio* είναι παρόμοια με την εμβρυογένεση των ανώτερων σπονδυλωτών και επιπλέον, τα αυγά και τα έμβρυα του είναι διάφανα (Wixon, 2000) με αποτέλεσμα οι διάφορες μορφολογικές αλλαγές του οργανισμού να είναι εύκολα ορατές με μικροσκοπική παρατήρηση (Hill et al., 2005). Σημαντικό είναι επίσης το γεγονός, ότι ο οργανισμός αυτός αναπτύσσεται εξωτερικά του σώματος του γενήτορα, με αποτέλεσμα να είναι δυνατή η παρακολούθηση της ανάπτυξής του, σε αντίθεση με τα θηλαστικά (Hill et al., 2005).



Εικόνα 7.4. Ζεύγος ατόμων του είδους *Danio rerio*. Πάνω διακρίνεται το θηλυκό άτομο και κάτω το αρσενικό (από www.danios.info.)

Figure 7.4. *Danio rerio*. In the upper part is the female and the male is below (from www.danios.info.)

7.2.5.2 Περίληψη οντογένεσης του ιχθύος *Danio rerio*

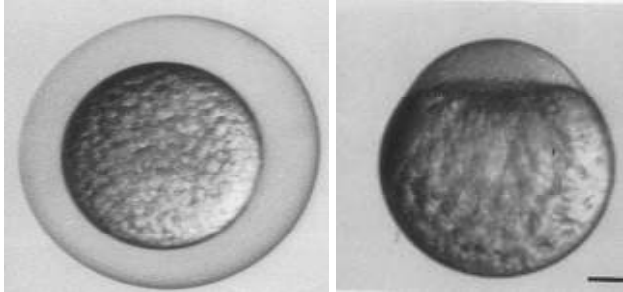
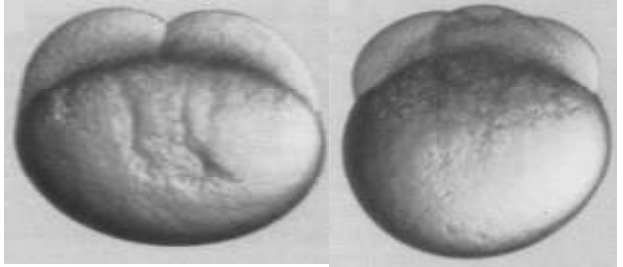
Τα βασικά στάδια της εμβρυϊκής ανάπτυξης του *Danio rerio* περιγράφονται συνοπτικά στον Πίνακα 7.1, όπως τα παρατήρησαν και περιέγραψαν οι Kimmel et al., (1995).

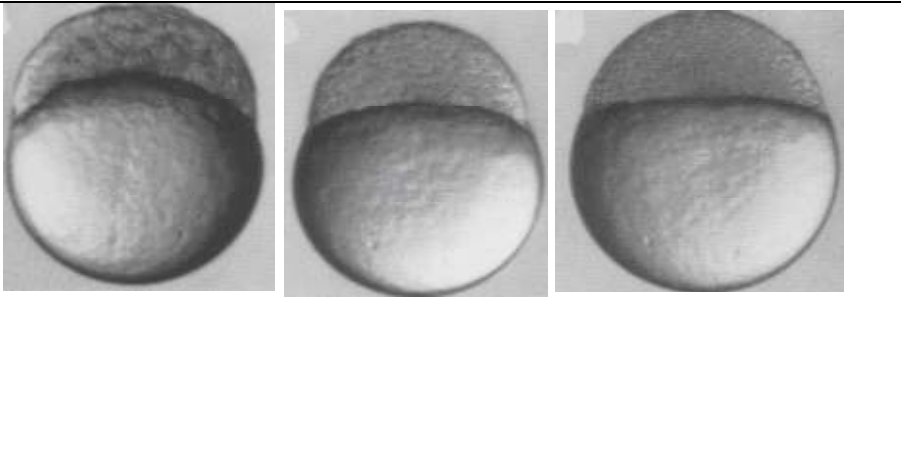
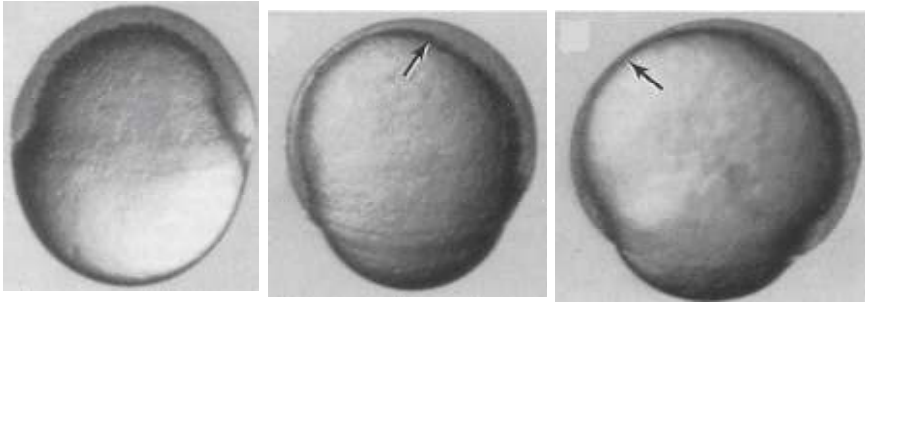
Τα αυγά του *Danio rerio*, όπως και όλων των Τελεόστεων είναι τελολεκιθικά δηλαδή το κυτταρόπλασμα περιορίζεται σε μια μικρή περιοχή στο ζωικό πόλο ενώ το υπόλοιπο αυγό αποτελείται από λέκιθο (Kimmel et al., 1995). Η αυλάκωση που ακολουθεί μετά τη γονιμοποίηση είναι μεροβλαστική, επομένως, αυτή περιορίζεται στο κυτταρόπλασμα, κοντά στο ζωϊκό μόνο πόλο (Nagel, 2002). Το έμβρυο προέρχεται από το βλαστόδισκο, ο οποίος είναι μια λεπτή κυτταροπλασματική στοιβάδα (Nagel, 2002).

Η ωρίμανση των γενετικών κυττάρων του *Danio rerio* ρυθμίζεται από την διάρκεια της ημέρας. Για αυτό το λόγο σε εργαστηριακές συνθήκες έχει την ικανότητα να ωτοκεί συνεχώς, εάν οι συνθήκες φωτισμού είναι οι κατάλληλες με φωτοπερίοδο 14h-10h (διάρκεια φωτός-διάρκεια σκότους) (Kimmel et al., 1995). Η διάρκεια της ζωής των ενήλικων ατόμων είναι από 5 έως 7 χρόνια.

Πίνακας 7.1. Τα αναπτυξιακά στάδια του *Danio rerio* που παρατηρούνται κατά την οντογένεσή του από τη στιγμή της γονιμοποίησης έως το λεκιθοφόρο νυμφικό στάδιο, σύμφωνα με τους Kimmel et al., (1995).

Table 7.1. Developmental stages of *Danio rerio*, according to Kimmel et al., (1995).

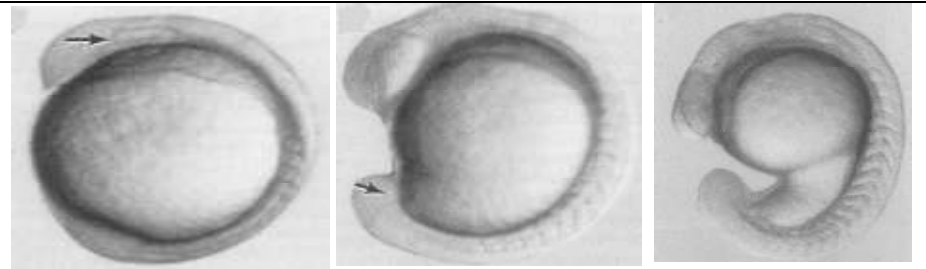
Περίοδος	Διάρκεια(h)	Περιγραφή	Εικόνα
Ζυγωτό	0-0.45	Το πρόσφατα γονιμοποιημένο αβγό μέχρι και την ολοκλήρωση του πρώτου ζυγωτικού κύκλου	
Αυλάκωση	0.45-2	Κατά την διάρκεια αυτής της περιόδου πραγματοποιούνται οι 6 πρώτες αυλακώσεις. Μετά την πρώτη αυλάκωση τα κύτταρα ή βλαστομερίδια διαιρούνται κάθε 15 λεπτά.	

<p>Βλαστίδιο</p>	<p>2 .15-5.15</p>	<p>Ραγδαίες μετασυγχρονισμένες κυτταρικές διαιρέσεις οδηγούν σε διαρκείς ασυγχρόνιστες διαιρέσεις κατά τη μετάβαση στην περίοδο του μεταβλαστίδιου. Σε αυτό το σημείο ξεκινά και η επιβολή.</p>	
<p>Γαστριδίωση</p>	<p>5.15-10</p>	<p>Μορφογενετικές κινήσεις πολυδιδείδυσης και συγκλίνουσας επέκτασης σχηματίζουν την υποβλάστη, την επιβλάστη και το νευρικό άξονα κατά την διάρκεια της επιβολής.</p>	

Νευριδίωση

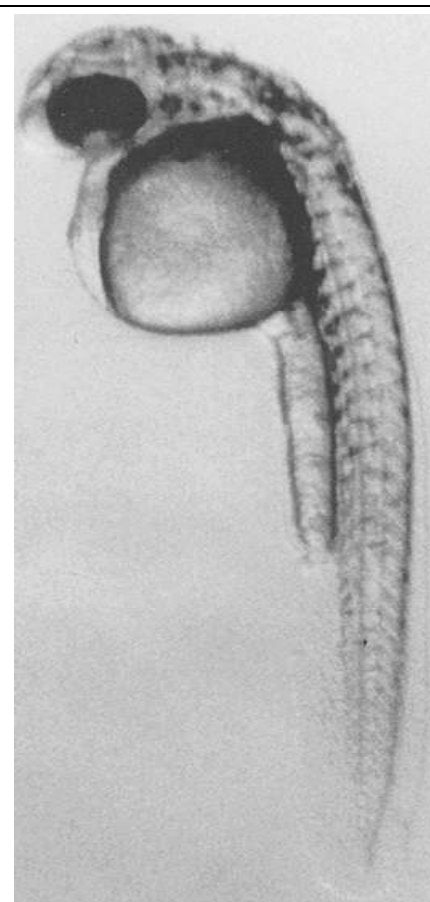
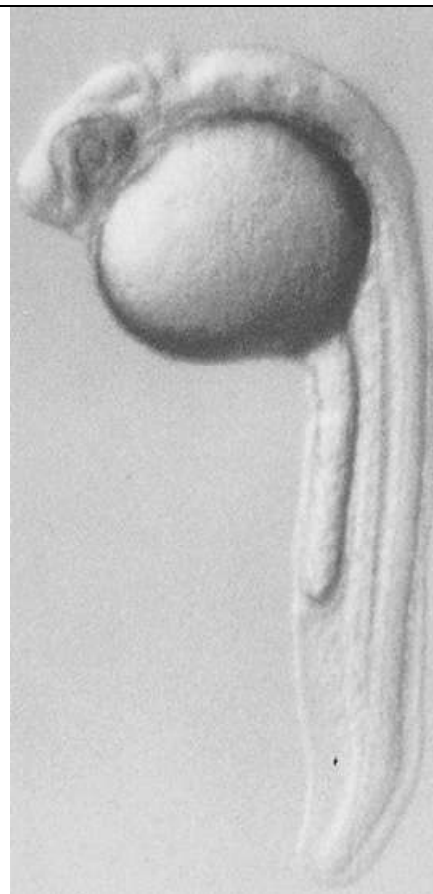
10-24

Σχηματισμός σωματιών,
σπλαχνικών τόξων και
νευρομεριδίων.
Πρωτογενής
οργανογένεση και οι
πρώτες κινήσεις. Η
ουρά αρχίζει να
εμφανίζεται.



Φυλοτυπικό στάδιο 24-42

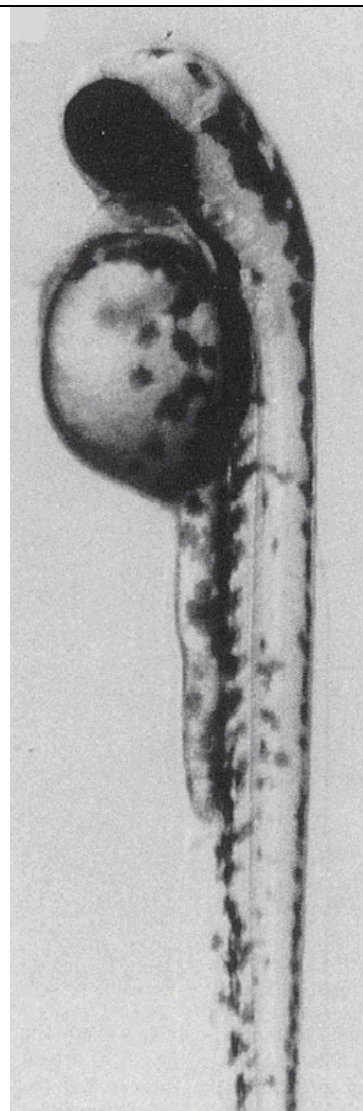
Φυλοτυπικό στάδιο εμβρύου. Ο άξονας του σώματος ισιώνει από την αρχική του καμπυλότητα γύρω από το λεκιθικό ασκό. Η κυκλοφορία, ο χρωματισμός και τα πτερύγια αρχίζουν να αναπτύσσονται.



Εκκόλαψη

48-72

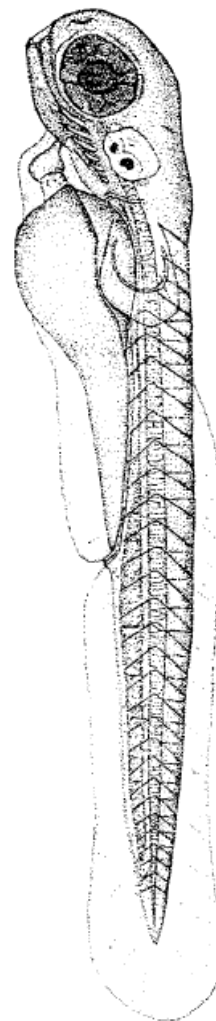
Ολοκλήρωση της ταχείας μορφογένεσης των πρωτογενών οργανικών συστημάτων. Ανάπτυξη του χόνδρου στο κεφάλι και στα θωρακικά πτερύγια. Η εκκόλαψη εξελίσσεται ασυγχρόνιστα.



Πρώιμη νύμφη

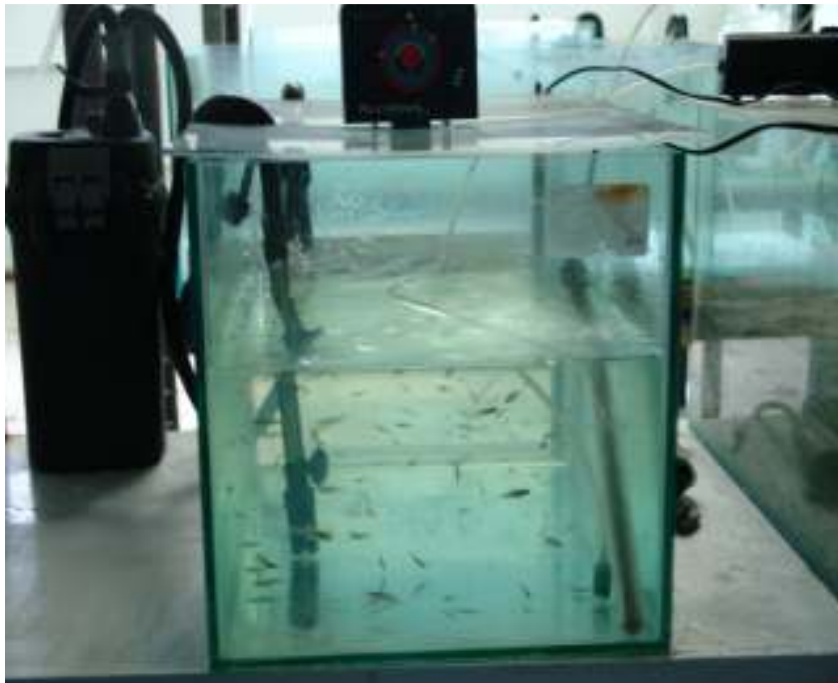
72

Η νυκτική κύστη
διογκώνεται. Αναζήτηση
τροφής και
συμπεριφορές ενεργούς
αποφυγής



7.2.5.3 Αναπαραγωγή του *Danio rerio*

Για τα πειράματα του ελέγχου τοξικότητας με τον ιχθύ *Danio rerio* έγινε προμήθεια αρσενικών και θηλυκών ενήλικων ατόμων από τοπικό ειδικό κατάστημα. Οι γεννήτορες τοποθετήθηκαν σε ενυδρείο όγκου 400cm³, με αναλογία φύλων 2 αρσενικά:1 θηλυκό (Εικόνα 7.5). Η φωτοπερίοδος ρυθμίστηκε σε 14h φως:10h σκοτάδι, σύμφωνα με τους Kimmel et al., (1995). Το ενυδρείο ήταν εξοπλισμένο με φίλτρο καθαρισμού του νερού και παροχή οξυγόνου. Η θερμοκρασία ρυθμιζονταν με θερμοστάτες στους 28° C.



Εικόνα 7.5 Ενυδρείο με άτομα του *Danio rerio*
Figure 7.5 Aquarium of *Danio rerio*

Ο έλεγχος της θερμοκρασίας, του διαλυμένου οξυγόνου, του pH και των συγκεντρώσεων των ενώσεων αζώτου (NO₂⁻, NO₃⁻, NH₃) πραγματοποιούνταν καθημερινά. Οι ιχθύες ταιΐζονταν 2 φορές την ημέρα, με ξηρή βιομηχανοποιημένη τροφή υψηλής θρεπτικής αξίας. Καθημερινά γινόταν αντικατάσταση ενός μεγάλου μέρους του νερού. Επίσης απομακρύνονταν και τα υπολείμματα τροφής από τον πυθμένα

των δεξαμενών με σιφωνισμό. Τέλος, καθημερινά ελεγχόταν και η συμπεριφορά των ιχθυδίων, ώστε να απομακρυνθούν εγκαίρως όσα από αυτά παρουσίαζαν κάποιο εμφανές πρόβλημα υγείας.

Προκειμένου να επιτευχθεί η αναπαραγωγή χρησιμοποιήθηκαν ειδικά δοχεία (γεννήστρες). Τα συγκεκριμένα δοχεία διαθέτουν σχάρα, από την οποία διαφεύγουν τα αυγά στον πυθμένα της γεννήστρας (Εικόνα 7.6). Τα θηλυκά άτομα ερωτοτροπούν με τα αρσενικά επάνω από τη γεννήστρα, όπου τα μεν απελευθερώνουν τα αυγά τους ενώ τα δε τα γονιμοποιούν «ραντίζοντας» τα με σπέρμα. Η γονιμοποίηση λάμβανε χώρα το πρωί και το ερέθισμα για να ξεκινήσει ήταν το φως. Τα γονιμοποιημένα αυγά περνούν από τη σχάρα ώσπου τελικά φτάνουν στον πυθμένα του δοχείου όπου είναι απρόσιτα στους γεννήτορες. Μέσα σε 30 λεπτά από τη στιγμή που άναβαν τα φώτα, γινόταν η συλλογή των αυγών με σιφωνισμό για την έναρξη των ελέγχων τοξικότητας.

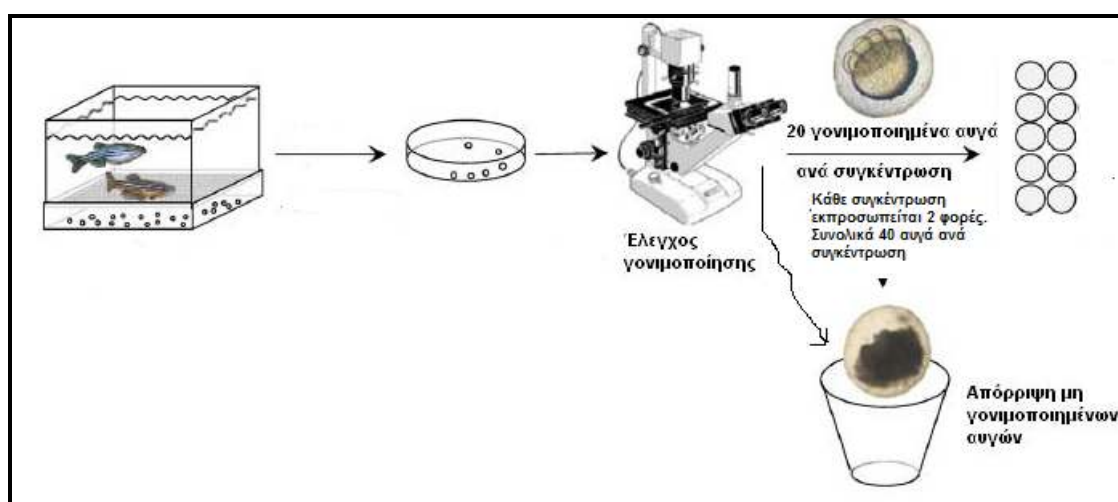


Εικόνα 7.6. Γεννήστρα που χρησιμοποιήθηκε στις αναπαραγωγές του *Danio rerio*

Figure 7.6 Container used for reproductions of *Danio rerio*

Τα αυγά ελέγχονταν με τη βοήθεια στερεοσκοπίου και επιλέγονταν τα γονιμοποιημένα. Γινόταν ξέπλυμα με απιονισμένο νερό προκειμένου να απομακρυνθούν τα υπολείμματα (Wiegand et al., 2000) και 200

αυγά περίπου μεταφέρονταν σε 10 δισκία petri. Τα δισκία Petri περιείχαν θρεπτικό διάλυμα σύμφωνα με την οδηγία ISO 7346-3 (294 mg $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$, 123 mg $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, 65 mg NaHCO_3 , 6 mg KCl και 1 l H_2O). Όσα αυγά εμφάνιζαν αλλοιώσεις ή ανωμαλίες, όπως ασυμμετρία δεν χρησιμοποιούνταν στο πείραμα, ενώ όσα εμφάνιζαν θολερότητα ήταν μη γονιμοποιημένα και επίσης απορρίπτονταν (Εικόνα 7.7).



Εικόνα 7.7. Σχηματική απεικόνιση της διαδικασίας, από τη στιγμή της γονιμοποίησης μέχρι το σημείο διαλογής των γονιμοποιημένων αυγών (από Lammer et al., 2009).

Figure 7.7. Description of the procedure, from the fertilization until the collection of the fertilized eggs (from Lammer et al., 2009).

7.2.5.4 Έκθεση εμβρύων και λαρβών του *Danio rerio* στο κυανοβακτηριακό εκχύλισμα

Τα αυγά τα οποία τοποθετήθηκαν στα δισκία Petri εκτέθηκαν σε διαφορετικές συγκεντρώσεις κυανοβακτηριακού εκχυλίσματος: 0.28mg κυανοβακτηριακής βιομάζας/l, 0.56 mg κυανοβακτηριακής βιομάζας/l, 2.8 mg κυανοβακτηριακής βιομάζας/l και 5.6 mg κυανοβακτηριακής βιομάζας/l. Κάθε συγκέντρωση κυανοβακτηριακού εκχυλίσματος αντιπροσωπεύονταν 2 φορές, προκειμένου να ενισχυθεί η αξιοπιστία του πειράματος. Η συγκέντρωση της μικροκυστίνης-LR που περιέχονταν στα παραπάνω εκχυλίσματα ήταν: 0.0325μg μικροκυστίνη-LR/l, 0.065μg μικροκυστίνη-LR/l, 0.325μg μικροκυστίνη-LR/l, 0.65 μg μικροκυστίνη-LR/l, αντίστοιχα. Η έκθεση των αυγών στο κυανοβακτηριακό εκχύλισμα

πραγματοποιήθηκε όταν το 90% των αυγών βρισκόταν στο στάδιο της αυλάκωσης. Ως μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν αυγά τα οποία τοποθετήθηκαν σε θρεπτικό διάλυμα χωρίς τοξίνες. Η έκθεση των αυγών στις διάφορες συγκεντρώσεις του κυανοβακτηριακού εκχυλίσματος διήρκησε 3 μέρες, οπότε και άρχισε η εκκόλαψη των λάρβων. Οι λάρβες εκτέθηκαν στο κυανοβακτηριακό εκχύλισμα για 3 μέρες και έπειτα τοποθετήθηκαν σε ενυδρεία με καθαρό νερό (χωρίς τοξίνες) όπου και παρακολουθούνταν η ανάπτυξη τους για δεκαπέντε μέρες. Από την πέμπτη ημέρα της γονιμοποίησης έως το τέλος του πειράματος, οι λάρβες τρέφονταν με *Artemia*.

Καθόλη τη διάρκεια του πειράματος, οι τιμές του οξυγόνου και του pH ελέγχονταν καθημερινά, ώστε να διασφαλίζονται οι κατάλληλες τιμές για τη βέλτιστη ανάπτυξη των ιχθύων (οξυγόνο ≥ 5.6 mg/L, pH 7-8). Τα αυγά και οι λάρβες φωτογραφίζονταν με τη χρήση ψηφιακής κάμερας, ενώ η ανάπτυξη τους παρακολουθούνταν με τη βοήθεια στερεοσκοπίου (LEICA ZM125). Σε τακτά χρονικά διαστήματα ελεγκτοαν το στάδιο ανάπτυξης, ο ρυθμός εκκόλαψης και οι πιθανές παραμορφώσεις των εμβρύων. Στο τέλος του πειράματος, προσδιορίστηκαν ο ρυθμός επιβίωσης, το ολικό μήκος και το βάρος των νεαρών ιχθυδίων, καθώς και οι πιθανές παραμορφώσεις του σώματος τους.

7.3 ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ

Όσον αφορά τη βιοδοκιμή με επίμυες, ο προσδιορισμός της τιμής LD₅₀, πραγματοποιήθηκε με τη χρήση της Probit Analysis (Finney, 1952). Η Probit Analysis είναι μια ευρέως χρησιμοποιούμενη ανάλυση στην τοξικολογία για την εξακρίβωση της τοξικότητας διαφόρων χημικών ουσιών στους ζωντανούς οργανισμούς. Στις τοξικολογικές δοκιμές πραγματοποιείται η έκθεση του οργανισμού σε διαφορετικές συγκεντρώσεις της υπό μελέτη χημικής ουσίας και συγκρίνεται το αποτέλεσμα της επίδρασης της κάθε συγκέντρωσης. Το αποτέλεσμα της επίδρασης είναι δυωνυμικό και συνήθως σχετίζεται με τη θνησιμότητα του οργανισμού (Finney, 1948). Η σχέση μεταξύ του αποτελέσματος της έκθεσης και της συγκέντρωσης της χημικής ουσίας είναι σιγμοειδής

(Finney, 1952). Η Probit Analysis μετατρέπει τη σιγμοειδή συσχέτιση σε γραμμική έτσι ώστε να είναι εφικτός ο υπολογισμός της ποσότητας της χημικής ουσίας που επιφέρει συγκεκριμένη δυσμενή επίδραση στον οργανισμό (Finney, 1952). Ο προσδιορισμός της τιμής LD₅₀, μέσω της Probit Analysis είναι εφικτός με την κατασκευή γραφικής παράστασης ή και από διάφορα στατιστικά προγράμματα.

Επίσης χρησιμοποιήθηκαν η Ανάλυση της Διακύμανσης (ANOVA), μετά από έλεγχο της κατανομής των δεδομένων και το Tukey's τεστ προκειμένου να ελεγχθεί εάν υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές των παραμέτρων που ελέγχθηκαν, ανάμεσα στους μάρτυρες και στους οργανισμούς στους οποίους χορηγήθηκε το κυανοβακτηριακό εκχύλισμα ($p < 0.05$). Η δοκιμή χ^2 (Chi square test) χρησιμοποιήθηκε για να ελεγχθούν εάν υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές σε παραμέτρους όπως ο ρυθμός εκκόλαψης, ο ρυθμός επιβίωσης, ο ρυθμός εμφάνισης παραμορφώσεων ανάμεσα στους μάρτυρες και στους οργανισμούς στους οποίους χορηγήθηκε το κυανοβακτηριακό εκχύλισμα ($p < 0.05$). Ο συντελεστής κατά Pearson (R Pearson) υπολογίστηκε για να ελεγχθεί η ύπαρξη συσχέτισης μεταξύ των συγκεντρώσεων των κυανοβακτηριακών εκχυλισμάτων και των διαφόρων παραμέτρων που ελέγχθηκαν. Όλα τα δεδομένα επεξεργάστηκαν με τη βοήθεια του στατιστικού πακέτου SPSS 17.0 for Windows.

7.4 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

7.4.1 Βιοδοκιμή σε επίμυες

Οι επίμυες, οι οποίοι εκτέθηκαν σε όλες τις συγκεντρώσεις του κυανοβακτηριακού εκχυλίσματος εμφάνισαν δυσκολίες στην κίνηση, σημάδια κοιλιακής σύσπασης, ωχρότητα και δυσκολία στην αναπνοή, αλλά δεν απεβίωσαν αμέσως (Πίνακας 7.2). Οι επίμυες που ενέθηκαν με κυανοβακτηριακό εκχύλισμα συγκέντρωσης 40, 60 και 80 mg κυανοβακτηριακής βιομάζας kg⁻¹ βάρους σώματος απεβίωσαν τρεις ώρες μετά τη χορήγηση. Δύο από τους πέντε επίμυες που τους χορηγήθηκε κυανοβακτηριακό εκχύλισμα συγκέντρωσης 30 mg κυανοβακτηριακής βιομάζας kg⁻¹ βάρους σώματος απεβίωσαν σε χρονικό διάστημα 14-24h

από τη στιγμή της χορήγησης. Οι επίμυες- μάρτυρες δεν εμφάνισαν συμπτώματα αδιαθεσίας και δεν απεβίωσαν στις 24h που διήρκησε η δοκιμή (Πίνακας 7.2). Στη μεταθανάτια εξέταση των επίμυων που χορηγήθηκαν με κυανοβακτηριακό εκχυλίσμα φάνηκε ότι το ήπαρ τους ήταν αιμορραγικό. Το βάρος του ήπατός τους ήταν το 8% τους συνολικού βάρους του σώματος τους, ενώ το αντίστοιχο βάρος των επίμυων – μαρτύρων κυμάνθηκε από 4 έως 6%.

Πίνακας 7.2. Συμπτώματα και χρόνος θανάτου των επίμυων που εκτέθηκαν στις διαφορετικές συγκεντρώσεις του κυανοβακτηριακού εκχυλίσματος.
Table 7.2. Symptoms and time of death of mice exposed to different concentrations of cyanobacterial bloom.

Συγκέντρωση κυανοβακτηριακού εκχυλίσματος	Συμπτώματα	Χρόνος θανάτου
0 (μάρτυρες)	Κανένα σύμπτωμα αδιαθεσίας	Κανένας από τους επίμυες που χρησιμοποιήθηκαν δεν απεβίωσε μέχρι τις 24h που διήρκησε η δοκιμή
30 mg κυανοβακτηριακής βιομάζας kg ⁻¹ βάρους σώματος	Δυσκολίες στην κίνηση, σημάδια κοιλιακής σύσπασης, ωχρότητα και δυσκολία στην αναπνοή	Δύο από τους πέντε επίμυες απεβίωσαν σε χρονικό διάστημα 14-24 h
40 mg κυανοβακτηριακής βιομάζας kg ⁻¹ βάρους σώματος	Δυσκολίες στην κίνηση, σημάδια κοιλιακής σύσπασης, ωχρότητα και δυσκολία στην αναπνοή	Και οι πέντε επίμυες απεβίωσαν σε χρονικό διάστημα 3 h
60 mg κυανοβακτηριακής βιομάζας kg ⁻¹ βάρους σώματος	Δυσκολίες στην κίνηση, σημάδια κοιλιακής σύσπασης, ωχρότητα και δυσκολία στην αναπνοή	Και οι πέντε επίμυες απεβίωσαν σε χρονικό διάστημα 3 h
80 mg κυανοβακτηριακής βιομάζας kg ⁻¹ βάρους σώματος	Δυσκολίες στην κίνηση, σημάδια κοιλιακής σύσπασης, ωχρότητα και δυσκολία στην αναπνοή	Και οι πέντε επίμυες απεβίωσαν σε χρονικό διάστημα 3 h

Από τον Πίνακα 7.3 φαίνεται ότι η επίδραση των συγκεντρώσεων του κυανοβακτηριακού εκχυλίσματος ήταν στατιστικά σημαντική (P<0.05).

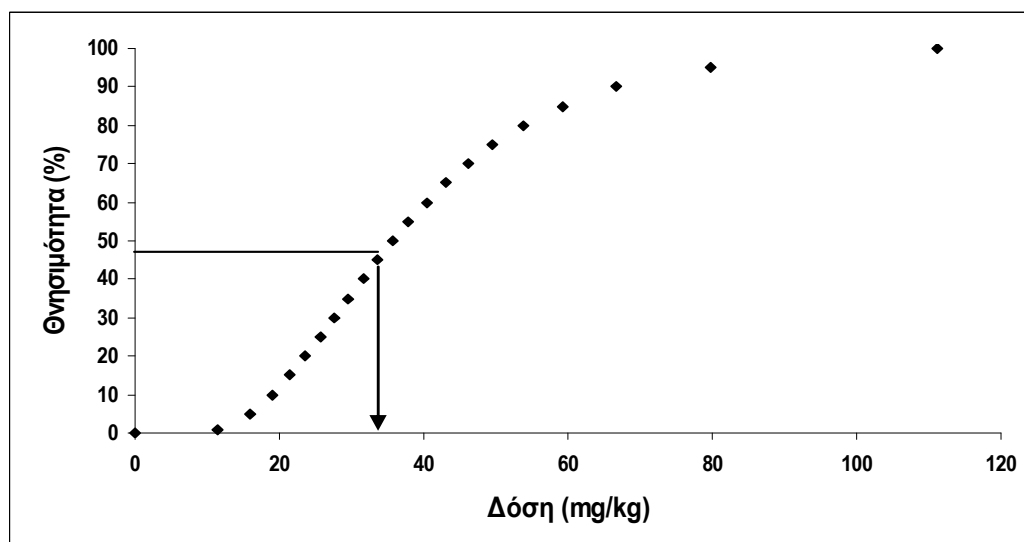
Πίνακας 7.3. Αποτελέσματα της Probit Analysis, όπου αποδεικνύεται ότι η επίδραση των συγκεντρώσεων του κυανοβακτηριακού εκχυλίσματος ήταν στατιστικά σημαντική ($P < 0.05$).

Table 7.3. Results of Probit Analysis which show that the effects of different cyanobacterial bloom concentrations were significant ($P < 0.05$)

Parameter	Estimate	Std Error	Z	Sig.
PROBIT	Conc	4.715	2.356	0.045
	Intercept	-7.321	3.860	0.048

Η τιμή LD_{50} του κυανοβακτηριακού εκχυλίσματος υπολογίστηκε με τη βοήθεια πινάκων του στατιστικού προγράμματος SPSS, που προέκυψαν από την Probit Analysis. Η τιμή LD_{50} ήταν ίση με 35.70 mg κυανοβακτηριακής βιομάζας kg^{-1} βάρους σώματος. Επίσης, η τιμή LD_{25} ήταν ίση με 25.68 mg κυανοβακτηριακής βιομάζας kg^{-1} βάρους σώματος και η τιμή $LD_{75} = 49.63$ mg κυανοβακτηριακής βιομάζας kg^{-1} βάρους σώματος.

Στην Εικόνα 7.8, παρουσιάζεται η σιγμοειδής καμπύλη που συσχετίζει τις συγκεντρώσεις του κυανοβακτηριακού εκχυλίσματος με το ποσοστό θνησιμότητας των επίμυων.



Εικόνα 7.8 Σιγμοειδής καμπύλη συσχέτισης των συγκεντρώσεων του κυανοβακτηριακού εκχυλίσματος με το ποσοστό θνησιμότητας των επίμυων(%).

Figure 7.8 S-curve regression of cyanobacterial bloom concentrations and mice mortality (%).

7.4.2 Βιοδοκιμή σε ιχθύες του είδους *Danio rerio*

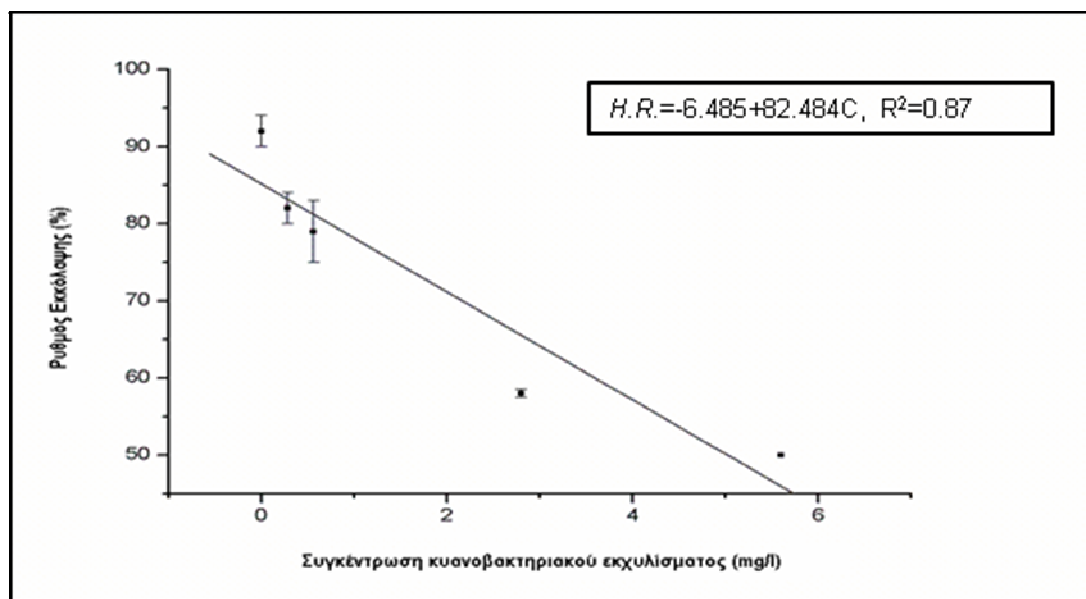
Το κυανοβακτηριακό εκκυσίωμα αποδείχθηκε ότι ήταν τοξικό στα έμβρυα και στις λάρβες του ιχθύος *Danio rerio*. Οι τοξικές επιδράσεις φάνηκε ότι σχετιζόνταν με την ανάπτυξη του ιχθύος. Η έκθεση των αυγών του ιχθύος στο κυανοβακτηριακό εκκυσίωμα αύξησε τη διάρκεια της εκκόλαψης σε όλες τις συγκεντρώσεις του εκκυσίματος. Η αύξηση αυτή είχε σημαντική συσχέτιση με τις συγκεντρώσεις του εκκυσίματος ($r=0.944$, $P<0.05$) (Πίνακας 7.4). Επίσης ο ρυθμός εκκόλαψης (%) (H.R.) μειώθηκε σε όλες τις συγκεντρώσεις του κυανοβακτηριακού εκκυσίματος (C), σε σχέση με το ρυθμό εκκόλαψης των ιχθύων-μαρτύρων (Πίνακας 7.4).

Πίνακας 7.4 Τοξική επίδραση των διαφορετικών συγκεντρώσεων του κυανοβακτηριακού εκκυσίματος της Λίμνης Παμβώτιδας στα έμβρυα του *Danio rerio*

Table 7.4. Effect of different extracts concentrations obtained from Lake Pamvotis cyanobacterial bloom on embryonic development of *Danio rerio*.

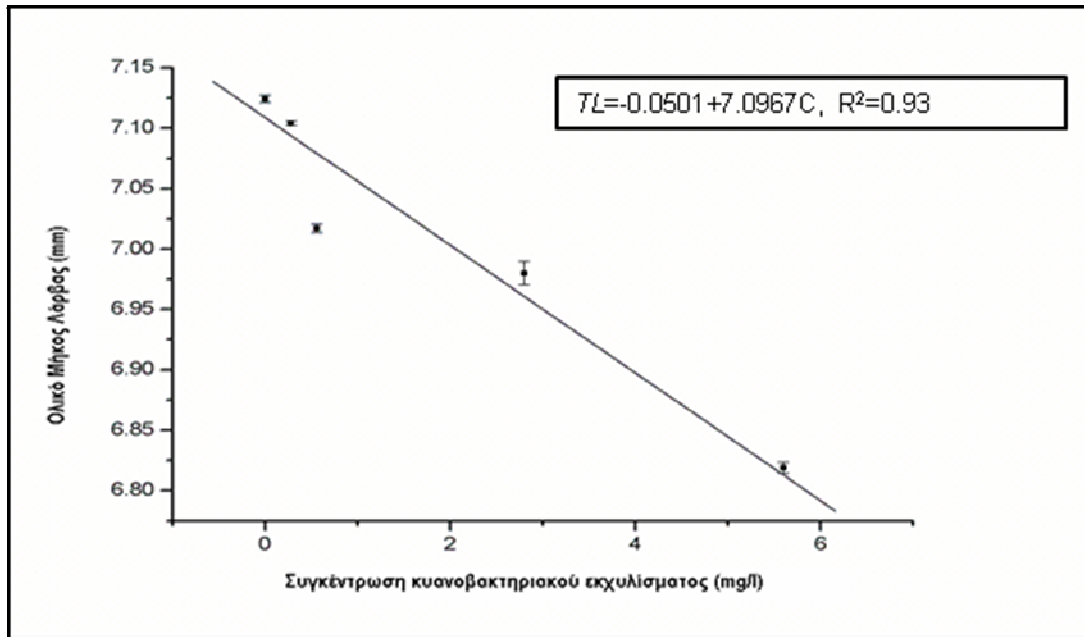
	0mg/l (Μάρτυρας)	0.28mg κυανοβακτηριακής βιομάζας/ l	0.56mg κυανοβακτηριακής βιομάζας/ l	2.8mg κυανοβακτηριακής βιομάζας/ l	5.6mg κυανοβακτηριακής βιομάζας/ l
Χρόνος έναρξης της εκκόλαψης(h)	73±0.2	74±0.25	75±0.31	76±0.22	77±1.21
Διάρκεια εκκόλαψης(h)	11±0.1	18±0.27	20±0.13	22±0.28	23±0.34
Ρυθμός εκκόλαψης(%)	90±2.82	80±2.82	75±5.65	57.5±0.7	50±1.49
Οι τιμές αναφέρονται στη μέση τιμή ±τυπικό σφάλμα					

Ο ρυθμός εκκόλαψης (%) μειωνόταν, ακολουθώντας την αύξηση της συγκέντρωσης του κυανοβακτηριακού εκκυσίματος ($r=-0.830$, $P<0.05$) και η απόκλιση ήταν γραμμική ($H.R.=-6.485+82.484C$, $R^2=0.87$), (Εικ.7.9).

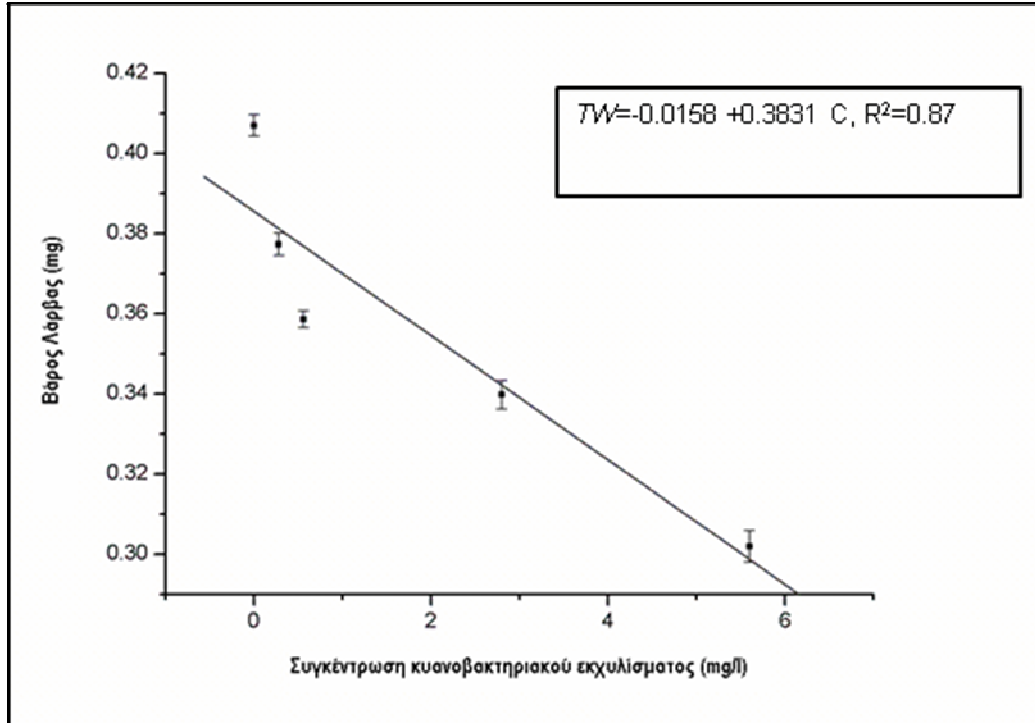


Εικόνα 7.9. Συσχέτιση ρυθμού εκκόλαψης (%) με τις συγκεντρώσεις του κυανοβακτηριακού εκχυλίσματος της Λίμνης Παμβώτιδας
Figure 7.9. Hatching rate (%) of *Danio rerio* eggs in relation to concentrations of cyanobacterial extract from Lake Pamvotis

Στο τέλος της δοκιμής (21 μέρες), οι λάρβες που εκτέθηκαν σε όλες τις συγκεντρώσεις του κυανοβακτηριακού εκχυλίσματος εμφάνισαν μειωμένο ολικό μήκος και βάρος σώματος. Η μείωση του μήκους και του βάρους των λαρβών ήταν στατιστικά σημαντική σε σχέση με το μήκος και το βάρος των λαρβών- μαρτύρων (για το μήκος: $F=48.32$, $P<0.001$ και για το βάρος: $F=32.75$, $P<0.001$). Το βάρος (TW) και το ολικό μήκος σώματος (TL) των λαρβών συσχετίζονταν αρνητικά με τις συγκεντρώσεις του κυανοβακτηριακού εκχυλίσματος ($r=-0.944$, $P<0.05$) και ($r=-0.911$, $P<0.05$), αντιστοίχως. Η απόκλιση μεταξύ του ολικού μήκους της λάρβας και των συγκεντρώσεων του κυανοβακτηριακού εκχυλίσματος ήταν γραμμική ($TL=-0.0501+7.0967C$, $R^2=0.93$)(Εικ. 7.10). Η απόκλιση μεταξύ του βάρους σώματος και των συγκεντρώσεων του κυανοβακτηριακού εκχυλίσματος ήταν γραμμική ($TW=-0.0158 +0.3831 C$, $R^2=0.87$) (Εικ. 7.11).

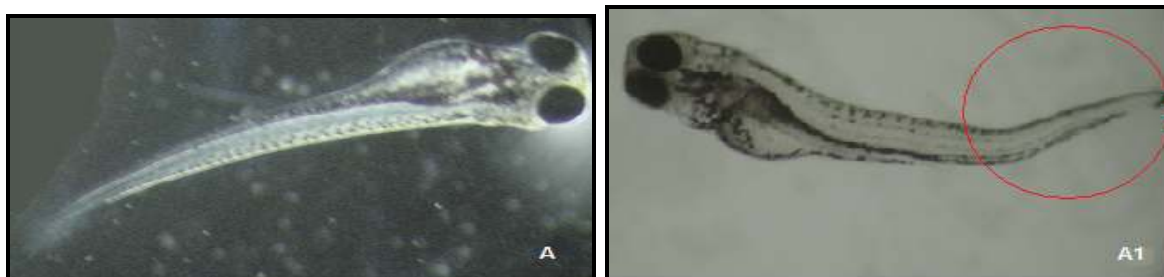


Εικόνα 7.10. Συσχέτιση ολικού μήκους λάρβας (mm) με τις συγκεντρώσεις του κυανοβακτηριακού εκχυλίσματος της Λίμνης Παμβώτιδας
Figure 7.10. Total length (mm) of *Danio rerio* larvae in relation to concentrations of cyanobacterial extract from Lake Pamvotis



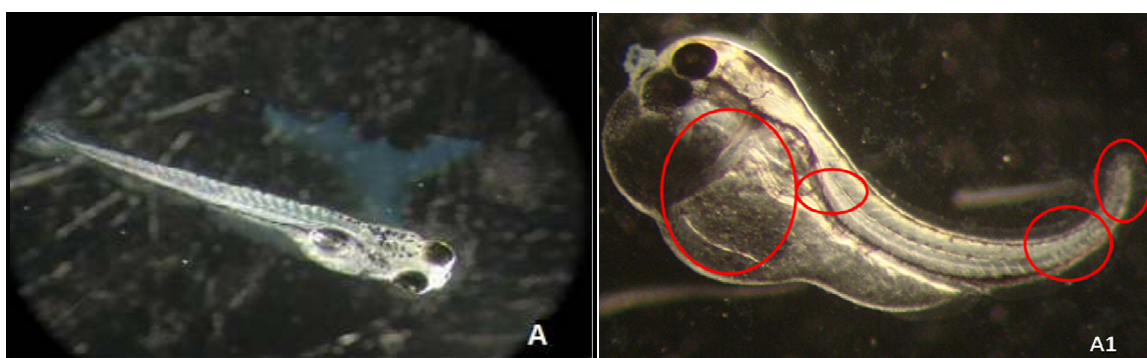
Εικόνα 7.11. Συσχέτιση βάρους λάρβας (mg) με τις συγκεντρώσεις του κυανοβακτηριακού εκχυλίσματος της Λίμνης Παμβώτιδας
Figure 7.11. Mass (mg) of *Danio rerio* larvae in relation to concentrations of cyanobacterial extract from Lake Pamvotis

Στις λάρβες που εκτέθηκαν στο κυανοβακτηριακό εκχύλισμα, παρατηρήθηκαν διάφορες παραμορφώσεις όπως: περικαρδιακό οίδημα, κάμψη του ουραίου πτερυγίου και του άξονα του σώματος, αδυναμία πλήρωσης της νυκτικής κύστης, παραμορφωμένη γνάθος, μικρότερο μέγεθος οφθαλμών, νέκρωση του ουραίου πτερυγίου (Εικ. 7.12, 7.13, 7.14, 7.15).



Εικόνα 7.12 A) Άτομο *Danio rerio* (μάρτυρας), 3 ημέρες μετά τη γονιμοποίηση. **A1)** Άτομο *Danio rerio* εκτεθειμένο σε κυανοβακτηριακό εκχύλισμα (Συγκέντρωση=2.8mg/l, 3 ημέρες μετά τη γονιμοποίηση), παρατηρούμενες παραμορφώσεις: κύρτωση του ουραίου πτερυγίου και του άξονα του σώματος

Figure 7.12 A) *Danio rerio* control, 3 days post fertilization. **A1)** *Danio rerio* exposed to cyanobacterial extract (C=2.8mg/l, 3dpf), malformations observed: bent tail and bent body axis.



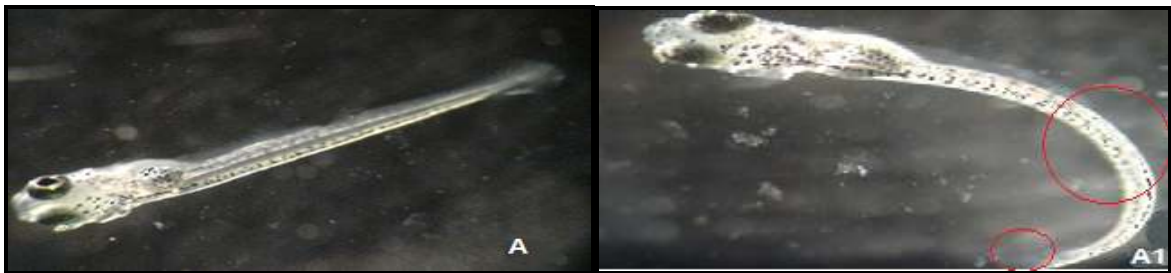
Εικόνα 7.13 A) Άτομο *Danio rerio* (μάρτυρας), 5 ημέρες μετά τη γονιμοποίηση. **A1)** Άτομο *Danio rerio* εκτεθειμένο σε κυανοβακτηριακό εκχύλισμα (Συγκέντρωση=5.6mg/l, 5 ημέρες μετά τη γονιμοποίηση), παρατηρούμενες παραμορφώσεις: περικαρδιακό οίδημα, αδυναμία πλήρωσης της νυκτικής κύστης, κύρτωση του άξονα του σώματος, νέκρωση του ουραίου πτερυγίου,

Figure 7.13 A) *Danio rerio* control, 5 days post fertilization. **A1)** *Danio rerio* exposed to cyanobacterial extract (C=5.6mg/l, 5dpf), malformations observed: pericardial sac edema, feebleness of filling the swim bladder, bent body axis.



Εικόνα 7.14 A) Άτομο *Danio rerio* (μάρτυρας), 10 ημέρες μετά τη γονιμοποίηση. **A1)** Άτομο *Danio rerio* εκτεθειμένο σε κυανοβακτηριακό εκχύλισμα (Συγκέντρωση=0.56 mg/l, 10 ημέρες μετά τη γονιμοποίηση), παρατηρούμενες παραμορφώσεις: περικαρδιακό οίδημα, αδυναμία πλήρωσης της νυκτικής κύστης, κύρτωση του άξονα του σώματος, νέκρωση του ουραίου πτερυγίου

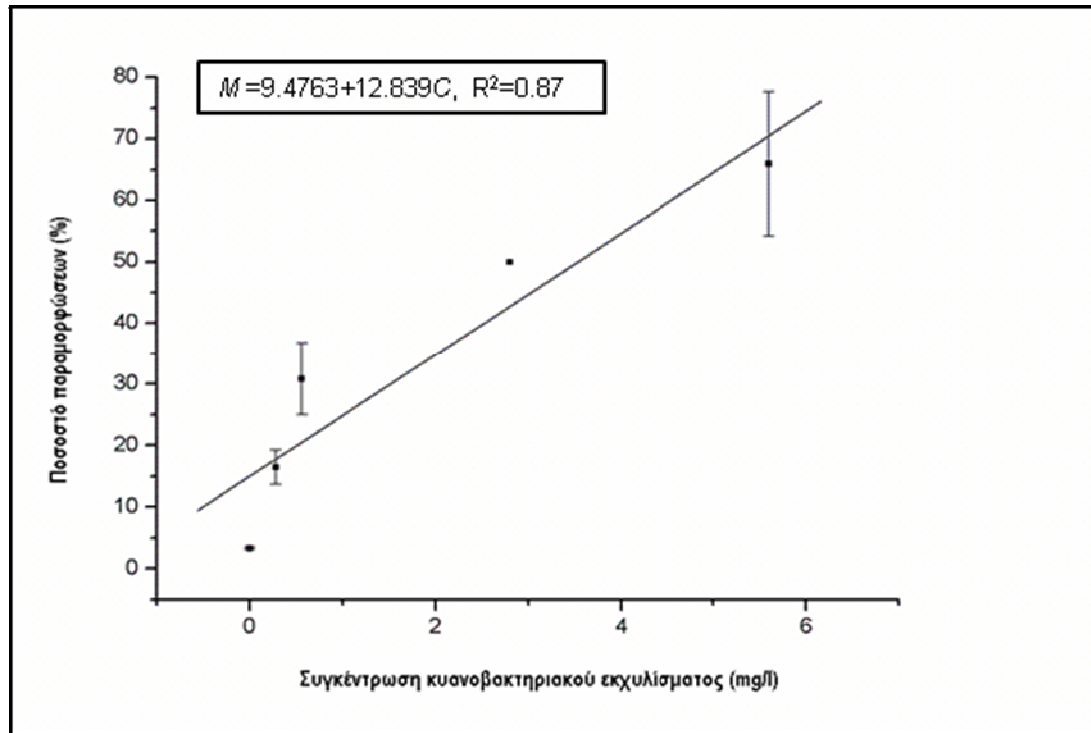
Figure 7.14 A) *Danio rerio* control, 10 days post fertilization. **A1)** *Danio rerio* exposed to cyanobacterial extract (C=0.56mg/l, 10 dpf), malformations observed: pericardial sac edema, feebleness of feeling the swim bladder, bent body axis, tail necrosis.



Εικόνα 7.15 A) Άτομο *Danio rerio* (μάρτυρας), 12 ημέρες μετά τη γονιμοποίηση. **A1)** Άτομο *Danio rerio* εκτεθειμένο σε κυανοβακτηριακό εκχύλισμα (Συγκέντρωση=0.28 mg/l, 12 ημέρες μετά τη γονιμοποίηση), παρατηρούμενες παραμορφώσεις: κύρτωση του άξονα του σώματος, νέκρωση του ουραίου πτερυγίου

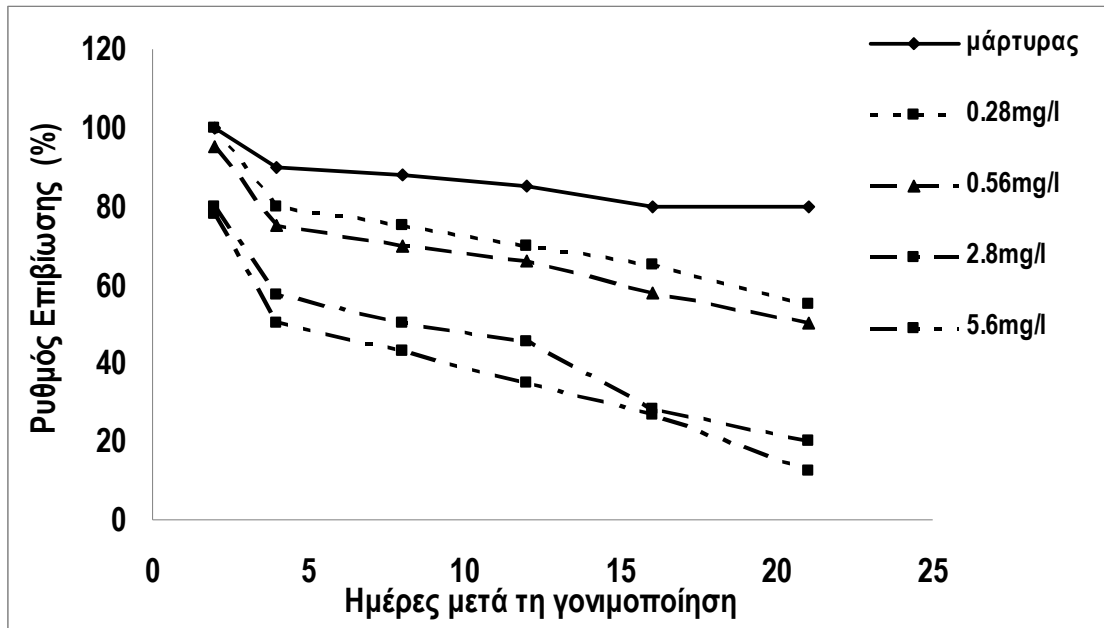
Figure 7.15 A) *Danio rerio* control, 12 days post fertilization. **A1)** *Danio rerio* exposed to cyanobacterial extract (C=0.28mg/l, 12 dpf), malformations observed: bent body axis, tail necrosis.

Το ποσοστό των παραμορφώσεων (%) (M) συσχετιζόταν με τις συγκεντρώσεις του κυανοβακτηριακού εκχυλίσματος ($r=0.815$, $P<0.05$). Επίσης η απόκλιση μεταξύ του ποσοστού εμφάνισης παραμορφώσεων και των συγκεντρώσεων του κυανοβακτηριακού εκχυλίσματος ήταν γραμμική ($M=9.4763+12.839C$, $R^2=0.87$)(Εικ.7.16).



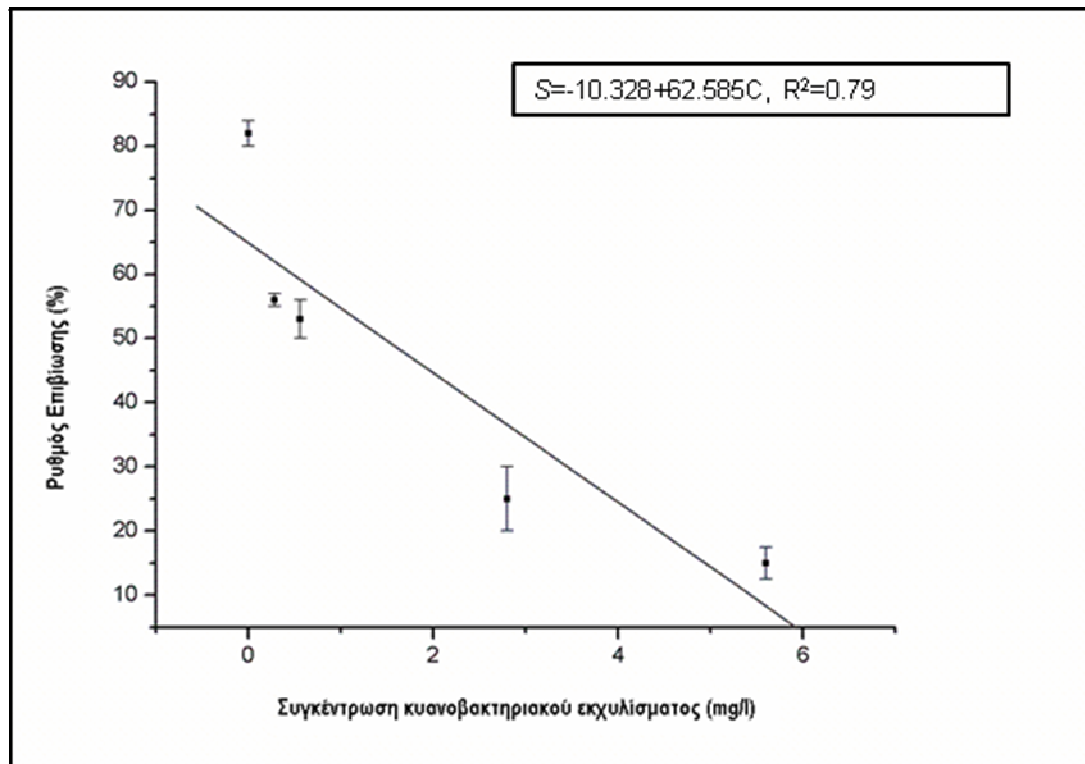
Εικόνα 7.16. Συσχέτιση ποσοστού παραμορφώσεων (%) των λαρβών με τις συγκεντρώσεις του κυανοβακτηριακού εκχυλίσματος της Λίμνης Παμβώτιδας
Figure 7.16. Malformation (%) of *Danio rerio* larvae in relation to Concentrations of cyanobacterial extract from Lake Pamvotis

Κατά τη διάρκεια της δοκιμής, οι λάρβες που εκτέθηκαν στο κυανοβακτηριακό εκχύλισμα εμφάνισαν μειωμένο ρυθμό επιβίωσης (S%), σε σχέση με τις λάρβες-μάρτυρες (Εικ.7.17). Ο ρυθμός επιβίωσης των λαρβών (S) συσχετιζόταν αρνητικά με τις συγκεντρώσεις του κυανοβακτηριακού εκχυλίσματος ($r=-0,980$, $P<0.05$). Η απόκλιση μεταξύ του ρυθμού επιβίωσης και των συγκεντρώσεων του κυανοβακτηριακού εκχυλίσματος ήταν γραμμική ($S=-10.328+62.585C$, $R^2=0.79$)(Εικ.7.18).



Εικόνα7.17. Επίδραση των διαφορετικών συγκεντρώσεων του κυανοακτηριακού εκχυλίσματος στο ρυθμό επιβίωσης των λαρβών του ιχθύος *Danio rerio* (2, 4, 8, 12, 16, 21 ημέρες μετά τη γονιμοποίηση)

Figure 7.17. Effect of natural bloom extract of different concentrations, on survival rate (%) of *Danio rerio* larvae, (2, 4, 8, 12, 16, 21 days post fertilization)



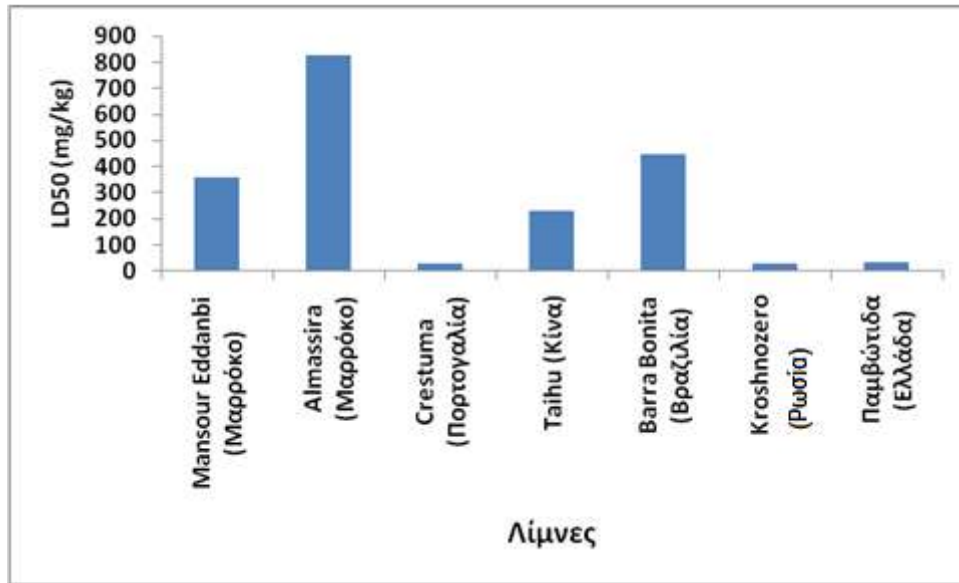
Εικόνα 7.18. Συσχέτιση ρυθμού επιβίωσης λαρβών με τις συγκεντρώσεις του κυανοβακτηριακού εκχυλίσματος της Λίμνης Παμβώτιδας
Figure 7.18. Survival rate (%) of *Danio rerio* larvae vs. Concentrations of cyanobacterial extract from Lake Pamvotis

7.5 ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Σε πολλές βιοδοκιμές, η έκθεση των οργανισμών πραγματοποιείται σε καθαρές κυανοτοξίνες και όχι σε κυανοβακτηριακά εκχυλίσματα (Oberemm et al., 1997). Τα αποτελέσματα όμως πολλών μελετών έχουν αποδείξει ότι η τοξική επίδραση των καθαρών κυανοτοξινών είναι πολύ μικρότερη της τοξικής επίδρασης των κυανοβακτηριακών εκχυλισμάτων (Best et al., 2001; Pietsch et al., 2001). Στην παρούσα μελέτη, παρατηρήθηκαν τοξικές επιδράσεις στους επίμυες και στους ιχθύες του είδους *Danio rerio*, που οφείλονται όχι μόνο στην παρουσία της μικροκυστίνης-LR, αλλά και στην παρουσία όλων των υπόλοιπων μεταβολιτών του κυανοβακτηριακού εκχυλίσματος. Επιπλέον, συστατικά του κυανοβακτηριακού εκχυλίσματος πιθανόν να αυξάνουν τον ρυθμό πρόσληψης των τοξινών (Best et al., 2001). Επίσης σύμφωνα με τους Oberemm et al., (1997), είναι πολύ πιθανόν να αναπτύσσονται

συνεργιστικές δράσεις άγνωστων κυανοβακτηριακών συστατικών με τις μικροκυστίνες, οι οποίες μπορούν να αυξήσουν την τοξικότητα του κυανοβακτηριακού εκχυλίσματος.

Σύμφωνα με την οδηγία των Lawton et al., (1994b), οι κυανοβακτηριακές αθροίσεις σε λίμνες που χαρακτηρίζονται από τιμές $LD_{50} < 100 \text{ mg kg}^{-1}$, κατατάσσονται στις πολύ τοξικές αθροίσεις. Οι κυανοβακτηριακές αθροίσεις της Λίμνης Παμβώτιδας, σύμφωνα λοιπόν με την παραπάνω οδηγία, κατατάσσονται στις πολύ τοξικές αθροίσεις (35.70 mg kg^{-1}). Συγκριτικά με παλαιότερες μελέτες, σχετικές με τη κυανοβακτηριακή τοξικότητα των ελληνικών λιμνών (Lanaras et al., 1989), φαίνεται ότι οι κυανοβακτηριακές αθροίσεις της Λίμνης Παμβώτιδας είναι πιο τοξικές από τις κυανοβακτηριακές αθροίσεις των Λιμνών: Βόλβη ($LD_{50}=1500 \text{ mg kg}^{-1}$), Κορώνεια ($LD_{50}=600 \text{ mg kg}^{-1}$) και Βιστωνίδα ($LD_{50}=1130 \text{ mg kg}^{-1}$). Οι κυανοβακτηριακές αθροίσεις της Λίμνης Καστοριάς εμφανίζουν τον ίδιο βαθμό τοξικότητας ($LD_{50}=40 \text{ mg kg}^{-1}$) με τις κυανοβακτηριακές αθροίσεις της Λίμνης Παμβώτιδας. Επιπλέον, από την Εικόνα 7.19, φαίνεται ότι οι κυανοβακτηριακές αθροίσεις της Λίμνης Παμβώτιδας, είναι πιο τοξικές από τις κυανοβακτηριακές αθροίσεις διαφόρων λιμνών, όπως οι Λίμνες Mansour Eddanbi και Almassira του Μαρόκο, η Λίμνη Taihu της Κίνας και η Λίμνη Barra Bonita της Βραζιλίας (Douma et al., 2010; Sotero-Santos et al., 2006). Οι Λίμνες Crestuma της Πορτογαλίας και Kroshnozzero της Ρωσίας χαρακτηρίζονται από τον ίδιο βαθμό κυανοβακτηριακής τοξικότητας με τη Λίμνη Παμβώτιδα (Vasconelos et al., 1993; Gromov et al., 1996).



Εικόνα 7.19. Τοξικότητα κυανοβακτηριακών αθροίσεων (όπως αυτή εκφράζεται από την τιμή LD50) σε διάφορες λίμνες, συμπεριλαμβανομένης και της Λίμνης Παμβώτιδας (Douma et al., 2010; Vasconelos et al., 1993; Chen et al., 2003; Sotero-Santos et al., 2006; Gromov et al., 1996).

Figure 7.19. Cyanobacterial toxicity (as it is expressed by LD50 value) in different Lakes of the world (Douma et al., 2010; Vasconelos et al., 1993; Chen et al., 2003; Sotero-Santos et al., 2006; Gromov et al., 1996).

Οι βιοδοκιμές με επίμυες είναι πολύ σημαντικό εργαλείο στην εκτίμηση του βαθμού τοξικότητας των κυανοβακτηρίων, αλλά επίσης και στην εκτίμηση του είδους της κυανοβακτηριακής τοξικότητας (Pan et al., 2008). Η αύξηση του βάρους του ήπατος, το αιμορραγικό ήπαρ και το χρονικό διάστημα επιβίωσης των επίμυων που εκτέθηκαν στο κυανοβακτηριακό εκχύλισμα της Λίμνης Παμβώτιδας, οδηγούν στην εκτίμηση της πιθανής ηπατοτοξικότητας της κυανοβακτηριακής άθροισης της λίμνης. Στον Πίνακα 7.3 παρουσιάζεται το ποσοστό και το είδος της τοξικότητας των κυανοβακτηριακών αθροίσεων διαφόρων χωρών.

Πίνακας 7.3 Ποσοστό και είδος της τοξικότητας των κυανοβακτηριακών αθροίσεων διαφόρων χωρών

Table 7.3. Frequencies of mass occurrences of toxic cyanobacteria in freshwaters of different countries

Χώρα	% Ποσοστό τοξικών δειγμάτων	Είδος τοξικότητας	Βιβλιογραφικές αναφορές
Αυστραλία	42	Ηπατοτοξικότητα	Baker and Humpage, 1994
Βραζιλία	75	Ηπατοτοξικότητα	Costa and Azevedo, 1994
Καναδάς	66	Ηπατοτοξικότητα	Gorham, 1962
Κίνα	73	Ηπατοτοξικότητα	Carmichael <i>et al.</i> , 1988
Τσεχία	82	Ηπατοτοξικότητα	Maršálek <i>et al.</i> , 2001
Δανία	82	Ηπατοτοξικότητα	Henriksen, 1996
Γερμανία	22	Νευροτοξικότητα	Bumke-Vogt, 1998
Φιλανδία	44	Ηπατοτοξικότητα, Νευροτοξικότητα	Sivonen, 1990
Γαλλία	73	Ηπατοτοξικότητα	Vezie <i>et al.</i> , 1997
Ουγγαρία	66	Ηπατοτοξικότητα	Törökne, 1991
Ιαπωνία	39	Ηπατοτοξικότητα	Watanabe and Oishi, 1980
Ολλανδία	90	Ηπατοτοξικότητα, Νευροτοξικότητα	Leeuwangh <i>et al.</i> , 1983
Νορβηγία	92	Ηπατοτοξικότητα	Skulberg <i>et al.</i> , 1994
Πορτογαλία	60	Ηπατοτοξικότητα	Vasconcelos, 1994
Σουηδία	47	Ηπατοτοξικότητα, Νευροτοξικότητα	Willén and Mattsson, 1997
Αγγλία	48	Ηπατοτοξικότητα	Codd and Bell, 1996
Αμερική	53	Ηπατοτοξικότητα, Νευροτοξικότητα	Olson, 1960

Συμπτώματα ηπατοτοξικότητας έχουν παρατηρηθεί σε πολλά άγρια και κατοικίδια ζώα που ήρθαν σε επαφή με κυανοβακτηριακές αθροίσεις λιμνών (Chorus, 2001; Carmichael, 2001; Mohamed *et al.*, 2003). Το πρώτο περιστατικό τοξίκωσης σε κατοικίδια ζώα καταγράφηκε το 1878 στην Αυστραλία (Francis, 1878). Μετά από αυτό το περιστατικό, καταγράφηκαν πολλά επεισόδια με σκύλους, πρόβατα και βοοειδή στην Αυστραλία, την Αμερική, τη Νότια Αφρική και την Ευρώπη. Επίσης υπάρχουν και αρκετές αναφορές για μη εκτρεφόμενα άγρια ζώα όπως ο λευκός ρινόκερος, τα άγρια πουλιά, τα κουνάβια και τα μινκ (Soll & Williams, 1985; Carmichael & Falconer, 1993; Bell & Codd, 1996; Chorus & Bartram, 1999; Saker *et al.*, 1999; Carmichael, 2001; Pitois *et al.*, 2001; Briand *et al.*, 2003; Codd *et al.*, 2003; Krienitz *et al.*, 2003; van Apeldoorn *et al.*, 2007). Στη Λίμνη Κορώνεια, τα έτη 1995 και 2004, η κυριαρχία των τοξικών κυανοβακτηρίων έναντι των άλλων φυτοπλαγκτονικών οργανισμών είχε ως συνέπεια τον μαζικό θάνατο

ιχθύων και πτηνών (Gkelis et al., 2004). Η υψηλή ηπατοτοξικότητα των κυανοβακτηριακών αθροίσεων της Λίμνης Παμβώτιδας αυξάνει τις υποψίες τοξίκωσης των εκτρεφόμενων ζώων που βόσκουν στο νερό της λίμνης κατά τη διάρκεια της άνθησης των κυανοβακτηρίων.

Στα υδάτινα οικοσυστήματα είναι δυνατόν κάποια είδη τοξικών κυανοβακτηρίων να συσσωρεύονται στην επιφάνεια του νερού, με τη μορφή λεπτού στρώματος (Oliver & Ganf, 2000). Αυτό το φαινόμενο παρατηρείται κυρίως στις ρηχές παρόχθιες περιοχές, οι οποίες αποτελούν το κύριο περιβάλλον των νεαρών υδρόβιων σπονδυλωτών οργανισμών (Oliver & Ganf, 2000). Η συσσώρευση των τοξικών κυανοβακτηρίων σε αυτές τις περιοχές είναι δυνατόν να οδηγήσει σε τοξικές επιδράσεις ή ακόμα και στο θάνατο των αναπτυσσόμενων υδρόβιων οργανισμών (Sivonen & Jones, 1999; Chorus, 2001).

Οι τοξικοί μεταβολίτες του κυανοβακτηριακού εκχυλίσματος της Λίμνης Παμβώτιδας φάνηκε ότι μεταφέρθηκαν στα έμβρυα του ιχθύος *Danio rerio*, καθώς οι τοξικές επιδράσεις αυτών ήταν εμφανείς στους ιχθύες. Η τοξικότητα των μικροκυστινών στα έμβρυα εξαρτάται από τη διάρκεια της έκθεσης, τη δόση και το αναπτυξιακό στάδιο της έκθεσης (Jacquet et al., 2004; Lecoz et al., 2008; Liu et al., 2002, Oberemm et al., 1999; Oberemm & Becker, 1997; Wang et al., 2005).

Οι τοξικές επιδράσεις του κυανοβακτηριακού εκχυλίσματος της Λίμνης Παμβώτιδας στα έμβρυα του *Danio rerio* είναι σε συμφωνία με τα αποτελέσματα πολλών μελετών που επιβεβαιώνουν το μειωμένο ρυθμό εκκόλαψης και την καθυστέρηση της εκκόλαψης των λαρβών πολλών ειδών ιχθύων (Jacquet et al., 2004; Keil et al., 2002; Liu et al., 2002; Oberemm et al., 1999; Ojaveer et al., 2003). Επιπλέον, κατά τη λαρβική ανάπτυξη, η έκθεση στο κυανοβακτηριακό εκχύλισμα της Λίμνης Παμβώτιδας είχε ως αποτέλεσμα μειωμένη ανάπτυξη των λαρβών. Οι Bury et al., (1997), απέδειξαν ότι όταν η πέστροφα εκτέθηκε στο κυτταρικό περιεχόμενο του κυανοβακτηρίου *M. aeruginosa* εμφάνισε αντιδράσεις καταπόνησης. Αυτές οι αντιδράσεις θα μπορούσαν να αποσπάσουν μεγάλο ποσό ενέργειας από αυτό που χρησιμοποιείται για

την ανάπτυξη των ιχθύων και να οδηγήσουν σε μειωμένη ανάπτυξη (Malbrouck & Kestemont, 2006).

Το ποσοστό εμφάνισης παραμορφώσεων των λαρβών, που παρατηρήθηκε στην παρούσα μελέτη, είναι το υψηλότερο που έχει καταγραφεί στη βιβλιογραφία. Πολλές μελέτες έχουν αποδείξει τη συμβολή των μικροκυστινών στην ανάπτυξη παραμορφώσεων στους ιχθύες (Huynh-Delerme et al., 2005; Jacquet et al., 2004; Keil et al., 2002; Liu et al., 2002; Oberemm & Becker, 1997; Oberemm et al., 1999; Ojaveer et al., 2003; Palíkova et al., 2003; Wang et al., 2005). Τα αποτελέσματα της παρούσας υποστηρίζουν την πιθανή συμβολή των μικροκυστινών στην εμφάνιση τερατογενέσεων. Οι παραμορφώσεις των λαρβών πιθανώς να οφείλονται στη διατάραξη της οργανογένεσης από τους μεταβολίτες του κυανοβακτηριακού εκχυλίσματος (Ernst, 2008). Η διατάραξη της οργανογένεσης, οφείλεται στην παρεμβολή των τοξικών μεταβολιτών στην κατανομή των πρωτεϊνών β-κατενίνη (β -catenin) και καντχερίνη (cadherin) οι οποίες σχετίζονται με τη συνεκτικότητα του βλαστιδίου (Wang et al., 2005).

Οι παραπάνω παραμορφώσεις πιθανώς συμμετέχουν στη διαμόρφωση του μικρού ρυθμού επιβίωσης των λαρβών που εκτέθηκαν στο κυανοβακτηριακό εκχύλισμα της Λίμνης Παμβώτιδας. Σύμφωνα με τη διεθνή βιβλιογραφία, η μικρότερη συγκέντρωση μικροκυστινών που προκάλεσε δυσμενές αποτέλεσμα στο ρυθμό επιβίωσης των λαρβών ιχθύων είναι ίση με 5 μ g ισοδυνάμων μικροκυστινής-LR/1 (Oberemm & Becker, 1997). Στην παρούσα μελέτη, ο χαμηλότερος ρυθμός επιβίωσης των λαρβών του *Danio rerio* προκλήθηκε μετά από την έκθεση των εμβρύων σε συγκέντρωση κυανοβακτηριακού εκχυλίσματος ίση με 5.6mg/l. Στην παραπάνω συγκέντρωση, περιέχονταν 0.65 μ g μικροκυστινής-LR/1. Αυτό το γεγονός, εντείνει τις ανησυχίες για την πιθανή επίδραση των τοξικών κυανοβακτηρίων της Λίμνης Παμβώτιδας στην επιβίωση των ιχθύων της λίμνης.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8

Διερεύνηση της πιθανής απειλής της δημόσιας υγείας από την παρουσία των μικροκυστινών στα ελληνικά εσωτερικά υδάτινα οικοσυστήματα



8.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ-ΣΚΟΠΟΣ

Ο ανθρώπινος πληθυσμός εκτίθεται καθημερινώς σε πολλές χημικές ενώσεις που άλλοτε μπορεί να είναι ωφέλιμες ή τοξικές. Πολλές από αυτές τις τοξικές ενώσεις έχουν ανθρωπογενή προέλευση, ενώ άλλες έχουν φυσική προέλευση. Οι μικροκυστίνες, παρόλο που έχουν φυσική προέλευση, η παρουσία και η αφθονία τους στα υδάτινα οικοσυστήματα εξαρτώνται σε μεγάλο βαθμό από την ανθρώπινη δραστηριότητα (Chorus, 2001). Η έκταση της απειλής της δημόσιας υγείας από τις κυανοτοξίνες εξαρτάται από την οδό και τη διάρκεια της έκθεσης των ανθρώπων στις παραπάνω τοξίνες (Falconer, 2005). Για τον παραπάνω λόγο, είναι πολύ σημαντική η συχνή παρακολούθηση της συγκέντρωσης των μικροκυστινών ενός υδάτινου οικοσυστήματος, καθώς και η προειδοποίηση του κοινού σχετικά με τους κινδύνους που εγκυμονεί η παρουσία των παραπάνω τοξινών (Εικόνα 8.1).



Εικόνα 8.1. Προειδοποιητικές πινακίδες σε διάφορες λίμνες του κόσμου που χαρακτηρίζονται από την παρουσία τοξικών κυανοβακτηρίων (few.wordpress.com).
Figure 8.1. Warning signs for toxic cyanobacteria in lakes around the world (few.wordpress.com).

Η έκθεση του ανθρώπινου πληθυσμού στις μικροκυστίνες μπορεί να πραγματοποιηθεί κυρίως μέσω της κατανάλωσης επιβαρυμένου νερού και τροφίμων, και μέσω της επαφής με επιβαρυμένο νερό κατά τη διάρκεια των ψυχαγωγικών δραστηριοτήτων (Dietrich & Hoeger, 2005). Πολλά από τα εσωτερικά ύδατα της Ελλάδος χαρακτηρίζονται από την παρουσία των μικροκυστινών, όπως αποδείχθηκε στο κεφάλαιο 4. Επίσης στα περισσότερα, αν όχι στο σύνολό τους παρατηρούνται διάφορες ψυχαγωγικές και αλλιευτικές δραστηριότητες (Kagalou & Leonardos 2009). Εντούτοις, οι πληροφορίες σχετικά με τους κινδύνους που εγκυμονεί ο ανθρώπινος πληθυσμός από την έκθεση στις παραπάνω τοξίνες είναι ελλειπείς.

Σκοπός της παρούσας ενότητας είναι η διερεύνηση της πιθανής απειλής της δημόσιας υγείας από την παρουσία των μικροκυστινών σε δεκατρία υδάτινα οικοσυστήματα της Ελλάδος (Λίμνη Τριχωνίδα, Λίμνη Λυσιμαχία, Λίμνη Παμβώτιδα, Λίμνη Μικρή Πρέσπα, Λίμνη Βεγορίτιδα, Λίμνη Καστοριά, Λίμνη Ζάζαρη, Λίμνη Πετρών, Λίμνη Χειμαδίτιδα, Λίμνη Κορώνεια, Λίμνη Βόλβη, Λίμνη Δοϊράνη, τεχνητός ταμιευτήρας νερού Κερκίνης). Ο παραπάνω έλεγχος πραγματοποιήθηκε έχοντας ως κατευθυντήριες γραμμές την οδηγία του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας (W.H.O,1998, 2003) που σχετίζεται 1) με την καταλληλότητα πόσιμου νερού που χαρακτηρίζεται από την παρουσία μικροκυστινών 2) με την καταλληλότητα υδάτων αναψυχής που χαρακτηρίζονται από την παρουσία μικροκυστινών.

1) Οδηγία Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας για την κατανάλωση πόσιμου νερού και υδρόβιων οργανισμών

Ένας από τους πρωταρχικούς σκοπούς του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας είναι η εξασφάλιση ασφαλούς πόσιμου νερού για όλους τους ανθρώπους, σε κάθε γωνιά της γης (W.H.O.,1998). Τα συνεχώς αυξανόμενα προβλήματα υγείας που σχετίζονται με την

παρουσία των μικροκυστινών στα υδάτινα συστήματα οδήγησαν στη θέσπιση ορίων ασφαλείας για τοξικές ουσίες στην τροφή ή και το πόσιμο νερό (Fawell et al., 1999a,b). Μελέτες με πειραματόζωα, οδήγησαν στον καθορισμό της «υψηλότερης συγκέντρωσης της ουσίας στην οποία δεν παρατηρούνται συμπτώματα» (NOAEL - No Observed Adverse Effect Levels) και της «χαμηλότερης συγκέντρωσης της ουσίας στην οποία παρατηρούνται συμπτώματα» (LOAEL - Lowest Observed Adverse Effect Level) (Kuiper-Goodman et al., 1999). Η τιμή NOAEL όπως υπολογίστηκε από τα πειράματα με επίμυες και χοίρους, ήταν ίση με 40 μg μικροκυστίνης- LR /(kg d) και 100 $\mu\text{g}/(\text{kg d})$, αντιστοίχως. Ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας λαμβάνοντας υπόψη τις παραπάνω τιμές αλλά συνυπολογίζοντας και τους παράγοντες αβεβαιότητας που υπεισέρχονται στον υπολογισμό των παραπάνω τιμών, θέσπισε τη συγκέντρωση των μικροκυστινών (δόση) η οποία θεωρείται ότι δεν έχει επιδράσεις στην ανθρώπινη υγεία, όταν καταναλώνεται καθημερινά καθ' όλη τη διάρκεια ζωής του ατόμου. Η δόση αυτή ονομάζεται Ανεκτή Ημερήσια Πρόσληψη (TDI - Tolerable Daily Intake) (Kuiper- Goodman et al., 1999). Η τιμή TDI για τις μικροκυστίνες ανέρχεται σε 0.04 $\mu\text{g kg}^{-1}\text{day}^{-1}$. Από αυτή την τιμή προέκυψε και ο «Κατευθυντήριο Ουδός» του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας για το πόσιμο νερό στο 1 μg (ενδοκυττάρων και εξωκυττάρων μικροκυστινών) l^{-1} νερού (Falconer et al., 1999, Kuiper-Goodman et al., 1999)(Πίνακας 8.1).

Πίνακας 8.1. Επίπεδα επικινδυνότητας των μικροκυστινών σύμφωνα με την οδηγία του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας.

Table 8.1. World Health Organization (W.H.O.) guidelines and risk levels for microcystin.

	Συγκέντρωση Μικροκυστινών
Ανεκτή καθημερινή πρόσληψη μέσω τροφής	0.04 $\mu\text{g Kg}^{-1} \text{ day}^{-1}$
Νερά που χρησιμοποιούνται για δραστηριότητες αναψυχής	
<i>Χαμηλός κίνδυνος</i>	2-10 $\mu\text{g l}^{-1}$
<i>Μεσαίος κίνδυνος</i>	10-40 $\mu\text{g l}^{-1}$
<i>Υψηλός κίνδυνος</i>	$\geq 40 \mu\text{g l}^{-1}$
Πόσιμο νερό	1 $\mu\text{g l}^{-1}$

Για τον υπολογισμό της τιμής TDI που σχετίζεται με την κατανάλωση υδρόβιων οργανισμών επιβαρυσμένων με μικροκυστίνες, από τα 13 υδάτινα οικοσυστήματα της Ελλάδος εφαρμόστηκε η παρακάτω εξίσωση:

$$\text{TDI} = \left[\text{Συγκέντρωση μικροκυστινών στη σάρκα } (\mu\text{g MC-LReq} / \text{g}) * \text{βάρος μερίδας(g)} \right] / \text{βάρος καταναλωτή (kg)}$$

- Το βάρος της μερίδας που καταναλώνεται διαφέρει ανάλογα με το είδος του υδρόβιου οργανισμού. Για τους ιχθύες (*Rutilus rana*, *Carassius gibelio*, *Cyprinus carpio*) το βάρος της μερίδας υπολογίστηκε ίσο με 300 g. Για το αμφίβιο (*Rana epirotica*) και το βαδιστικό δεκάποδο (*Astacus astacus*) το βάρος της μερίδας υπολογίστηκε ίσο με 50g.
- Το βάρος του καταναλωτή θεωρήθηκε ίσο με το βάρος ενός ενήλικα (60 kg).

2) Οδηγία Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας για την επαφή με επιβαρυμένο νερό κατά τη διάρκεια δραστηριοτήτων αναψυχής

Σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας, θεσπίστηκαν 3 επίπεδα επικινδυνότητας για τις ψυχαγωγικές δραστηριότητες: το χαμηλό επίπεδο, που χαρακτηρίζεται από ένα εύρος τιμών ενδοκυττάρων μικροκυστινών ίσο με 2-10 μg MC-LR/1, το μεσαίο επίπεδο που χαρακτηρίζεται από ένα εύρος τιμών ενδοκυττάρων μικροκυστινών ίσο με 10-40 μg MC-LR/1 και το υψηλό επίπεδο που χαρακτηρίζεται από ένα εύρος τιμών ενδοκυττάρων μικροκυστινών ≥ 40 μg MC-LR /1 (W.H.O., 2003) (Πίνακας 8.1).

Οι συγκεντρώσεις των μικροκυστινών στα δείγματα του νερού και στα δείγματα της σάρκας των υδρόβιων οργανισμών από τα 13 υδάτινα οικοσυστήματα της Ελλάδος, παρουσιάστηκαν και ερμηνεύθηκαν στα Κεφάλαια 4 και 6. Στους πίνακες 8.2, 8.3, 8.4 και 8.5 γίνεται αναφορά των παραπάνω τιμών.

Πίνακας 8.2. Συγκεντρώσεις ενδοκυττάρων και συνολικών μικροκυστινών στα υδάτινα οικοσυστήματα μελέτης το έτος 2005 (Κεφάλαιο 4).

Table 8.2. Cell-bound and Total microcystin concentration in Greek lakes examined in 2005 (Chapter 4).

Υδάτινο οικοσύστημα	Συγκέντρωση ενδοκυττάρων μικροκυστινών(μg MC-LR eq /l)	Συγκέντρωση συνολικών μικροκυστινών(μg MC-LR eq /l)
Χειμαδίτιδα	1.234	1.708
Δοϊράνη	3.305	5.181
Καστοριά	15.842	19.286
Κερκίνη	1.086	1.825
Κορώνεια	15.896	19.644
Λυσιμαχία	1.235	1.889
Μικρή Πρέσπα	3.176	3.863
Παμβώτιδα	11.286	13.077
Πετρών	2.444	3.457
Τρικωνίδα	1.226	1.460
Βεγορίτιδα	1.346	1.869
Βόλβη	1.086	1.295
Ζάζαρη	3.654	4.899

Πίνακας 8.3. Συγκεντρώσεις ενδοκυττάρων και συνολικών μικροκυστινών στη Λίμνη Παμβώτιδα το έτος 2008 (Κεφάλαιο 3).

Table 8.3. Cell-bound and Total microcystin concentration in examined in Lake Pamvotis during 2008 (Chapter 3).

Μήνες	Συγκέντρωση ενδοκυττάρων μικροκυστινών (µg MC-LR eq /l)	Συγκέντρωση συνολικών μικροκυστινών (µg MC-LR eq /l)
Φεβρουάριος 2008	0.625	1.161
Μάρτιος	0.681	1.660
Απρίλιος	3.286	1.890
Μάϊος	3.937	2.634
Ιούνιος	6.205	3.451
Ιούλιος	8.907	6.565
Αύγουστος	10.171	8.219
Σεπτέμβριος	13.119	14.826
Οκτώβριος	10.365	5.765
Νοέμβριος	7.114	1.902
Δεκέμβριος	1.243	1.315
Ιανουάριος 2009	0.706	1.192

Πίνακας 8.4. Συγκεντρώσεις μικροκυστινών στη σάρκα του ιχθύος *Carassius gibelio* από τα υδάτινα οικοσυστήματα μελέτης, το έτος 2005 (Κεφάλαιο 4)

Table 8.4. Microcystin concentration in muscle of *Carassius gibelio* from the examined lakes in 2005 (Chapter 4)

Υδάτινο οικοσύστημα	Συγκέντρωση μικροκυστινών στη σάρκα του ιχθύος <i>Carassius gibelio</i> (ng MC-LR eq /g)
Χειμαδίτιδα	2.76
Δοϊράνη	6.27
Καστοριά	19.31
Κερκίνη	3.29
Κορώνεια	25.31
Λυσιμαχία	2.26
Μικρή Πρέσπα	12.92
Παμβώτιδα	18.09
Πετρών	4.97
Τριχωνίδα	2.73
Βεγορίτιδα	5.60
Βόλβη	2.75
Ζάζαρη	3.60

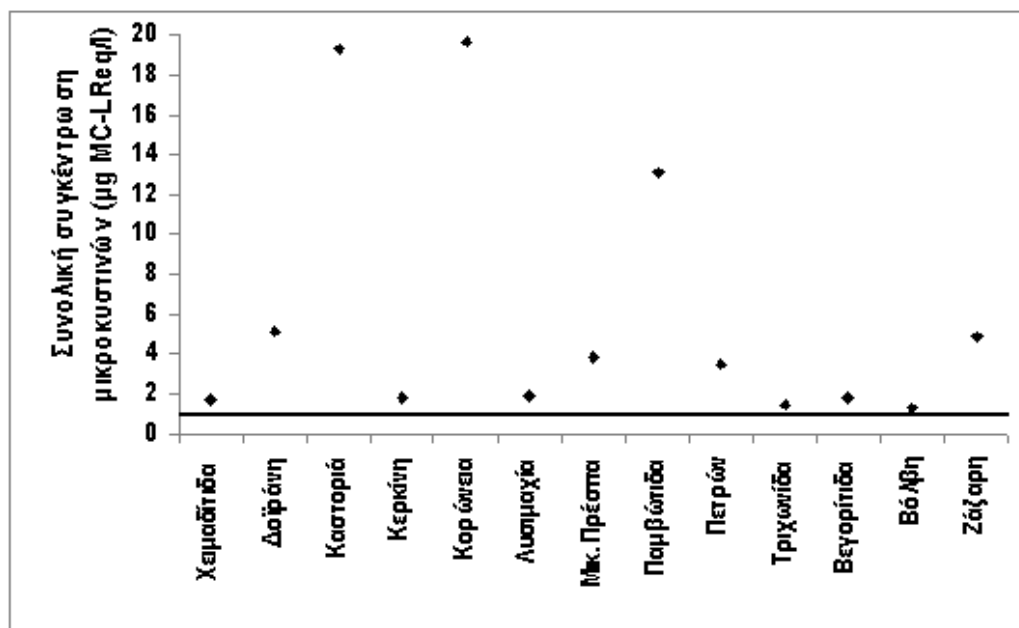
Πίνακας 8.5. Συγκεντρώσεις μικροκυστινών στη σάρκα των υδρόβιων οργανισμών της Λίμνης Παμβώτιδας τη χειμερινή και θερινή περίοδο του 2008 (Κεφάλαιο 7).

Table 8.5. Microcystin concentration in muscle of aquatic organisms from Lake Pamvotis, during winter and summer of 2008 (Chapter 7).

Υδρόβιοι οργανισμοί	Συγκέντρωση μικροκυστινών στη σάρκα (ng MC-Leq /g)	
	Χειμερινή περίοδος	Θερινή περίοδος
<i>Carassius gibelio</i>	104.00	107.29
<i>Cyprinus carpio</i>	95.78	119.07
<i>Rutilus panosi</i>	52.70	54.17
<i>Astacus astacus</i>	216.41	328.61
<i>Rana epirotica</i>	88.12	325.49

8.2. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Οι συνολικές συγκεντρώσεις των μικροκυστινών (ενδοκυττάρια και εξωκυττάρια) (2.73 μg MC-LReq/l - 25.31 μg MC-LReq/l) όλων των υδάτινων συστημάτων που μελετήθηκαν κατά τη διάρκεια του 2005, ξεπερνούσαν τη συγκέντρωση των 1 μg MC-LR/l, η οποία αποτελεί την ασφαλή τιμή για τη χρήση του νερού ως πόσιμο (Εικόνα 8.2). Ειδικότερα, η συγκέντρωση των μικροκυστινών στη Λίμνη Κορώνεια ξεπέρασε την παραπάνω ασφαλή τιμή κατά 25 φορές. Ακολούθησαν η Λίμνη Καστοριά και η Λίμνη Παμβώτιδα με συγκεντρώσεις μικροκυστινών κατά 19 και 18 φορές υψηλότερες από τη συγκέντρωση των 1 μg MC-LR/l, αντιστοίχως.



Εικόνα 8.2. Κατανομή συνολικών συγκεντρώσεων μικροκυστινών (µg MC-LR eq /l) στα υδάτινα συστήματα μελέτης, το έτος 2005. Η οριζόντια γραμμή αντιπροσωπεύει το ασφαλές όριο (1 µg MC-LR /l) για το πόσιμο νερό που έχει οριστεί από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας

Figure 8.2. Total concentrations of microcystins in Greek lakes examined in 2005. The horizontal line represents the safe level (1 µg MC-LR/l) for drinking water, according to World Health Organization

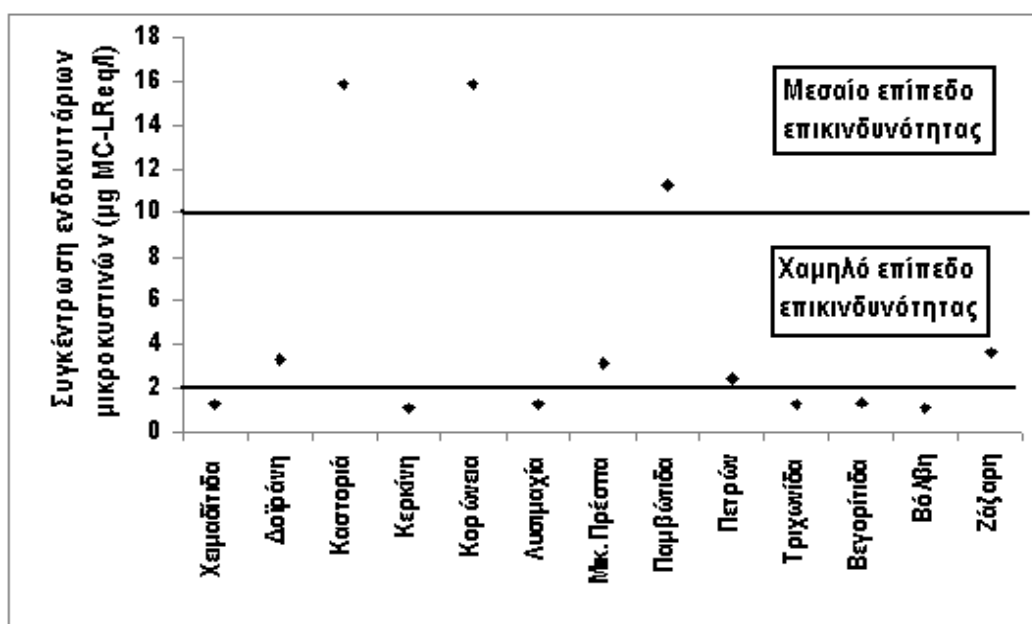
Τα υδάτινα οικοσυστήματα που εξετάστηκαν στην παρούσα ενότητα, δεν χρησιμοποιούνται ως πηγές πόσιμου νερού (Kagalou & Leonardos, 2009). Εντούτοις, καθώς ο πλανήτης πλήττεται από την απότομη άνοδο της θερμοκρασίας και οι πηγές νερού συνεχώς λιγοστεύουν (Park et al., 2004), είναι πολύ πιθανόν, τα παραπάνω οικοσυστήματα, να αποτελέσουν μελλοντικές πηγές πόσιμου νερού. Όμως, σύμφωνα με τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης, η παρουσία σημαντικών συγκεντρώσεων μικροκυστινών στα παραπάνω οικοσυστήματα, αποτελεί έναν ακόμη αποτρεπτικό παράγοντα για τη χρήση αυτών των επιφανειακών νερών για ύδρευση. Σύμφωνα με τη διεθνή βιβλιογραφία, η κατανάλωση νερού επιβαρυσμένου με μικροκυστίνες μπορεί να οδηγήσει σε απλά περιστατικά γαστρεντερίτιδας, εμφάνιση όγκων ή ακόμα και σε θανάτους (Falconer, 2005). Από τον Πίνακα 8.6, μπορεί κανείς να συμπεράνει ότι οι δυσμενείς συνέπειες της κατανάλωσης νερού επιβαρυσμένου με μικροκυστίνες είναι υπαρκτές σε πολλές χώρες του κόσμου.

Πίνακας 8.6. Παραδείγματα ανθρώπινης έκθεσης στις μικροκυστίνες και συμπτώματα

Table 8.5 Example of human microcystin exposure with associated health outcomes.

Έτος	Περιοχή	Συμπτώματα	Βιβλιογραφία
Πόσιμο νερό			
1931	Αμερική	Γαστρεντερίτιδα, κοιλιακός πόνος, ναυτία	Falconer(2006)
1960-1965	Αφρική	Γαστρεντερίτιδα	Falconer(2006)
1975	Αμερική	Γαστρεντερίτιδα	Codd et al.,(2005)
1979	Αυστραλία	Γαστρεντερίτιδα, καταστροφή ήπατος, νεφρού εντέρου	Chorus & Bartram (1999)
1981	Αυστραλία	Καταστροφή ήπατος	Chorus & Bartram (1999)
1977-1996	Κίνα	Καρκίνος εντέρου, θάνατοι	Falconer(2006)
1972-1990	Κίνα	Καρκίνος ήπατος, θάνατοι	Falconer(2006)
1988	Βραζιλία	Γαστρεντερίτιδα, θάνατοι	W.H.O.(1998)
1994	Σουηδία	Γαστρεντερίτιδα, κοιλιακός και μυϊκός πόνος	Chorus & Bartram (1999)
Δραστηριότητες αναψυχής			
1959	Καναδάς	Πονοκέφαλος, ναυτία, διάρροια	W.H.O.(1998)
1980-1981	Αμερική	Συμπτώματα γρίπης	W.H.O.(1998)
1989	Αγγλία	Πνευμονική ανεπάρκεια, γαστρεντερίτιδα	W.H.O.(1998)
1995	Αυστραλία	Γαστρεντερίτιδα, ναυτία	W.H.O.(1998)
1996	Αγγλία	Γαστρεντερίτιδα	W.H.O.(1998)
1996-1998	Αυστραλία	Δερματίτιδα, πνευμονική ανεπάρκεια	Duy et al.(2000)
2002-2003	Φιλανδία	Πυρετός, κοιλιακός πόνος	Codd et al.(2005)
Αιμοδιάλυση			
1974	Αμερική	Πυρετός, μυαλγία, ναυτία	W.H.O.(1998)
1996	Βραζιλία	Καταστροφή ήπατος, θάνατοι	Chorus & Bartram(1999)
2001	Βραζιλία	Καταστροφή ήπατος	Falconer(2006)

Στην Εικόνα 8.3 παρουσιάζονται τα επίπεδα επικινδυνότητας της ανθρώπινης υγείας κατά τη διάρκεια ψυχαγωγικών δραστηριοτήτων, από την παρουσία των μικροκυστινών στα οικοσυστήματα μελέτης. Προέκυψε ότι οι Λίμνες: Καστοριά, Κορώνεια και Παμβώτιδα εντάσσονται στο μεσαίο επίπεδο επικινδυνότητας, ενώ οι Λίμνες: Δοϊράνη, Μικρή Πρέσπα, Πετρών και Ζάζαρη εντάσσονται στο χαμηλό επίπεδο επικινδυνότητας. Στις Λίμνες: Χειμαδίτιδα, Κερκίνη, Λουσιμαχία, Τριχωνίδα, Βεγορίτιδα και Βόλβη η χρήση του νερού τους για ψυχαγωγικές δραστηριότητες δεν αποτελεί απειλή για την ανθρώπινη υγεία.

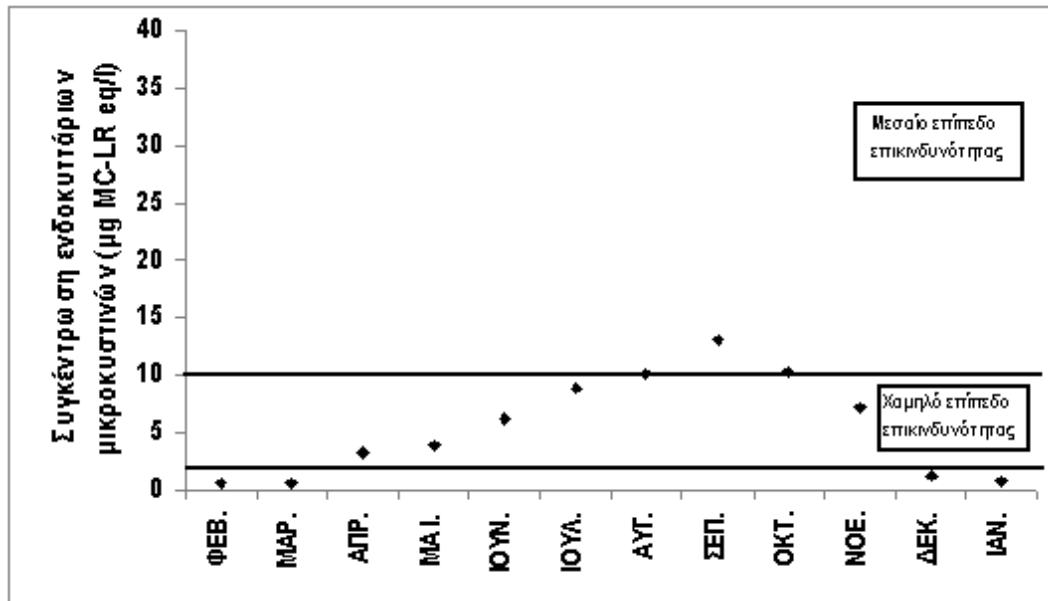


Εικόνα 8.3. Συγκεντρώσεις ενδοκυττάρων μικροκυστινών (µg MC-LR eq /l) στα υδάτινα οικοσυστήματα που εξετάστηκαν το έτος 2005 και σύγκριση τους με τα όρια ασφαλείας που σχετίζονται με τις ψυχαγωγικές δραστηριότητες, σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας

Figure 8.3. Cell-bound microcystin concentrations(µg MC-LR eq /l) in the examined Lakes during 2005, compared with guide lines for assessing adverse health risks, associated with recreational activities.

Επιπλέον, στη Λίμνη Παμβώτιδα, οι θερμοί μήνες του 2008, εντάχθηκαν στο μεσαίο επίπεδο επικινδυνότητας όσον αφορά τη χρήση του νερού για ψυχαγωγικές δραστηριότητες. Στο χαμηλό επίπεδο επικινδυνότητας εντάχθηκαν οι υπόλοιποι μήνες, με εξαίρεση τους χειμερινούς μήνες (Ιανουάριος, Φεβρουάριος, Μάρτιος), στους οποίους αποδείχθηκε ότι δεν υπήρχε κίνδυνος από την παρουσία των μικροκυστινών για την πραγματοποίηση ψυχαγωγικών δραστηριοτήτων (Εικόνα 8.4).

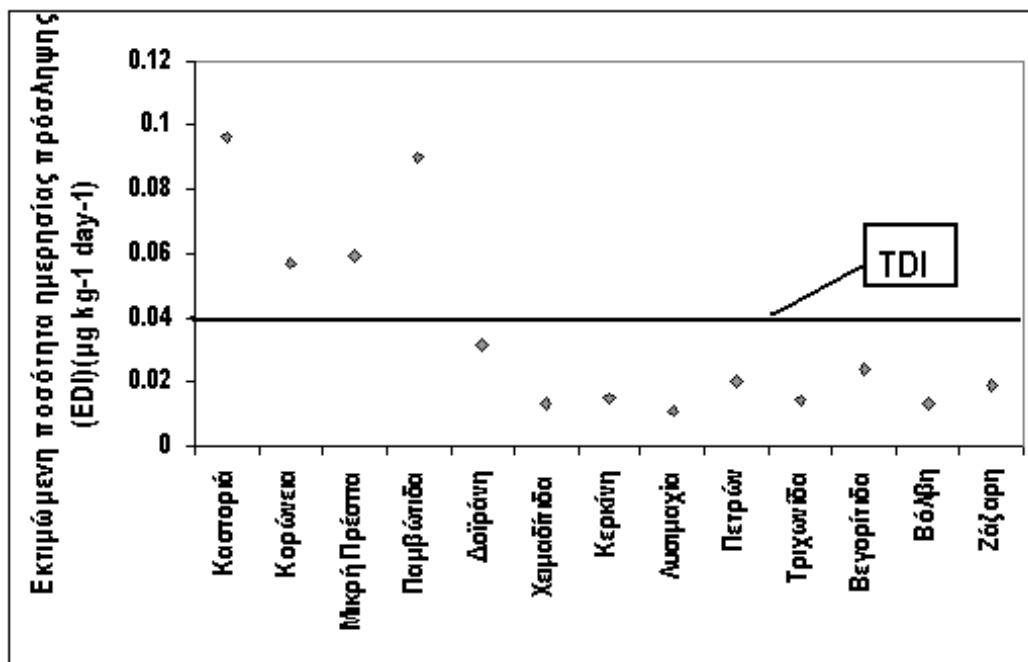
Σύμφωνα με τους Kagalou & Leonardos, (2009), οι Λίμνες Παμβώτιδα, Μικρή Πρέσπα, Καστοριά και Ζάζαρη χρησιμοποιούνται και ως χώροι αναψυχής. Εντούτοις, από την παρούσα μελέτη αποδείχθηκε ότι η διεξαγωγή ψυχαγωγικών δραστηριοτήτων στις παραπάνω λίμνες εγκυμονεί κινδύνους για τη δημόσια υγεία. Η κυριότερη έκθεση των ανθρώπων στις μικροκυστίνες, η οποία έχει συνδεθεί με τα περισσότερα περιστατικά τοξικών σεων, θεωρείται η έκθεση μέσω των ψυχαγωγικών δραστηριοτήτων (Stewart et al., 2006). Επιπλέον, κατά τη διάρκεια των ψυχαγωγικών δραστηριοτήτων, οι άνθρωποι είναι δυνατόν να μην έρθουν καθόλου σε επαφή με το επιβαρυσμένο νερό, αλλά να εισπνεύσουν σταγονίδια που περιέχουν μικροκυστίνες και να έχουν σοβαρά τοξικά συμπτώματα (Duy et al., 2000) (Πίνακας 8.6).



Εικόνα 8.4. Μηνιαίες συγκεντρώσεις ενδοκυττάρων μικροκυστινών (µg MC-LR eq /l) στη Λίμνη Παμβώτιδα το έτος 2008 και σύγκριση τους με τα όρια ασφαλείας που σχετίζονται με τις ψυχαγωγικές δραστηριότητες, σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας

Figure 8.4. Monthly cell-bound microcystin concentrations(µg MC-LR eq /l) in Lake Pamvotis during 2008, compared with guide lines for assessing adverse health risks, associated with recreational activities.

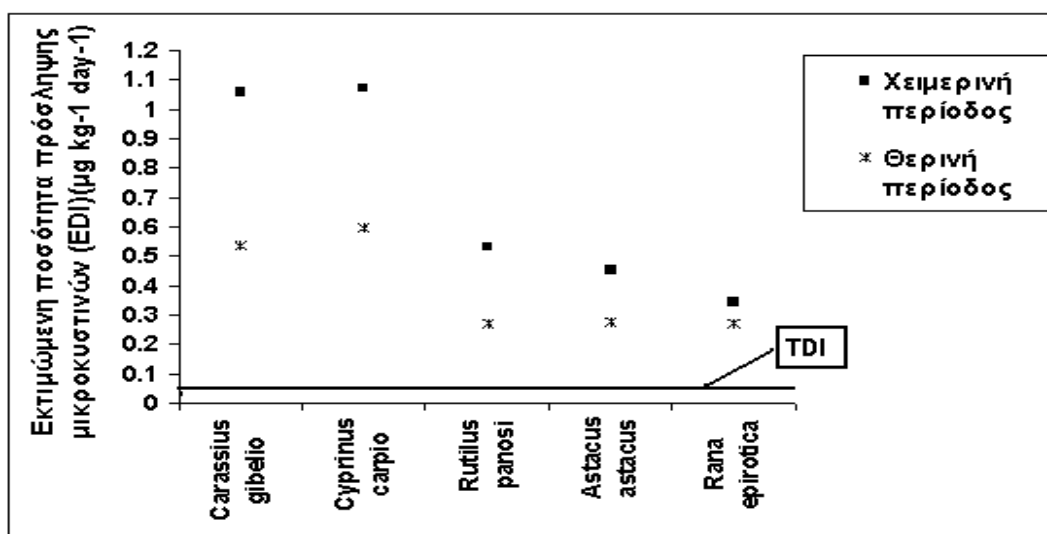
Όσον αφορά την κατανάλωση επιβαρυμένων ιχθύων, υψηλές τιμές EDI, οι οποίες ξεπέρασαν την τιμή της επιτρεπόμενης ποσότητας ημερήσιας πρόσληψης μικροκυστινών (TDI=0.04 µg Kg⁻¹ day⁻¹) εμφάνισαν οι Λίμνες: Καστοριά (0.096 µg Kg⁻¹ day⁻¹), Κορώνεια (0.057 µg Kg⁻¹ day⁻¹), Μικρή Πρέσπα (0.059 µg Kg⁻¹ day⁻¹) και Παμβώτιδα (0.09 µg Kg⁻¹ day⁻¹). Κατά τη διάρκεια της μελέτης, η κατανάλωση ιχθύων *C. gibelio* από τις Λίμνες: Δοϊράνη, Χειμαδίτιδα, Κερκίνη, Λυσιμαχία, Πετρών, Τρικωνίδα, Βεγορίτιδα, Βόλβη και Ζάζαρη, αποδείχθηκε ότι δεν αποτελούσε απειλή για την υγεία των καταναλωτών (Εικόνα 8.5).



Εικόνα 8.5. Εκτιμώμενη ποσότητα ημερήσιας πρόσληψης μικροκυστινών από την κατανάλωση 300 g σάρκας του *C.gibelio* των υδάτινων οικοσυστημάτων που εξετάστηκαν το 2005. Η οριζόντια γραμμή αντιπροσωπεύει την επιτρεπόμενη ποσότητα ημερήσιας πρόσληψης μικροκυστινών, σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας

Figure 8.5 Estimated daily intake (EDI) of microcystins based on a 60 kg person ingesting a 300 g serving of *C.gibelio* from Greek lakes, during 2005. The horizontal line represents the tolerable daily total intake established by WHO.

Σύμφωνα με την Εικόνα 8.6, η εκτιμώμενη ποσότητα ημερήσιας πρόσληψης μικροκυστινών (EDI) από την κατανάλωση των υδρόβιων οργανισμών της Λίμνης Παμβώτιδας κατά τη διάρκεια του έτους 2008, ξεπέρασε την τιμή της επιτρεπόμενης ποσότητας ημερήσιας πρόσληψης μικροκυστινών (TDI). Η κατανάλωση των ιχθύων (*Rutilus rutilus*, *Carassius gibelio*, *Cyprinus carpio*) αποδείχθηκε ότι συνιστούσε υψηλότερο κίνδυνο για τους καταναλωτές σε σχέση με την κατανάλωση του αμφίβιου (*Rana epirotica*) και του βαδιστικού δεκαπόδου (*Astacus astacus*). Σημαντικό είναι επίσης το γεγονός ότι η κατανάλωση των παραπάνω υδρόβιων οργανισμών αποδείχθηκε επικίνδυνη και τις δύο περιόδους μελέτης (χειμερινή και θερινή).



Εικόνα 8.6. Εκτιμώμενη ποσότητα ημερήσιας πρόσληψης μικροκυστινών (EDI) από την κατανάλωση 300 g σάρκας υδρόβιων οργανισμών της Λίμνης Παμβώτιδας τη χειμερινή και θερινή περίοδο του 2008. Η οριζόντια γραμμή αντιπροσωπεύει την επιτρεπόμενη ποσότητα ημερήσιας πρόσληψης μικροκυστινών (TDI), σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας

Figure 8.6 Estimated daily intake (EDI) of microcystins based on a 60 kg person ingesting a 300 g serving of aquatic organisms from Lake Pamvotis, during winter and summer of 2008. The horizontal line represents the tolerable daily total intake (TDI) established by WHO.

Η τοξίκωση μέσω της τροφής εξαρτάται από τη συγκέντρωση των μικροκυστινών στο τρόφιμο, καθώς και από τη βιοδιαθεσιμότητα των μικροκυστινών στο συγκεκριμένο τρόφιμο (Carmichael & Falconer, 1993). Στις λίμνες που εξετάστηκαν, το είδος *Cyprinus carpio* έχει μεγάλη εμπορική αξία, καθώς καταναλώνεται σε πολλές περιοχές της Ελλάδος. Μικρότερη εμπορική αξία έχουν τα είδη *Carassius gibelio* και *Rutilus rutilus*, και το βαδιστικό δεκάποδο *Astacus astacus*. Το αμφίβιο *Rana epirotica*, αποτελεί ενδημικό είδος της Λίμνης Παμβώτιδας και τοπικό έδεσμα. Εντούτοις, σύμφωνα με τα αποτελέσματα της παρούσας ενότητας, όλοι οι παραπάνω οργανισμοί είναι επικίνδυνοι για κατανάλωση ειδικά για τις ευπαθείς ομάδες του πληθυσμού, όπως τα παιδιά και οι ηλικιωμένοι.

Από τα παραπάνω προκύπτει ότι στα ελληνικά υδάτινα οικοσυστήματα η παρουσία των μικροκυστινών δεν έχει μόνο ως συνέπεια την υποβάθμιση των υδάτων, αλλά και την απειλή της δημόσιας υγείας. Επομένως, η ορθή και έγκαιρη ενημέρωση του κοινού για τους πιθανούς κινδύνους που σχετίζονται με τις μικροκυστίνες, πρέπει να αποτελεί υποχρέωση των επιστημόνων αλλά και των τοπικών αρμόδιων αρχών.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 9

ΓΕΝΙΚΑ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Ο ελλαδικός χώρος αποτελείται από ένα πλούτο εσωτερικών υδάτων, τα οποία χαρακτηρίζονται από διαφορετική μορφολογία, λειτουργία και τροφική κατάσταση (Zacharias et al., 2002). Η όλο αυξανόμενη αστικοποίηση πολλών περιοχών της Ελλάδας, καθώς και η έλλειψη οικολογικής συνείδησης και παιδείας, οδήγησαν στην επιβάρυνση του τροφικού επιπέδου πολλών από τα εσωτερικά ελληνικά ύδατα (Temponeras et al. 2000). Συνέπεια αυτής της επιβάρυνσης ήταν ο ευτροφισμός και η επακόλουθη εμφάνιση άνθησης κυανοβακτηρίων σε πολλές λίμνες (Vardaka et al., 2000; 2005; Cook et al., 2004). Επιπλέον, όπως αποδείχθηκε από την παρούσα μελέτη, οι ελληνικές λίμνες χαρακτηρίζονται και από την παρουσία σε αυτές, σημαντικών ποσοτήτων μικροκυστινών. Υψηλές συγκεντρώσεις μικροκυστινών μετρήθηκαν στις λίμνες με έντονα χαρακτηριστικά ευτροφισμού, όπως η Κορώνεια, η Παμβώτιδα, η Λίμνη της Καστοριάς, η Λυσιμαχία, η Μικρή Πρέσπα και η Δοϊράνη. Ενδιάμεσες συγκεντρώσεις μικροκυστινών εντοπίστηκαν στις λίμνες με μεσότροφα χαρακτηριστικά, όπως οι λίμνες: Ζάζαρη, Χειμαδίτιδα, Πετρών και Κερκίνη. Χαμηλές συγκεντρώσεις εμφάνισαν οι λιγότερο εύτροφες λίμνες: Τριχωνίδα, Βόλβη και Βεγορίτιδα. Η παρουσία των μικροκυστινών στις ελληνικές λίμνες πιθανώς σχετίζεται με τις έντονες ανθρωπογενείς πιέσεις που δέχονται οι περισσότερες λίμνες, όπως οι αυξανόμενες αγροτικές δραστηριότητες. Η καταγραφή των συγκεντρώσεων των μικροκυστινών στις ελληνικές λίμνες, συμβάλει στον εμπλουτισμό των πληροφοριών σχετικά με την ύπαρξη των παραπάνω τοξινών στις μεσογειακές χώρες. Σε τοπικό επίπεδο, τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης δημιουργούν προβληματισμούς σχετικά με την ποιότητα των ελληνικών λιμνών και θα πρέπει να θέτουν σε επαγρύπνηση τους αρμόδιους φορείς.

Η μελέτη των παραγόντων της ποιότητας του νερού της Λίμνης Παμβώτιδας επιβεβαίωσε τον αυξημένο ευτροφισμό της λίμνης. Κάτω

από αυτές τις ευτροφικές συνθήκες, η ανίχνευση σημαντικών συγκεντρώσεων ενδοκυττάρων και εξωκυττάρων μικροκυστινών στη Λίμνη Παμβώτιδα ήταν αναμενόμενη. Η παρουσία των κυανοβακτηριακών γενών *Anabaena*, *Aphanizomenon* και *Microcystis* καθόλη τη διάρκεια του έτους παρακολούθησης, διαμόρφωσε τις συγκεντρώσεις των παραπάνω τοξινών. Η συγκέντρωση των συνολικών μικροκυστινών (ενδοκυττάρων και εξωκυττάρων) στο νερό της λίμνης εμφάνισε χωρικές και χρονικές διακυμάνσεις. Οι υψηλότερες συγκεντρώσεις μικροκυστινών στους παρόχθιους σταθμούς σε σύγκριση με τους πελαγικούς σταθμούς είναι χαρακτηριστικό γνώρισμα των λιμνών στις οποίες αναπτύσσονται τα κυανοβακτηριακά γένη *Anabaena*, *Aphanizomenon* και *Microcystis* (Hotto et al., 2005) και πιθανώς σχετίζεται με τις υψηλότερες συγκεντρώσεις των θρεπτικών συστατικών στις παρόχθιες περιοχές (Rogalus & Watzin, 2008). Σύμφωνα με τα παραπάνω, οι παρόχθιες περιοχές της λίμνης συνιστούν υψηλό κίνδυνο, δεδομένου ότι αυτές αποτελούν περιοχές αναψυχής. Η συγκέντρωση των συνολικών μικροκυστινών στη Λίμνη Παμβώτιδα κυμάνθηκε σε χαμηλές τιμές τους χειμερινούς μήνες, ενώ αυξήθηκε τους θερινούς και φθινοπωρινούς μήνες. Αυτή η χρονική διακύμανση, πιθανώς οφείλεται στην αύξηση των κυανοβακτηρίων στο νερό της λίμνης κατά τους θερμούς μήνες, όπως αυτή αποδείχθηκε από τη διακύμανση της φυκοκυανίνης.

Πολλές φορές τα αποτελέσματα μελετών σχετικά με την επίδραση των περιβαλλοντικών παραμέτρων είναι αντικρουόμενα (Watanabe & Oishi, 1985; Kotak et al., 1995; Oh et al., 2000; Kameyama et al., 2002; Vezie et al., 2002). Επίσης, ακόμα και μέχρι σήμερα, δεν έχουν καθοριστεί επακριβώς οι περιβαλλοντικές συνθήκες που είναι απαραίτητες για την άνθηση των κυανοβακτηρίων και την παραγωγή των κυανοτοξινών (Jacoby et al., 2000). Από την παρούσα μελέτη αποδείχθηκε ότι η διακύμανση της συγκέντρωσης των ορθοφωσφορικών ιόντων, της χλωροφύλλης-α και της φυκοκυανίνης, καθώς και η διακύμανση της θερμοκρασίας, σχετίζονταν με τη συγκέντρωση των μικροκυστινών στη Λίμνη Παμβώτιδα. Η ισχυρή συσχέτιση που

παρατηρήθηκε μεταξύ της συγκέντρωσης των μικροκυστινών και της φυκοκυανίνης, υποστηρίζει την αξία της μέτρησης της φυκοκυανίνης ως προειδοποιητικό δείκτη της παρουσίας των μικροκυστινών στη Λίμνη Παμβώτιδα.

Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης των μικροκυστινών καθώς και ο καθορισμός των περιβαλλοντικών παραγόντων που σχετίζονται με την διαμόρφωση της παραπάνω συγκέντρωσης, αποτελούν αδιαμφισβήτητα απαραίτητες ενέργειες σε κάθε πρόγραμμα παρακολούθησης της ποιότητας των λιμνών. Εντούτοις, οι πληροφορίες που σχετίζονται με το μέγεθος και το είδος της κυανοβακτηριακής τοξικότητας είναι επίσης σημαντικές, καθώς σχετίζονται με τους πιθανούς κινδύνους που διατρέχουν τα ζώα και οι άνθρωποι που εκτίθενται στα τοξικά κυανοβακτήρια. Ο έλεγχος της τοξικότητας του κυανοβακτηριακού εκχυλίσματος της Λίμνης Παμβώτιδας μέσω των βιοδοκιμών σε επίμυες έδειξε ότι οι κυανοβακτηριακές αθροίσεις της Λίμνης Παμβώτιδας κατατάσσονται στις πολύ ηπατοτοξικές ($LD_{50}=35.70 \text{ mg kg}^{-1}$). Μάλιστα, είναι πιο τοξικές από τις κυανοβακτηριακές αθροίσεις διαφόρων λιμνών, όπως οι Λίμνες Mansour Eddanbi και Almassira του Μαρόκο, η Λίμνη Taihu της Κίνας και η Λίμνη Barra Bonita της Βραζιλίας (Douma et al., 2010; Sotero-Santos et al., 2006). Σε πολλές λίμνες του κόσμου καταγράφηκαν περιστατικά ηπατοτοξικότητας σημαντικού αριθμού άγριων και κατοικίδιων ζώων (Chorus, 2001; Carmichael, 2001; Mohamed et al., 2003). Επομένως, η υψηλή ηπατοτοξικότητα της Λίμνης Παμβώτιδας αυξάνει τους κινδύνους τοξίκωσης πολλών ζώων που εκτίθενται καθημερινά στο νερό της λίμνης.

Ανάμεσα στους ζωικούς οργανισμούς που διατρέχουν υψηλό κίνδυνο από την παρουσία των μικροκυστινών, είναι οι ιχθύες (Ernst, 2008). Η υψηλή τοξική επίδραση του κυανοβακτηριακού εκχυλίσματος της Λίμνης Παμβώτιδας αποδείχθηκε και στους ιχθύες του είδους *Danio rerio*. Οι τοξικές επιδράσεις σχετίζονταν κυρίως με την επιβράδυνση της έναρξης της εκκόλαψης και τη μείωση του ρυθμού εκκόλαψης, τη μειωμένη ανάπτυξη των λαρβών, τη δημιουργία του μεγαλύτερου αριθμού παραμορφώσεων που έχει καταγραφεί μέχρι σήμερα στη διεθνή

βιβλιογραφία και τη μείωση του ρυθμού επιβίωσης των ιχθύων με τη μικρότερη συγκέντρωση μικροκυστινών που επίσης έχει καταγραφεί μέχρι σήμερα. Από τα παραπάνω, γίνεται φανερό ότι η παρούσα μελέτη συμβάλει στην επαγρύπνηση των επιστημόνων και των αρμόδιων φορέων σχετικά με τις πιθανές τοξικές επιδράσεις που είναι δυνατόν να αντιμετωπίζουν οι ιχθύες της Λίμνης Παμβώτιδας.

Η παρουσία σημαντικών συγκεντρώσεων μικροκυστινών στους ιχθύες του είδους *Carassius gibelio* των ελληνικών λιμνών αποτελεί ακόμα μια επιβλαβή συνέπεια των τοξικών κυανοβακτηρίων των παραπάνω λιμνών. Η κατανομή των συγκεντρώσεων των μικροκυστινών στους ιχθύες, ακολούθησε την κατανομή των συγκεντρώσεων των μικροκυστινών στο νερό των λιμνών, με αποτέλεσμα στους ιχθύες των περισσότερο εύτροφων λιμνών (Κορώνεια, Καστοριά, Παμβώτιδα, Δοϊράνη και Μικρή Πρέσπα) να ανιχνευθούν οι υψηλότερες συγκεντρώσεις μικροκυστινών. Η ιδιότητα των μικροκυστινών να συσσωρεύονται στο ήπαρ των ζωικών οργανισμών (Tencalla et al., 1997; Fischer & Dietrich, 2000), ήταν φανερή και στην περίπτωση του *Carassius gibelio*, καθώς στον παραπάνω ιστό ανιχνεύθηκαν οι υψηλότερες συγκεντρώσεις των παραπάνω τοξινών. Η παράκαμψη του μηχανισμού της συστηματικής ηπατικής ελαχιστοποίησης ή και η απευθείας μεταφορά των μικροκυστινών διαμέσου του αίματος (Carbis et al., 1996b; Fischer & Dietrich, 2000) είχαν ως συνέπεια την κατανομή των μικροκυστινών και στους υπόλοιπους ιστούς του ιχθύος. Ιδιαίτερα εντυπωσιακό είναι το γεγονός ότι οι ιχθύες όλων των ελληνικών λιμνών που εξετάστηκαν, συσώρευσαν υψηλές συγκεντρώσεις μικροκυστινών στον εγκέφαλο τους. Επομένως, η παρούσα μελέτη συμβάλει στην ενίσχυση της άποψης των Kankaanpää et al., (2005) ότι οι μικροκυστινές πιθανώς να έχουν και νευροτοξική δράση. Η συγκέντρωση των μικροκυστινών στις γονάδες των ιχθύων είναι ελάχιστα μελετημένη, ενώ τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης θέτουν προβληματισμούς σχετικά με τους πιθανούς κινδύνους του αναπαραγωγικού συστήματος των ιχθύων από την παρουσία των μικροκυστινών. Οι χαμηλότερες συγκεντρώσεις μικροκυστινών που ανιχνεύθηκαν στη σάρκα του *Carassius gibelio*, πιθανώς οφείλονται στην

υψηλή ικανότητα του παραπάνω ιστού να αποβάλλει τις μικροκυστινές μέσω του μηχανισμού αποτοξίκωσης (Deblois et al., 2008).

Στη Λίμνη Παμβώτιδα, όπως αποδείχθηκε από την παρούσα μελέτη, οι ιχθύες του είδους *Carassius gibelio* δεν ήταν οι μοναδικοί ιχθύες που συσώρευαν μικροκυστινές στους ιστούς τους. Οι ιχθύες του είδους *Rutilus rutilus* επίσης συσώρευαν σημαντική ποσότητα μικροκυστινών στο ήπαρ, τους νεφρούς, τον εγκέφαλο και τη σάρκα τους. Η μελέτη της συσσώρευσης των μικροκυστινών σε διαφορετικές κλάσεις μήκους του ιχθύος *Rutilus rutilus* συνέβαλε στον εμπλουτισμό των πληροφοριών σχετικά με τη διαφορετική ευαισθησία στις μικροκυστινές που είναι δυνατόν να υφίσταται ανάμεσα σε ιχθύες του ίδιου είδους. Οι ιχθύες με μικρότερο μήκος (και μικρότερη ηλικία) αποδείχθηκε ότι ήταν πιο ευάλωτοι στη συσσώρευση μικροκυστινών, σε σύγκριση με του μεγαλύτερου μήκους ιχθύες. Η παραπάνω διαφορά τονίζει τη σημασία της διατροφής, στη συσσώρευση των μικροκυστινών, καθώς και την σημασία του μηχανισμού αποτοξίκωσης των μικροκυστινών.

Η συσσώρευση των μικροκυστινών μέσω της διατροφής, η οποία αποτελεί και την κύρια οδό έκθεσης των υδρόβιων οργανισμών στις παραπάνω τοξίνες, έχει επίσης πολύ μεγάλη σημασία στη μεταφορά και την πιθανή βιομεγέθυνση των μικροκυστινών μέσω της τροφικής αλυσίδας (Ibelings et al., 2005). Στη Λίμνη Παμβώτιδα, ο πρώτος κρίκος της τροφικής αλυσίδας, που αποτελείται από τους φυτοπλαγκτονικούς οργανισμούς ήταν υπεύθυνος για τη μεταφορά σημαντικού ποσού μικροκυστινών στους ζωοπλαγκτονικούς οργανισμούς. Η χαρακτηριστική ιδιότητα του δίθυρου *Anodonta cygnea* να διηθεί τη τροφή του, είναι πιθανώς η αιτία της συσσώρευσης υψηλής συγκέντρωσης μικροκυστινών στον παραπάνω οργανισμό της Λίμνης Παμβώτιδας. Εντούτοις, η συγκέντρωση των μικροκυστινών που ανιχνεύθηκε στους ιστούς του δίθυρου ήταν αρκετά χαμηλότερη από αυτή που συσσωρεύθηκε στο ζωοπλαγκτόν, ενισχύοντας την άποψη των Martins & Vasconcelos, (2009) για την υψηλή ανθεκτικότητα των δίθυρων στις μικροκυστινές. Η παραπάνω ανθεκτικότητα πιθανώς σχετίζεται με τον αποδοτικότερο

μηχανισμό αποτοξίκωσης που διαθέτουν τα δίθυρα (Martins & Vasconcelos, 2009). Τα δεκάποδα της Λίμνης Παμβώτιδας *Atyaephyra desmaresti* και *Astacus astacus* καθώς και το γαστερόποδο *Viviparus contectus* συσσωρεύσαν σημαντικό ποσό μικροκυστινών. Αυτό το γεγονός αναπτύσσει προβληματισμούς για την ορθή δομή και λειτουργία του οικοσυστήματος, οι οποίες στηρίζονται κατά πολύ στην παρουσία των παραπάνω οργανισμών. Το διαιτολόγιο των ιχθύων της Λίμνης Παμβώτιδας που ανήκαν σε διαφορετικά τροφικά επίπεδα, πιθανότατα ήταν υπεύθυνο για την κατανομή των μικροκυστινών σε αυτούς τους οργανισμούς. Σύμφωνα λοιπόν με τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης, ο πλαγκτονοφάγος ιχθύς *Rutilus rutilus* φάνηκε να συσσωρεύει υψηλότερες συγκεντρώσεις μικροκυστινών σε σύγκριση με τους παμφάγους ιχθύες *Carassius gibelio*, *Cyprinus carpio* και το σαρκοφάγο ιχθύ, *Silurus aristotelis*. Αυτό το γεγονός οδηγεί στο συμπέρασμα ότι οι ιχθύες κατώτερων τροφικών επιπέδων, της Λίμνης Παμβώτιδας δεν εμφανίζουν την τάση να μεταφέρουν τις μικροκυστίνες στους ιχθύες ανώτερων τροφικών επιπέδων. Η υψηλή συγκέντρωση μικροκυστινών που ανιχνεύθηκε στο ενδημικό είδος της Λίμνης Παμβώτιδας *Rana epirotica*, διεγείρει πολλές ανησυχίες σχετικά με τη μεταφορά των παραπάνω τοξινών στα χερσαία οικοσυστήματα. Παρόλο που όλοι οι υδρόβιοι οργανισμοί που εξετάστηκαν συσσωρεύσαν στους ιστούς τους σημαντικά ποσά μικροκυστινών, αποδείχθηκε ότι δεν υπάρχει βιομεγέθυνση των μικροκυστινών μέσω της τροφικής αλυσίδας. Αυτό το συμπέρασμα είναι σε συμφωνία με πολλές άλλες σχετικές μελέτες σε διάφορες λίμνες του κόσμου (Ibelings et al., 2005) και υποστηρίζει την υψηλή υδροφιλικότητα των μικροκυστινών αλλά και τον αποδοτικό μηχανισμό αποτοξίκωσης που διαθέτουν οι υδρόβιοι οργανισμοί.

Η συχνή παρακολούθηση της συγκέντρωσης των κυανοτοξινών ενός υδάτινου οικοσυστήματος, καθώς και η προειδοποίηση του κοινού σχετικά με τους κινδύνους που εγκυμονεί η παρουσία των κυανοτοξινών είναι πρωταρχικής σημασίας. Για τον παραπάνω λόγο, η διερεύνηση της απειλής της δημόσιας υγείας από την παρουσία των μικροκυστινών στα ελληνικά υδάτινα οικοσυστήματα αποτέλεσε σημαντικό στόχο της

παρούσας μελέτης. Όλα τα υδάτινα συστήματα που μελετήθηκαν δεν χρησιμοποιούνται ως πηγές πόσιμου νερού, με αποτέλεσμα η δημόσια υγεία να μην διατρέχει κίνδυνο από την παρουσία των μικροκυστινών στο πόσιμο νερό. Εντούτοις, σε ενδεχόμενη μελλοντική χρήση των παραπάνω οικοσυστημάτων ως πηγές πόσιμου νερού, ο κίνδυνος της τοξίκωσης του ανθρώπινου πληθυσμού είναι πολύ μεγάλος. Με δεδομένο ότι τα περισσότερα από τα υδάτινα ελληνικά οικοσυστήματα θεωρούνται χώροι αναψυχής, η έκθεση των ανθρώπων στις μικροκυστίνες μέσω των ψυχαγωγικών δραστηριοτήτων είναι πιο πιθανή. Σύμφωνα λοιπόν με τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης, αλλά και με τις οδηγίες του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας, οι Λίμνες: Καστοριά, Κορώνεια και Παμβώτιδα εντάσσονται στο μεσαίο επίπεδο επικινδυνότητας, ενώ οι Λίμνες: Δοϊράνη, Μικρή Πρέσπα, Πετρών και Ζάζαρη εντάσσονται στο χαμηλό επίπεδο επικινδυνότητας. Στις Λίμνες: Χειμαδίτιδα, Κερκίνη, Λυσιμαχία, Τριγωνίδα, Βεγορίτιδα και Βόλβη η χρήση του νερού τους για ψυχαγωγικές δραστηριότητες δεν εγκυμονεί κινδύνους για την ανθρώπινη υγεία. Η συχνή κατανάλωση της σάρκας των ιχθύων *Carassius gibelio* από τις Λίμνες: Καστοριά, Κορώνεια, Μικρή Πρέσπα και Παμβώτιδα καθώς και των υδρόβιων οργανισμών της Λίμνης Παμβώτιδας: *Cyprinus carpio*, *Rutilus rutilus*, *Astacus astacus* και *Rana epirotica* συνιστά υψηλό κίνδυνο της δημόσιας υγείας, σύμφωνα με τις οδηγίες του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας. Ο παραπάνω κίνδυνος γίνεται ακόμα πιο απειλητικός για τα παιδιά και τους ηλικιωμένους. Από τα παραπάνω γίνεται φανερό ότι οι δυσάρεστες συνέπειες των κυανοβακτηρίων δεν περιορίζονται μόνο στους υδρόβιους οργανισμούς, αλλά είναι δυνατόν να απειλήσουν την ανθρώπινη υγεία μέσω ποικίλων οδών. Επομένως η παρούσα μελέτη συμβάλει στην προειδοποίηση του κοινού για την πιθανή απειλή της δημόσιας υγείας από την παρουσία των τοξικών κυανοβακτηρίων.

Η μελέτη των κυανοβακτηρίων και των τοξικών επιδράσεων τους δεν είναι δυνατόν να περιοριστεί στα πλαίσια μιας μελέτης. Εντούτοις, από την παρούσα μελέτη γίνεται φανερή η ανάγκη για την προστασία των υδάτινων οικοσυστημάτων και των οργανισμών που τα αποτελούν, από

την παρουσία των τοξικών κυανοβακτηρίων. Η μείωση της καταστροφικής ανθρώπινης παρέμβασης και η ανάπτυξη περιβαλλοντικής παιδείας είναι δυνατόν να οδηγήσουν σε αυτή την κατεύθυνση.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα κυανοβακτήρια αποτελούν φυσικό κομμάτι του γήινου οικοσυστήματος, εδώ και 3 δισεκατομμύρια χρόνια, και η τοξικότητά τους ήταν ήδη γνωστή στον ανθρώπινο πληθυσμό εδώ και δύο χιλιάδες χρόνια. Εσωτερικά ύδατα με ποικίλα τροφικά επίπεδα αποτελούν τα συνηθέστερα ενδιαιτήματα των κυανοβακτηρίων. Ο ευτροφισμός των λιμνών και κατά συνέπεια η άνθηση των κυανοβακτηρίων είναι υπεύθυνες για μια σειρά δυσάρεστων γεγονότων που διαταράσσουν την ισορροπία των λιμναίων οικοσυστημάτων, ανάμεσα σε αυτά και η παραγωγή κυανοτοξινών. Οι κυανοτοξίνες είναι επικίνδυνες για τα ζώα και τον άνθρωπο, καθώς αυτές μπορούν να προκαλέσουν ασθένεια ακόμα και θνησιμότητα σε συγκεντρώσεις που απαντώνται στο φυσικό περιβάλλον. Από τις κυανοτοξίνες μεγαλύτερη εξάπλωση και αφθονία παρουσιάζουν οι ηπατοτοξίνες, όπως οι μικροκυστίνες και οι νοντουλαρίνες. Ο κύριος μηχανισμός τοξικότητας των μικροκυστινών είναι η μη αναστρέψιμη αναστολή των πρωτεϊνικών φωσφατασών 1 και 2A. Η βιοσυσσώρευση των μικροκυστινών έχει αποδειχθεί σε μια πληθώρα υδρόβιων και χερσαίων οργανισμών.

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η κάλυψη του κενού που υπάρχει στη διεθνή και ελληνική βιβλιογραφία σχετικά με την παρουσία των μικροκυστινών στα εσωτερικά ύδατα και την επίδραση των παραπάνω τοξινών στους υδρόβιους ζωϊκούς οργανισμούς. Η προσέγγιση του στόχου έγινε με α) τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης των μικροκυστινών (ενδοκυττάρων και εξωκυττάρων) στο νερό εσωτερικών υδάτινων οικοσυστημάτων της Ελλάδος, β) τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης των μικροκυστινών στους ιστούς τους ιχθύος *Carassius gibelio*, των ελληνικών εσωτερικών υδάτινων οικοσυστημάτων, γ) την εκτίμηση των παραμέτρων της ποιότητας του νερού της λίμνης Παμβώτιδας, που συμβάλλουν στην ετήσια δυναμική των μικροκυστινών, δ) την εκτίμηση της διαφορετικής ευαισθησίας στις μικροκυστίνες, που εμφανίζουν οι ιχθύες του είδους *Rutilus panosi*, ανάλογα με το μέγεθος

τους, ε) τον προσδιορισμό της εποχιακής κατανομής των μικροκυστινών σε υδρόβιους οργανισμούς της Λίμνης Παμβώτιδας, στ) την εκτίμηση της πιθανής βιομεγένθυσης των μικροκυστινών διαμέσου της τροφικής αλυσίδας, ζ) τον έλεγχο της τοξικότητας των κυανοβακτηριακών εκχυλισμάτων της Λίμνης Παμβώτιδας με τη χρήση βιοδοκιμών σε επίμυες και σε ιχθύες του είδους *Danio rerio* και η) τη διερεύνηση της πιθανής απειλής της δημόσιας υγείας από την παρουσία των μικροκυστινών στα ελληνικά εσωτερικά υδάτινα οικοσυστήματα.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης, ανιχνεύθηκαν σημαντικές ποσότητες μικροκυστινών στα εσωτερικά υδάτινα οικοσυστήματα που εξετάστηκαν (με τη χρήση της ενζυμοσυνδεόμενης ανοσοπροσοροφητικής τεχνικής [ELISA]). Οι συγκεντρώσεις των μικροκυστινών διέφεραν σημαντικά ανάμεσα στα οικοσυστήματα. Στη Λίμνη Κορώνεια εντοπίστηκαν οι υψηλότερες συγκεντρώσεις εξωκυττάρων (3748.6 ng MC-LR eq /l) και ενδοκυττάρων μικροκυστινών (15896 ng MC-LR eq /l), σε σχέση με τα υπόλοιπα υδάτινα συστήματα. Αντιθέτως, στη Λίμνη Βόλβη εντοπίστηκαν οι χαμηλότερες συγκεντρώσεις εξωκυττάρων (209.56 ng MC-LR eq /l) και ενδοκυττάρων μικροκυστινών (1086 ngMC-LReq/l). Στα υπόλοιπα υδάτινα οικοσυστήματα, εντοπίστηκαν ενδιάμεσες συγκεντρώσεις εξωκυττάρων και ενδοκυττάρων μικροκυστινών. Από αυτά, υψηλές συγκεντρώσεις μικροκυστινών βρέθηκαν στις Λίμνες Καστοριά (3426 ng MC-LReq/l και 15842 ngMC-LReq/l για τις εξωκυττάρους και ενδοκυττάρους μικροκυστινές, αντιστοίχως) και Παμβώτιδα (1791 ng MC-LReq/l και 11286 ng MC-LR eq /l για τις εξωκυττάρους και ενδοκυττάρους μικροκυστινές, αντιστοίχως). Χαμηλότερες συγκεντρώσεις εντοπίστηκαν στις Λίμνες: Τριχωνίδα (230 ng MC-LReq/l και 1226 ngMC-LReq/l για τις εξωκυττάρους και ενδοκυττάρους μικροκυστινές, αντιστοίχως) και Βεγορίτιδα (523 ng MC-LReq /l και 1346 ng MC-LReq /l για τις εξωκυττάρους και ενδοκυττάρους μικροκυστινές, αντιστοίχως). Οι συγκεντρώσεις των μικροκυστινών που μετρήθηκαν στις ελληνικές λίμνες είναι παραπλήσιες με αυτές που μετρήθηκαν σε άλλες μεσογειακές λίμνες.

Η κατανομή των συγκεντρώσεων των μικροκυστινών στους ιχθύες του είδους *Carassius gibelio*, ακολούθησε την κατανομή των συγκεντρώσεων των μικροκυστινών στο νερό των λιμνών, με αποτέλεσμα στους ιχθύες των περισσότερο εύτροφων λιμνών (Κορώνεια, Καστοριά, Παμβώτιδα, Δοϊράνη και Μικρή Πρέσπα) να ανιχνευθούν οι υψηλότερες συγκεντρώσεις μικροκυστινών. Το είδος *Carassius gibelio* των ελληνικών λιμνών, συσσωρεύει μικροκυστίνες κυρίως στο ήπαρ (124.4 ± 23.4 ng MC-LReq/g), αλλά και στους υπόλοιπους ιστούς που εξετάστηκαν (νεφρός 63.3 ± 12.2 ng MC-LR eq/g, εγκέφαλος 43.8 ± 10.2 ng MC-LR eq /g, έντερο 35.3 ± 15.7 ng MC-LR eq /g, γονάδες 9.27 ± 5.2 ng MC-LR eq /g, σάρκα 7.1 ± 2.5 ng MC-LR eq /g). Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης για πρώτη φορά αποδεικνύουν την συσώρευση υψηλών συγκεντρώσεων μικροκυστινών στον εγκέφαλο των ιχθύων, υποστηρίζοντας την πιθανή νευροτοξικότητα των μικροκυστινών. Παραπλήσιες συγκεντρώσεις μικροκυστινών έχουν ανιχνευθεί και σε άλλα είδη ιχθύων σε πολλές περιοχές του κόσμου.

Η μικροσκοπική παρατήρηση των φυτοπλαγκτονικών δειγμάτων της Λίμνης Παμβώτιδας έδειξε ότι το κυανοβακτηριακό γένος *Microcystis* ήταν κυρίαρχο τους φθινοπωρινούς μήνες καθώς και τον Αύγουστο. Τα νηματοειδή κυανοβακτήρια του γένους *Anabaena* και *Aphanizomenon* ήταν κυρίαρχα τους δυο πρώτους καλοκαιρινούς μήνες. Η μελέτη των παραγόντων της ποιότητας του νερού της Λίμνης Παμβώτιδας, επιβεβαίωσε τον αυξημένο ευτροφισμό της λίμνης. Οι συγκεντρώσεις των εξωκυττάρων μικροκυστινών στη Λίμνη Παμβώτιδα για το έτος 2008 κυμάνθηκαν μεταξύ των τιμών $0.10 \mu\text{g MC-LR eq /l}$ και $8.5 \mu\text{g MC-LR eq /l}$. Οι αντίστοιχες συγκεντρώσεις των ενδοκυττάρων μικροκυστινών κυμάνθηκαν μεταξύ των τιμών $0.87 \mu\text{g MC-LR eq /l}$ και $11.54 \mu\text{g MC-LR eq /l}$. Επίσης, ανιχνεύθηκαν υψηλότερες συγκεντρώσεις συνολικών μικροκυστινών (ενδοκυττάρων και εξωκυττάρων) στους παρόχθιους σταθμούς σε σύγκριση με τους πελαγικούς σταθμούς. Στην παρούσα μελέτη εξετάστηκαν για πρώτη φορά οι περιβαλλοντικοί παράγοντες που συνεισφέρουν στη διαμόρφωση των μικροκυστινών στο νερό ελληνικής λίμνης. Η συνολική συγκέντρωση των μικροκυστινών στη Λίμνη

Παμβώτιδα συσχετίστηκε ισχυρά με τη συγκέντρωση των ορθοφωσφορικών ιόντων, της χλωροφύλλης-α και της φυκοκυανίνης, καθώς και με τη θερμοκρασία του νερού.

Οι ιχθύες του είδους *Rutilus ramosi* της Λίμνης Παμβώτιδας συσσωρεύσαν σημαντική ποσότητα μικροκυστινών στο ήπαρ (288.46 ng MC-LR eq /g-561.13 ng MC-LR eq /g), τους νεφρούς (194.32 ng MC-LR eq /g -542.20 ng MC-LR eq /g), τον εγκέφαλο (206.57 ng MC-LR eq /g - 416.08ng MC-LR eq /g) και τη σάρκα τους (17.30 ng MC-LR eq /g - 20.15ng MC-LR eq /g). Οι παραπάνω συγκεντρώσεις ήταν υψηλότερες κατά τη διάρκεια των θερμών μηνών. Επιπλέον αποδείχθηκε για πρώτη φορά ότι η συσσώρευση των μικροκυστινών στους ιστούς των ιχθύων διέφερε ανάμεσα στις διαφορετικές κλάσεις μήκους των ιχθύων. Οι μικρότερου μεγέθους ιχθύες συσσωρεύσαν υψηλότερες συγκεντρώσεις μικροκυστινών σε σύγκριση με τους μεγαλύτερους ιχθύες.

Οι οργανισμοί της Λίμνης Παμβώτιδας όλων των τροφικών επιπέδων που εξετάστηκαν, συσσωρεύσαν σημαντικές ποσότητες μικροκυστινών. Οι υψηλότερες συγκεντρώσεις συσσωρεύθηκαν στο φυτοπλαγκτόν (502±64 μg MC-LR eq/g D.W.- 2300±105 μg MC-LR eq/g D.W) και στο ζωοπλαγκτόν (80 ±12.3 μg MC-LR eq/g D.W - 152±36.9 μg MC-LR eq/g D.W). Από τους μακροασπόνδυλους οργανισμούς οργανισμούς, υψηλές συγκεντρώσεις ανιχνεύθηκαν στο δίθυρο *Anodonta cygnea* (674.69 ng MC-LR eq /g -1346.98±164.78 ng MC-LR eq /g), στα δεκάποδα *Atyaephyra desmaresti* (749.15±83.61 ng MC-LR eq /g-2050.48 ng MC-LR eq /g) και *Astacus astacus* (113.74 ng MC-LR eq /g -766.99±148 ng MC-LR eq /g), στο γαστερόποδο *Viviparus contectus* (684.96 ng MC-LR eq /g -1074.07 ng MC-LR eq /g) και στο αμφίβιο *Rana epirotica* (68.97 ng MC-LR eq /g -581.46 ng MC-LR eq /g). Ανάμεσα στους ιχθύες, υψηλότερες συγκεντρώσεις ανιχνεύθηκαν στους ιστούς του πλαγκτονοφάγου είδους *Rutilus ramosi* (52.70 ng MC-LR eq /g -1084.14 ng MC-LR eq /g). Αμέσως χαμηλότερες συγκεντρώσεις ανιχνεύθηκαν στους ιστούς των παμφάγων ειδών *Carassius gibelio* (104.00 ng MC-LR eq /g -666.11 ng MC-LR eq /g) και *Cyprinus carpio* (95.78 ng MC-LR eq /g -462.09 ng MC-LR eq /g). Οι χαμηλότερες συγκεντρώσεις

ανιχνεύθηκαν στους ιστούς του σαρκοφάγου ιχθύος *Silurus arlotelis* (39.55 ng MC-LR eq /g -273.64 ng MC-LR eq /g). Για πρώτη φορά υπολογίστηκαν οι δείκτες βιομεγέθυνσης (BMF) των μικροκυστινών σε μεσογειακή λίμνη. Σύμφωνα με τους παραπάνω δείκτες, στη Λίμνη Παμβώτιδα δεν υφίσταται βιομεγέθυνση των μικροκυστινών μέσω της τροφικής αλυσίδας.

Ο έλεγχος της τοξικότητας του κυανοβακτηριακού εκχυλίσματος της Λίμνης Παμβώτιδας μέσω των βιοδοκιμών σε επίμυες έδειξε ότι οι κυανοβακτηριακές αθροίσεις της Λίμνης Παμβώτιδας κατατάσσονται στις πολύ ηπατοτοξικές αθροίσεις ($LD_{50}=35.70 \text{ mg kg}^{-1}$). Η υψηλή τοξική επίδραση του κυανοβακτηριακού εκχυλίσματος της Λίμνης Παμβώτιδας αποδείχθηκε και στους ιχθύες του είδους *Danio rerio*. Οι τοξικές επιδράσεις σχετίζονταν κυρίως με την επιβράδυνση της έναρξης της εκκόλαψης και τη μείωση του ρυθμού εκκόλαψης, τη μειωμένη ανάπτυξη των λαρβών, τη δημιουργία μεγάλου αριθμού παραμορφώσεων και τη μείωση του ρυθμού επιβίωσης των ιχθύων. Το ποσοστό παραμορφώσεων των λαρβών του *Danio rerio* που ανιχνεύθηκε είναι το μεγαλύτερο που έχει καταγραφεί στη διεθνή βιβλιογραφία.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της παρούσας έρευνας και τις οδηγίες του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας, η ενδεχόμενη μελλοντική χρήση των ελληνικών εσωτερικών υδάτινων οικοσυστημάτων ως πηγές πόσιμου νερού συνιστά υψηλό κίνδυνο της δημόσιας υγείας. Όσον αφορά τις ψυχαγωγικές δραστηριότητες που λαμβάνουν χώρα στα οικοσυστήματα που μελετήθηκαν και κατά τη διάρκεια της μελέτης, οι Λίμνες: Καστοριά, Κορώνεια και Παμβώτιδα εντάσσονται στο μεσαίο επίπεδο επικινδυνότητας, ενώ οι Λίμνες: Δοϊράνη, Μικρή Πρέσπα, Πετρών και Ζάζαρη εντάσσονται στο χαμηλό επίπεδο επικινδυνότητας. Στις Λίμνες: Χειμαδίτιδα, Κερκίνη, Λυσιμαχία, Τρικωνίδα, Βεγορίτιδα και Βόλβη η χρήση του νερού τους για ψυχαγωγικές δραστηριότητες δεν εγκυμονεί κινδύνους για την ανθρώπινη υγεία. Επιπλέον, η συχνή κατανάλωση της σάρκας των ιχθύων *Carassius gibelio* από τις Λίμνες: Καστοριά, Κορώνεια, Μικρή Πρέσπα και Παμβώτιδα καθώς και των υδρόβιων οργανισμών της Λίμνης Παμβώτιδας: *Cyprinus carpio*, *Rutilus*

panosi, *Astacus astacus* και *Rana epirotica* συνιστά υψηλό κίνδυνο της δημόσιας υγείας, σύμφωνα με τις οδηγίες του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας. Ο παραπάνω κίνδυνος γίνεται ακόμα πιο απειλητικός για τα παιδιά και τους ηλικιωμένους.

ABSTRACT

Cyanobacteria have been known as natural components of ecosystems since 3 billion years. Nevertheless, cyanobacterial toxicity has been known to humans since 2000 years. Freshwaters of different trophic conditions are the main environments of cyanobacteria. The increased eutrophication and the cyanobacterial blooming can disturb the balance of a lake through many ways, like cyanotoxin production. Cyanotoxins can introduce animal and human health hazards. The most frequent cyanotoxins are the hepatotoxins microcystins and nodularins. The main toxicity mechanism of microcystins is the inhibition of protein phosphates 1 and 2A. The bioaccumulation of microcystins has been detected in aquatic and terrestrial animals.

The aim of the present study is the enrichment of information, related to the presence of microcystin's concentrations in Greek freshwaters and the effect of microcystins on aquatic organisms. The approach of the aim was conducted by a) the detection of microcystin concentrations in different lake waters, b) the detection of microcystin concentrations in tissues of fish species *Carassius gibelio* from different freshwaters, c) the assessment of the environmental parameters, which affect yearly microcystin concentrations in Lake Pamvotis, d) the assessment of different susceptibility in microcystins, among different length classes of fish species *Rutilus rutilus*, e) the determination of seasonally distribution of microcystins in aquatic organisms of Lake Pamvotis, f) the assessment of microcystin biomagnification, g) the investigation of natural cyanobacterial extracts toxicity from Lake Pamvotis, h) the investigation of human health hazards from the presence of microcystins in Greek freshwaters.

Microcystin concentrations were detected in all the studied lakes. The highest values of microcystins were detected in Lake Koronia concerning both concentrations in surface scum (15896 ng MC-LR eq /l) and in water (3748.6 ng MC-LR eq /l). The neighbouring Lake Volvi

had the lowest concentrations in surface scum (1086 ng MC-LR eq /l) and in water (209.56 ng MC-LR eq /l) respectively. Significant concentrations were found in the remaining lakes. The concentrations of microcystins found in Greek freshwaters are comparable of those in other Mediterranean lakes.

High microcystin concentrations were detected in *Carassius gibelio*'s tissues of Lakes: Koronia, Kastoria, Pamvotis, Doirani and Mikri Prespa. Microcystin concentrations were detected in liver (124.4 ±23.4 ng MC-LR eq /g), kidneys (63.3±12.2 ng MC-LR eq /g), brain (43.8±10.2 ng MC-LR eq /g), intestine (35.3±15.7 ng MC-LR eq /g), gonads (9.27±5.2 ng MC-LR eq /g) and muscle (7.1±2.5 ng MC-LR eq /g). High microcystin concentration was detected in brain, for the first time, supporting the possible neurotoxicity of microcystins.

Microcystis, *Anabaena* and *Aphanizomenon* were the dominant cyanobacterial genus in Lake Pamvotis. Aqueous microcystin concentrations (0.10µg MC-LR eq /l - 8.5µg MC-LR eq /l) in Lake Pamvotis, during the year 2008 were lower than cell-bound microcystins (0.87µg MC-LR eq /l -11.54µg MC-LR eq /l). Microcystin concentrations in the littoral zone of Lake Pamvotis were higher than those in pelagic zone. Strong correlations were detected between microcystin concentrations and orthophosphate concentrations, chl-a concentrations, phycocyanin concentrations and water temperature.

Microcystin concentrations were detected in liver (288.46 ng MC-LR eq /g-561.13 ng MC-LR eq /g), kidneys (194.32 ng MC-LR eq /g - 542.20 ng MC-LR eq /g), brain (206.57 ng MC-LR eq /g -416.08ng MC-LR eq /g) and muscle (17.30 ng MC-LR eq /g - 20.15ng MC-LR eq /g) of *Rutilus panosi*. Microcystin concentrations were significant different between the different length classes of *Rutilus panosi*. Bigger-sized fishes accumulated lower microcystin concentrations in comparison to smaller-sized fishes.

All aquatic organisms of Lake Pamvotis accumulated microcystin concentrations. Higher microcystin concentrations were detected in phytoplankton (502±64 µg MC-LR eq/g D.W.- 2300±105 µg MC-LR

eq/g D.W) and zooplankton ($80 \pm 12.3 \mu\text{g MC-LR eq/g D.W} - 152 \pm 36.9 \mu\text{g MC-LR eq/g D.W}$). Significant concentrations were detected in the mussel *Anodonta cygnea* ($674.69 \text{ ng MC-LR eq/g} - 1346.98 \pm 164.78 \text{ ng MC-LR eq/g}$). Lower microcystin concentrations were detected in *Atyaephyra desmaresti* ($749.15 \pm 83.61 \text{ ng MC-LR eq/g} - 2050.48 \text{ ng MC-LR eq/g}$), in *Astacus astacus* ($113.74 \text{ ng MC-LR eq/g} - 766.99 \pm 148 \text{ ng/g}$), in *Viviparus contectus* ($684.96 \text{ ng MC-LR eq/g} - 1074.07 \text{ ng MC-LR eq/g}$) and in *Rana epirotica* ($68.97 \text{ ng MC-LR eq/g} - 581.46 \text{ ng MC-LR eq/g}$). Among fish species, higher microcystins were detected in the planktivorous *Rutilus rutilus* ($52.70 \text{ ng MC-LR eq/g} - 1084.14 \text{ ng MC-LR eq/g}$). Lower concentrations were detected in the omnivorous species *Carassius gibelio* ($104.00 \text{ ng MC-LR eq/g} - 666.11 \text{ ng MC-LR eq/g}$) and *Cyprinus carpio* ($95.78 \text{ ng MC-LR eq/g} - 462.09 \text{ ng MC-LR eq/g}$). Finally, the lowest microcystin concentrations were detected in the carnivorous species *Silurus arctus* ($39.55 \text{ ng MC-LR eq/g} - 273.64 \text{ ng MC-LR eq/g}$). The microcystin biomagnification factors (BMF) were calculated in Lake Pamvotis, for the first time. According to these factors, there was not any biomagnifications of microcystins in Lake Pamvotis.

Bioassay with mice showed that cyanobacterial extracts from Lake Pamvotis were highly toxic ($\text{LD}_{50} = 35.70 \text{ mg kg}^{-1}$). Cyanobacterial extracts from Lake Pamvotis were also toxic to eggs and larvae of *Danio rerio* with adverse effects on hatching rate, survival rate and body and length of *Danio rerio*. Malformations were also observed.

According to results of the present study and according to World Health Organization guidelines, the Greek freshwaters examined should not be used as drinking water source, due to high microcystin concentrations. As it concerns recreational activities, microcystin concentrations in scum of Lakes Chimaditis, Kerkini, Lysimachia, Trichonis, Vegoritida and Volvi pose no risk of adverse health effects. In contrast, higher microcystin concentrations found in scum of Lakes Doirani, Mikri Prespa, Petron and Zazari can pose a low risk of adverse health effects. In addition, microcystin concentrations in

scum of Lakes Kastoria, Koronia and Pamvotis pose a moderate risk of adverse health effects. High fish muscle tissue concentrations of microcystins were found in Lakes Kastoria, Pamvotis, Mikri Prespa and Koronia. According to these concentrations, there would be a significant human health risk, if a 60 kg person consumed a 300 g serving of *C.gibelio*. If we consider the TDI as a recommended limit for a healthy adult, then children, the elderly and sensitive individuals may be at a higher risk.

ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Οικονομίδης Π.Σ., 1992. Ψάρια. Σσ. 41 – 81. σε: Το Κόκκινο Βιβλίο των απειλούμενων σπονδυλόζων της Ελλάδας, Ειδική Έκδοση, Ελληνική Ζωολογική Εταιρία και Ελληνική Ορνιθολογική Εταιρία, Αθήνα.

ΔΙΕΘΝΗΣ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Abbot, M. R.; Powell, T. M.; Richerson, P. J., 1982. The relationship of environmental variability to the spatial patterns of phytoplankton biomass in Lake Tahoe. *Journal of plankton research* 4: 927-941.

Adamovsky O., Kopp R., Hilscherova K., Babica P., Palikov M., Paskova V., Navratil S., Marsalek B. & Blaha L., 2007. Microcystin kinetics (bioaccumulation and elimination) and biochemical responses in common carp (*Cyprinus carpio*) and silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) exposed to toxic cyanobacterial blooms. *Environmental Toxicology and Chemistry* 26, 2687-2693.

Ahn Ch-Y., Chung A.-S., Oh H.-M., 2002. Rainfall, phycocyanin and N:P ratios related to cyanobacterial blooms in a Korean large reservoir. *Hydrobiologia* 474(1-3):117-124.

Albanis, T., Pomonis, P., and Sdoukos, A., 1986. Seasonal fluctuations of organochlorine and triazines pesticides in the aquatic system of Ioannina basin (Greece). *The Science of the Total Environment* 58: 243-253.

Albay M, Akcaalan R, Tufekci H, Metcalf J, Beattie K, Codd G., 2003. Depth profiles of cyanobacterial hepatotoxins (microcystins) in three Turkish freshwater lakes. *Hydrobiologia* 505:89-95.

Amorim, A. & V. Vasconcelos, 1999. Dynamics of microcystins in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Toxicon* 37: 1041-1052.

Anagnostidis K., and Economou-Amilli A., 1980. Limnological studies on Lake Pamvotis (Ioannina), Greece I. *Hydroclimatology*,

- phytoplankton-periphyton with special reference to the valence of some microorganisms from sulphureta as bioindicators. Archives of Hydrobiology 89: 313-342.
- Anagnostidis, K., Komárek, J., 1985. Modern approach to the classification system of cyanophytes. 1- Introduction. Archives of Hydrobiology 71: 291-302.
- Anagnostidis, K., Komárek, J., 1988. Modern approach to the classification system of cyanophytes. 3- Oscillatoriales. Archives of Hydrobiology 80: 327-472.
- Anastasiadou, Ch., A. Koukouras, M. Mavidis, N. Chartosia, Md. Mostakim, M., Christodoulou and Ch., Aslanoglou, 2004. Morphological variation in *Atyaephyra desmarestii* (Millet, 1831) within and among populations over its geographical range. Mediterranean Marine Science 5 (21): 05-13.
- Andersen, R.J., Luu, H.A., Chen, D.Z.X., Holmes, C.F.B., Kent, M.L., Le Blanc, M., Taylor, F.J.R., Williams, D.E., 1993. Chemical and biological evidence links microcystins to salmon 'netpen liver disease'. Toxicon 31: 1315-1323.
- Antonopoulos, A., Kagalou, I., Michaloudi, E., Leonardos, I., 2008. Limnological features of a shallow eutrophic lake (Lake Pamvotis, Greece) with emphasis on zooplankton community structure. Oceanological and Hydrobiological Studies, XXXVII (Suppl. 1): 1-14.
- Apeldoorn van, M.E., van Egmond, H.P., Speijers, G.J.A., Bakker, G.J.I., 2007. Toxins of cyanobacteria. Molecular Nutrition, Food Research 51: 7-60.
- APHA Handbook, Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater Published jointly by American Public Health Association, American Water Works Association, and Water Environment Federation.
- Azevedo, S.M.F.O., Carmichael, W.W., Jochimsen, E.M., Rinehart, K.L., Lau, S., Shaw, G.R., Eaglesham, G.K., 2002. Human

- intoxication by microcystins during renal dialysis treatment in Caruaru, Brazil. *Toxicology* 181-182: 441-446.
- Baganz, D., Staaks, G., Steinberg, C., 1998. Impact of the cyanobacterial toxin, microcystin-LR on behaviour of zebrafish, *Danio rerio*. *Water Research* 32: 948-952.
- Baganz D., Staaks G., Pflugmacher S., Steinberg C.E.W., 2004. Comparative study of microcystin-LR-induced behavioral changes of two fish species, *Danio rerio* and *Leucaspis delineatus*. *Environmental Toxicology* 19:564-70.
- Baker, P.D., Humpage, A.R., 1994. Toxicity associated with commonly occurring cyanobacteria in surface waters of the Murray-Darling basin, Australia. *Australian Journal of Marine Freshwater Research* 45:773-786.
- Baker P.D., Steffensen D.A., Humpage A.R., Nicholson B.C., Falconer I.R., Lanthois B., Fergusson K.M., Saint C.P., 2001. Preliminary evidence of toxicity associated with the benthic cyanobacterium *Phormidium* in South Australia. *Environmental Toxicology* 16:506-511.
- Baldia, S.F., Conaco, M.C.G., Nishijima, T., Imanishi, S., Harada, K.-I. 2003. Microcystin production during algal bloom occurrence in Laguna de Bay, the Philippines. *Fisheries Science* 69:110-116.
- Balık İ, Karaşahin B, Özkök R, Çubuk H and Uysal R, 2003. Diet of silver crucian carp *Carassius gibelio* in Lake Eğirdir. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 3: 87-91
- Basu A, Kozikowski AP, Lazo JS, 1992. Structural requirements of lyngbyatoxin A for activation and downregulation of protein kinase C. *Biochemistry* 31:3824-3830.
- Baqai, A., V. Guruswamy, J. Liu, G. Rizki, and B. R. Speer. Introduction to the Rotifera, University of California Museum of Paleontology, 2000. Retrieved August 7, 2007.
- Beardall, J. & Raven, J. A., 2004. The potential effects of global climate change on microalgal photosynthesis, growth and ecology. *Phycologia* 43:26-41.

- Bell S.G. and Codd G.A., 1994. Cyanobacterial toxins and human health. *Reviews in Medical Microbiology* 5: 256-264.
- Best J.H., Eddy F.B., Codd G.A., 2001. Effects of purified microcystin-LR and cell extracts of *Microcystis* strains PCC 7813 and CYA 43 on cardiac function in brown trout (*Salmo trutta*) Alevins. *Fish Physiology and Biochemistry* 24: 171-178.
- Blomqvist, P., A., Pettersson & P., Hyenstrand, 1994. Ammonium-nitrogen: A key regulatory factor causing dominance of non-nitrogen-fixing cyanobacteria in aquatic systems. *Archives of Hydrobiology* 132: 141-164.
- Boaru, D.A., Dragos, N., Schirmer, K., 2006. Microcystin-LR induced cellular effects in mammalian and fish primary hepatocyte cultures and cell lines: a comparative study. *Toxicology* 218: 134-148.
- Bogutskaya, N.G. & Iliadou, K., 2006. *Rutilus panosi*, a new roach from Western Greece (Teleostei: Cyprinidae). *Zoosystematica Rossica* 14: 293-298.
- Botes, D. P., Wessels, P. L., Kruger, H., Runnegar, M. T. C., Santikarn, S., Smith, R. J., Barna, J. C. J., Williams, D. H. J., 1985. Structural studies on cyanoginosins-LR, -YR, -YA, and -YM, peptide toxins from *Microcystis aeruginosa*. *Journal of the Chemical Society-Perkin Transactions* 1: 2747-2448.
- Böttcher, G., Chorus, I., Ewald, S., Hintze, T., Walz, N., 2001. Lightlimited growth and microcystin content of *Planktothrix agardhii* and *Microcystis aeruginosa* in turbidostats. In: Chorus, I. (Ed.), *Cyanotoxins—Occurrence, Causes, Consequences*. Springer, Berlin, pp. 115-133.
- Brabrand, Ar., 1985. Food of roach (*Rutilus rutilus*) and ide (*Leuciscus idus*): significance of diet shift for interspecific competition in omnivorous fishes. *Oecologia (Berlin)* 66: 461-467.
- Briand JF, Robillot C, Quiblier-Llobe'ras C, Bernard C. 2002. A perennial bloom of *Planktothrix agardhii* (Cyanobacteria) in a

- shallow eutrophic French lake: Limnological and microcystin production studies. *Archives of Hydrobiology* 153:605–622.
- Briand, J.-F., Jacket, S., Bernard, C., Humbert, J.-F., 2003. Health hazards for terrestrial vertebrates from toxic cyanobacteria in surface water ecosystems. *Veterinary Research* 34: 361–377.
- Bryant, D.A., [Ed.] 1994. *The Molecular Biology of Cyanobacteria*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 879 pp.
- Bumke-Vogt, W. Mailahn and I. Chorus, 1999. Anatoxin-a and neurotoxic cyanobacteria in German lakes and reservoirs. *Environmental Toxicology* 14: 117–125.
- Bury, N.R., Eddy, F.B., Codd, G.A., 1995. The effects of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*, the cyanobacterial hepatotoxin microcystin-LR, and ammonia growth rate and ionic regulation of brown trout. *Journal of Fish Biology* 46: 1042–1054.
- Bury, N. R., McGeer, J. C., Eddy, F. B., and Codd, G. A., 1997. Liver damage in brown trout, *Salmo trutta* L., and rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), following administration of the cyanobacterial hepatotoxin microcystin-LR via the dorsal aorta. *Journal of Fish Diseases* 20:209–215.
- Bury, N.R., Newlands, A.D., Eddy, F.B., Codd, G.A., 1998. In vivo and in vitro intestinal transport of H-microcystin-LR, a cyanobacterial toxin, in rainbowtrout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquatic Toxicology* 42:139–148.
- Bwanika, G.N., Makanga, B., Kizito, Y., Chapman, L.J., Balirwa, J., 2004. Observations on the biology of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* L., in two Ugandan crater lakes. *African Journal of Ecology* 42:93–101.
- Carbis C. R., Mitchell G. F., Anderson J. W., McCauley I., 1996a. The effects of microcystins on the serum biochemistry of carp, *Cyprinus carpio* L., when the toxins are administered by gavage, immersion and intraperitoneal routes. *Journal of Fish Diseases*, 19: 151 - 159

- Carbis C.R., Rawlin G.T., Mitchell G.F., Anderson J.W., McCauley I., 1996b. The histopathology of carp, *Cyprinus carpio* L., exposed to microcystins by gavage, immersion and intraperitoneal administration. *J. Fish Dis.* 19: 199-207.
- Carbis, C. R., Rawlin, G. T., Grant, P., Mitchell, G. F., Anderson, J. W., and McCauley, I., 1997. A study of feral carp, *Cyprinus carpio* L., exposed to *Microcystis aeruginosa* at Lake Mokoan, Australia, and possible implications for fish health. *Journal of Fish Diseases* 20: 81-91.
- Carmichael W. W., Biggs D. F., and Peterson M. A., 1979. Pharmacology of anatoxin-a, produced by the freshwater cyanophyte *Anabaena flos-aquae* NRC-44-1. *Toxicon* 17: 229-236.
- Carmichael, W. W., 1986. Algal toxins. *Advances in Botanical Research* 12:47-101.
- Carmichael, W. W. 1988. Toxins of freshwater algae . In : *Handbook of Natural Toxins, Vol. 3 Marine Toxins and Venoms*, pp . 121-147 (Tu, A. T., Ed.). New York: Marcel Dekker.
- Carmichael W.W., 1989. Freshwater cyanobacteria (blue-green algae) toxins. In Ownby CL, Ode1 GV (eds): "Natural Toxins: Characterization, Pharmacology and Therapeutics." Oxford: Pergamon Press, pp 3- 16.
- Carmichael, W.W., 1992. Cyanobacteria secondary metabolites-the cyanotoxins. *Journal of Applied. Bacteriology* 72: 445-459.
- Carmichael, W.W., Falconer, I.R., 1993. Diseases related to freshwater blue-green algal toxins and control measures, in: Falconer, I.R. (Ed.), *Algal Toxins in Seafood and Drinking Water*. Academic Press, London, pp. 187-209.
- Carmichael, W.W., 1995. Cyanobacteria toxin, In: G.M. Hallegraff, D.M. Anderson and A.D. Cembella (Eds.), *Harmful Marine Microalgae*, UNESCO, Paris: 163-175.
- Carmichael, W.W., 1994. The toxins of Cyanobacteria. *Scientific American* 270:78-86.

- Carmichael, W.W., 1995. Cyanobacteria toxin, In: G.M. Hallegraff, D.M. Anderson and A.D. Cembella (Eds.), Harmful Marine Microalgae, UNESCO, Paris: 163- 175.
- Carmichael, W.W., 1997. The Cyanotoxins. In, Advances in Botanical Research 27: 211-255. Academic Press Ltd.
- Carmichael W.W. and An J., 1999. Using an enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) and a protein phosphatase inhibition assay (PPIA) for the detection of microcystins and nodularins. Natural Toxins 7: 377–385.
- Carmichael, W.W., Azevedo, S.M.F.O., An, J.S., 2001. Human fatalities from cyanobacteria: chemical and biological evidence for cyanotoxins (Caruaru syndrome). Environmental Health Perspectives 109: 663-668.
- Carpenter G, Annadotter H, Lawton LA., 1999. The occurrence of toxic blue-green algae in Lake Ringsjön, Southern Sweden, despite nutrient reduction and fish biomanipulation. Hydrobiologia 404:123–129.
- Castenholz, R.W., 2001. Phylum BX. Cyanobacteria. Oxygenic Photosynthetic Bacteria. In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Volume 1: The Archaea and the Deeply Branching and Phototropic Bacteria. Second Edition. G. Garrity, D. R. Boone, and R. W. Castenholz (eds.) Springer-Verlag, New York.
- Cazenave, J., Wunderlin, D.A., Bistoni, M.A., Am´e, M.V., Krause, E., Pflugmacher, S., Wiegand, C., 2005. Uptake, tissue distribution and accumulation of Microcystin-RR in *Corydoras paleatus*, *Jenynsia multidentata* and *Odontesthes bonariensis*. Aquatic Toxicology 75:178–190.
- Chen, T., Wang, Q. S., Cui, J., Yang, W., Shi, Q., Hua, Z. C., Ji, J. G. And Shen, P. P., 2005. Induction of apoptosis in mouse liver by microcystin-LR. A combined transcriptomic, proteomic, and simulation strategy. Molecular Cellular Proteomics 4: 958-974.
- Chen J, Xie P., 2005. Tissue distributions and seasonal dynamics of the hepatotoxic microcystins-LR and -RR in two freshwater

- shrimps. *Palaemon modestus* and *Macrobrachium nipponensis*, from a large shallow, eutrophic lake of the subtropical China. *Toxicon* 45:615–625.
- Chorus, I., Bartram, J., 1999. Toxic Cyanobacteria in Water. First Edition. World Health Organization, E. & F.N. Spon, London and New York, 416p.
- Chorus, I., 2001. Cyanotoxins, occurrence, causes, consequences. Berlin: Springer.
- Chu, F. S., Huang, X., Wei, R. D., and Carmichael, W. W., 1989. Production and characterization of antibodies against microcystin. *Applied Environmental Microbiology* 55, 1928-1933.
- Cihar, J. 1991. A field guide in colour to freshwater fish. Silverdale Books, Leicester.
- Codd, G.A., Bell, S.G., Brooks, W.P., 1989. Cyanobacterial toxins in water. *Water Science and Technology* 21: 1-13.
- Codd and Beattie, K.A., 1991. Cyanobacteria (blue-green algae) and their toxins: awareness and action in the United Kingdom, Public Health Laboratory Service Microbiology Digest 8: 82-86.
- Codd, G.A., Ward, C.J., Bell, S.G., 1997. Cyanobacterial toxins: Occurrence, modes of action, health effects and exposure routes. In: Seiler JP and Vilanova E, (Eds). *Applied Toxicology: Approaches through basic science. Proceedings of the 1996 EUROTOX meeting, Spain. Archiv Toxicol Suppl* 19, Berlin: Springer-Verlag. p. 399-410.
- Codd, G.A., Metcalf, J.S. & Beattie, K.A., 1999. Retention of *Microcystis aeruginosa* and microcystin by salad lettuce (*Lactuca sativa*) after spray irrigation with water containing cyanobacteria. *Toxicon* 37: 1181-1185.
- Codd GA., 2000. Cyanobacterial toxin, the perception of water quality, and the prioritisation if eutrophication control. *Ecological Engineering* 16: 51-60.

- Codd, G. A., Morrison, L. F., Krienitz, L., Ballot, A., 2003. Susceptibility of flamingos to cyanobacterial toxins via feeding, *Veterinary Record* 7: 722–723.
- Codd GA, Lindsay J, Young FM, Morrison LF & Metcalf JS, 2005. Cyanobacterial toxins. *Harmful Cyanobacteria* (Huisman J, Matthijs HCP & Visser PM, eds), pp. 11–23. Springer, Dordrecht
- Cohen P., 1989. The structure and regulation of protein phosphatases. *Annual Reviews of Biochemistry* 58:453–508.
- Conti, A. L., Guerrero, J. M., Regueira, J. M., 2005. Levels of microcystins in two Argentinean reservoirs used for water supply and recreation: differences in the implementation of safe levels. *Environmental Toxicology* 20: 263-269.
- Cook, C., Vardaka, E., & Lanaras, T., 2004. Toxic cyanobacteria in Greek freshwaters, 1997–2000: Occurrence, toxicity and impacts in the Mediterranean region. *Acta Hydrochemistry and Hydrobiology* 32: 107–124.
- Costa, M.S. and Azevedo, S.M.F.O., 1994. Implantacao de um banco de culturas de cianoficeas toxicas. *Iheringia*, 45, 69-74 (in Portuguese).
- Cox, P.A., Banack, S.A., Murch, S.J., Rasmussen, U., Tien, G., Bidigare, R.R., Metcalf, J.S., Morrison, L.F., Codd, G.A., Bergman, B., 2005. Diverse taxa of cyanobacteria produce b-methylamino-L-alanine, a neurotoxic amino acid. *PNAS* 102 (4), 5074–5078.
- Coyle, S.M. and Lawton, L.A., 1996. Development of an extraction procedure for the quantitative analysis of microcystins in cyanobacterial cells. *Phycologia* 35 (6): 57–61.
- Crisman T, Mitraki CH, Zalidis G., 2005. Integrating vertical and horizontal approaches for management of shallow lakes and wetlands. *Ecological Engineering* 24:379–389.
- Cuvin-Aralar, M.L., Fastner, J., Focken, U., Becker, K., Aralar, E.V., 2002. Microcystins in natural blooms and laboratory-cultured

- Microcystis aeruginosa* from Laguna de Bay, Philippines. *Systematic and Applied Microbiology* 25: 179–182.
- Dafis, S., Papastergiadou, E., Georghiou, K., Babalonas, D., Georgiadis, T., Papageorgiou, M., Lazaridou, Th., Tsiaoussi, V., 1996. Directive 92/43/EEC. The Greek habitat project Natura 2000: an overview. The Goulandris Natural History Museum, Greek Biotope/Wetland Centre, Thermi, Greece.
- Daoulas, C., 1981. Contribution to the biology of *Rutilus rubilio* (Bonaparte, 1837) (Pisces, Cyprinidae), in Lake Trichonis (Greece). University of Thessaloniki, Thessaloniki, Hellas, 143p. Doctorate thesis (In Hellenic, with English abstract).
- Daoulas, Ch., Economou, A. N., Psarras, Th. & Barbieri-Tseliki, R., 1993. Reproductive strategies and early development of three freshwater gobies, *Journal of Fish Biology* 42: 749-776.
- Dawson, R.M., 1998. The toxicology of microcystins. *Toxicon* 36 (7): 953–962.
- de Figueiredo DR, Azeiteiro UM, Esteves SM, Goncalves FJ, Pereira MJ., 2004. Microcystin-producing blooms—A serious global public health issue. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 59:151–163.
- DeMott, W.R., Dhawale, S., 1995. Inhibition of in vitro protein phosphatase activity in three zooplankton species by microcystin-LR, a toxin from cyanobacteria. *Archives of Hydrobiology* 134: 417–424.
- Dietrich D, Hoeger S., 2005. Guidance values for microcystins in water and cyanobacterial supplement products (blue-green algal supplements): a reasonable or misguided approach? *Toxicology and Applied Pharmacology* 203:273–289.
- Dillon, W.R., and Goldstein, M., 1984. *Multivariate Analysis. Methods and Applications*. John Wiley and Sons, New York.
- Ding, W., Ong, C., 2003. Role of oxidative stress and mitochondrial changes in cyanobacteria-induced apoptosis and hepatotoxicity. *FEBS Microbiology Letters* 220: 1–7.

- Dittmann, E., Erhard, M., Kaebernick, M., Scheler, C., Neilan, B.A., von Dörhen, H., Börner, T., 2001. Altered expressions of two light-dependent genes in a microcystin-lacking mutant of *Microcystis aeruginosa* PCC 7806. *Microbiology SGM* 147: 3113-3119.
- Dokulil, M.T and Teubner, K., 2000. Cyanobacterial dominance in Lakes. *Hydrobiologia* 438:1-12.
- Douma, M., Ouahid, Y., del Campo F. F., Loudiki, M., Mouhri, Kh., Oudra, B., 2010. Identification and quantification of cyanobacterial toxins (microcystins) in two Moroccan drinking-water reservoirs (Mansour Eddahbi, Almassira). *Environmental Monitoring and Assessment* 160: 439–450 DOI 10.1007/s10661-008-0708-5.
- Duffus, J.F., 1993. World Health Organisation, Geneva, 1979. Agreed terms on health effects evaluation and risk and hazard assessment of environmental agents. Internal report of a working group, (EHE/EHC/79.19) in Glossary for Chemists of Terms used in Toxicology. *Pure and Applied Chemistry* 65 (9): 2003–2122.
- Duy TN, Lam PKS, Shaw GR, and Connell DW., 2000. Toxicology and risk assessment of freshwater cyanobacterial (Blue- Green Algal) toxins in water. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology* 163: 113–186.
- Economidis, P.S., 1991. Check List of freshwater fishes of Greece. Recent status of Threats and Protection. Athens: Hellenic Society for the Protection of Nature. Special Publication, pp. 47.
- Economou, A. N., Daoulas, C. H., Psarras, Th., Barberi-Tseliki, R., 1994. Freshwater larval fish from Lake Trichonis (Greece). *Journal of Fish Biology* 45: 17–35.
- Edward C, Beattice K.A, Scrmgeour and Codd G.A., 1992. Identification of anatoxina in a benthic cyanobacterium (blue-green algae) and in associated dog poisoning at Lochinsh Scotland. *Toxicon* 30:1165 – 1175.

- Egaas E, Sandvik M, Fjeld E, Kallqvist T, Goksoyr A, and Svensen A 1999. Some effects of the fungicide propiconazole on cytochrome P450 and glutathione S-transferase in brown trout (*Salmo trutta*). *Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology* 122:337–344.
- Eie, J. A. & Borgstrøm, R., 1981. Distribution and food of roach (*Rutilus rutilus* (L.)) and perch (*Perca fluviatilis* (L.)) in the eutrophic Lake Arungen, Norway.
- Ernst, B., Hitzfeld, B., Dietrich, D., 2001. Presence of *Planktothrix* sp. and cyanobacterial toxins in Lake Ammersee, Germany, and their impact on whitefish (*Coregonus lavaretus* L.). *Environmental Toxicology* 16 (6): 483–488.
- Ernst B, Dietz L, Hoeger SJ, Dietrich DR., 2005. Recovery of MC-LR in fish liver tissue. *Environmental Toxicology* 20:449–458.
- Ernst, 2008. Investigations on the impact of toxic cyanobacteria on fish- as exemplified by the Coregonids in Lake Ammersee- Dissertation
- Falconer, I. R., Jackson, A. R. B., Langley, J. and Runnegar, M. T., 1981. Liver pathology in mice in poisoning by the blue-green algae *Microcystis aeruginosa*. *Australian Journal of Biological Sciences* 34: 179-187.
- Falconer I.R., M. Dornbusch, G. Moran and S.K. Yeung, 1992. Effect of the cyanobacterial (blue-green algal) toxins from *Microcystis aeruginosa* on isolated enterocytes from the chicken small intestine. *Toxicon* 30:790-793.
- Falconer, I.R., 1993. Mechanism of toxicity of cyclic peptide toxins from blue-green algae. In: Falconer, I.R. (Ed.) *Algal Toxins in Seafood and Drinking Water*, pp. 177–186. London: Academic Press.
- Falconer, I.R., Humpage, A.R., 1996. Tumour promotion by cyanobacterial toxins. *Phycologia* 35: 74–79.

- Falconer IR., 1999. An overview of problems caused by toxic blue-green algae (cyanobacteria) in drinking and recreational water. *Environmental Toxicology* 14:5–12.
- Falconer, I., 2005. Cyanobacterial toxins of drinking water supplies: cylindrospermopsins and microcystins. CRC Press. ISBN 0-415-31879-3. 279 pp.
- Falconer I., 2006. *Cyanobacterial Toxins of Drinking Water Supplies: cylindrospermopsins and microcystins*. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA.
- Fastner, J., Flieger, I. and Neumann, U., 1998. Optimised extraction of microcystins from field samples - a comparison of different solvents and procedures. *Water Research* 32: 3177-3181.
- Fastnera J., Heinzeb R., Humpagec A.R., Mischked U., Eagleshame G.K., Chorus I. 2003. Cylindrospermopsin occurrence in two German lakes and preliminary assessment of toxicity and toxin production of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanobacteria) isolates. *Toxicon* 42:313–321.
- Fawell, J.K., Mitchell, R.E., Everett, D.J., Hill, R.E., 1999a. The toxicity of cyanobacterial toxins in the mouse: I. Microcystin-LR. *Human and Experimental Toxicology* 19: 162-167.
- Fawell, J.K., Mitchell, R.E., Hill, R.E., Everett, D.J., 1999b. The toxicity of cyanobacterial toxins in the mouse: II. Anatoxin-a. *Human and Experimental Toxicology* 19: 168-173.
- Fay, P. and Van Baalen, C. [Eds] 1987. *The Cyanobacteria*. Elsevier, Amsterdam, 534pp.
- Fay, P., 1992. Oxygen relations of nitrogen-fixation in cyanobacteria. *Microbiological Reviews* 56:340-373.
- Ferrão-Filho AS, Kozlowsky-Suzuki B, Azevedo SMFO, 2000. Accumulation of microcystins by a tropical zooplankton community. *Aquatic Toxicology* 59:201–208
- Ferrao-Filho, A.S., Azevedo, S., 2003. Effects of unicellular and colonial forms of toxic *Microcystis aeruginosa* from laboratory

- cultures and natural populations on tropical cladocerans. *Aquatic Ecology* 37: 23-35.
- Finney, D.J., 1948. *Probit Analysis: A Statistical Treatment of the Sigmoid Response Curve*. Cambridge Univ. Press, Cambridge.
- Finney, D.J., 1952. *Probit Analysis*, 2nd ed. University Press, Cambridge, England.
- Fisher, W., & Dietrich, D., 2000. Pathological and biochemical characterization of MC-induced hepatopancreas and kidney damage in carp (*Cyprinus carpio*). *Toxicology and Applied Pharmacology* 73–81.
- Fischer, S. M., Mills, G. D. and Slaga, T. J., 1982. Inhibition of mouse skin tumor promotion by several inhibitors of arachidonic acid metabolism. *Carcinogenesis* 3: 1243-1245.
- Fischer, W.J. and Dietrich, D.R., 2000. Toxicity of the cyanobacterial cyclic heptapeptide toxins microcystin-LR and-RR in early life-stages of the African clawed frog (*Xenopus laevis*). *Aquatic Toxicology* 49: 189–198.
- Fischer W.J., Garthwaite I., Miles C.O., Ross K.M., Aggen J.B., Chamberlin A.R., Towers N.R., Dietrich D.R., 2001. Congener independent immunoassay for microcystins and nodularins. *Environmental Sciences and Technologies* 35: 4849-4856.
- Fischer W.J., Altheimer S., Cattori V., Meier P.J., Dietrich D.R., Hagenbuch B., 2005. Organic anion transporting polypeptides expressed in liver and brain mediate uptake of microcystin. *Toxicology and Applied Pharmacology* 203: 257–263.
- Flett, D.J. and Nicholson, B.C., 1991. *Toxic Cyanobacteria in Water Supplies: Analytical Techniques*, Urban Water Research Association of Australia, Research Report No. 26. Melbourne, Australia: Urban Water Research Association of Australia.
- Fogg, G.E., W.D.P Stewart, P. Fay and A.E. Walsby, 1973. *The blue-green algae*. Academic.
- Fournie, J.W., Courtney, L.A., 2002. Histopathological evidence of regeneration following hepatotoxic effects of the cyanotoxin

- microcystin-LR in the hardhead catfish and gulf killifish. *Journal of Aquatic Animal Health* 14: 273–280.
- Francis, G. 1878. Poisonous Australian lake. *Nature* 18: 11-12.
- Fromme, H., Koehler, A., Krause, R., Fuehring, D., 2000. Occurrence of cyanobacterial toxins-microcystins and anatoxin-a-in Berlin water bodies with implications to human health and regulations. *Environmental Toxicology* 15: 120– 130.
- Frost, Darrel R., Taran Grant, Julián Faivovich, Raoul H. Bain, Alexander Haas, Célio F.B. Haddad, Rafael O. De Sá, Alan Channing, Mark Wilkinson, Stephen C. Donnellan, Christopher J. Raxworthy, Jonathan A. Campbell, Boris L. Blotto, Paul Moler, Robert C. Drewes, Ronald A. Nussbaum, John D. Lynch, David M. Green, Ward C. Wheeler, 2006. "The Amphibian Tree of Life". *Bulletin of the American Museum of Natural History* 297: 1–291. doi:10.1206/0003-0090.
- Fulton, R. S. 111 & H. W. Pearl., 1987. Toxic and inhibitory effects of the blue-green alga *Microcystis aeruginosa* on herbivorous zooplankton. *Journal of Plankton Research* 9: 837-855.
- Gallon, J. R., 2001. N₂ fixation in phototrophs: Adaptation to a specialized way of life. *Plant Soil* 230: 39–48.
- Garton, D.W., and W.R. Haag. 1993. Seasonal reproductive cycles and settlement patterns of *Dreissena polymorpha* in western Lake Erie, p. 111-128. In T.F. Nalepa and D.W. Schloesser [ed.] *Zebra mussels: biology, impacts, and control*. Lewis Publishers, Boca Raton, Fla.
- Genitsaris S., Kormas K.A., Moustaka-Gouni M., 2009. Microscopic eukaryotes living in a dying lake (Lake Koronia, Greece). *FEMS Microbiol Ecology* 69:75-83.
- Ge'rrard, C., Brient, L., Rouzic, B.L., 2005. Variation in the response of juvenile and adult gastropods (*Lymnaea stagnalis*) to cyanobacterial toxin (microcystins-LR). *Environmental Toxicology* 20: 592–596.

- Ghazali Issam, Saqrane Sanaa, Carvalho Antonio Paulo, Ouahid Youness, Oudra Brahim, Del Campo Francisca Fernandez and Vasconcelos Vitor, 2009. Compensatory Growth Induced in Zebrafish Larvae after Pre-Exposure to a *Microcystis aeruginosa* Natural Bloom Extract Containing Microcystins International Journal of Molecular Sciences 10: 133-146.
- Gilbert, J.J., 1994. Susceptibility of planktonic rotifers to a toxic strain of *Anabaena flos-aquae*. Limnology and Oceanography 39: 1286-1297.
- Gkelis, S., Michaloudi, E., Vardaka, E., Katsiapi, M., Pantelidakis, K., Lanaras, T., Moustaka-Gouni, M., 2004. Lakes Volvi-Koronia: Stability? 1st Symposium of the Environmental Council, Aristotle University of Thessaloniki, 11-13 November [in Greek].
- Gkelis, S., Harjunpa, V., Lanaras, T., & Sivonen, K., 2005. Diversity of Hepatotoxic Microcystins and Bioactive Anabaenopeptins in Cyanobacterial Blooms from Greek Freshwaters. Environmental Toxicology 20(3): 249–256.
- Gkelis, S., 2005. Characterisation of planktic cyanobacteria and their bioactive peptides. Doctoral Dissertation, Aristoteleio University of Thessaloniki, Thessaloniki, Greece.
- Gkelis, S., T. Lanaras, Sivonen K., 2006. The presence of microcystins and other cyanobacterial bioactive peptides in aquatic fauna collected from Greek freshwaters. Aquatic Toxicology 78(1): 32-41.
- Golubic, S., Sergeev, V.N. & Knoll, A.H., 1995. Mesoproterozoic *Archaeoellipsoides*: akinetes of heterocystous cyanobacteria. Lethaia, 28:285-298.
- Gorham P.R., 1962. The toxin produced by waterblooms of the blue-green algae. American Journal of Public Health 52: 2100–2105.
- Gorham PR. Carmichael WW., 1988. Hazards of freshwater blue-green algae (cyanobacteria). In Lembi CA, Waaland JR (eds.): “Algae and Human Affairs.” Cambridge: Cambridge University Press, pp 403-43.

- Graf, D., Cummings, K., 2007. Review of the systematics and global diversity of freshwater mussel species (Bivalvia: Unionoida). *Journal of Molluscan Studies* 73: 291–314.
- Graham, J.L., Jones, J.R., Jones, S.B., Downing, J.A., Clevenger, T.E. 2004. Environmental factors influencing microcystins distribution and concentration in the Midwestern United States. *Water research* 38: 4395-4404.
- Gras, R., A. Iltis, and L. Saint-Jean, 1971. Biologie des crustacés du Lac Tchad II Régime alimentaire des entomostracés planctoniques.-Cah. O.R.S.T.O.M. ser. Hydrobiologia 5: 285-296.
- Gromov B.V., Vepritsky A.A., Mamkaeva K.A., Voloshko L.N., 1996. A survey of toxicity of cyanobacterial blooms in Lake Ladoga and adjacent water bodies. *Hydrobiologia* 322:149–151.
- Gross, E.M., 2003. Allelopathy of aquatic autotrophs. *Critical Reviews in Plant Sciences* 22 (3–4): 313–339.
- Haande, S., 2008. On the Ecology, Toxicology, and Phylogeny of Cyanobacteria in Murchison Bay of Lake Victoria, Uganda. Ph.D thesis. University of Bergen, Bergen.
- Habdija, I., Latjner, J., Belinic, I., 1995. The contribution of gastropod biomass in macrobenthic communities of a karstic river. *International Reviews Ges. Hydrobiology* 80: 103–110.
- Hadjibiros, K., Economidis, P.S. and Koussouris, T., 1997. The ecological condition of major Greek rivers and lakes in relation to environmental pressures - Country paper of Greece. *Proceedings of the Fourth EurAqua Technical Review: Let the fish speak: The quality of aquatic ecosystems as an indicator for sustainable management*, pp. 103-123. European Network of Freshwater Research Organisations (EurAqua), Koblenz.
- Hawkins P.R., Novic S., Cox P., Neilan B.A., Burns B.P., Shaw G., Wickramasinghe W., Peerapornpisal Y., Ruangyuttikarn W., Itayama T., Saitou T., Mizuochi M., Inamori Y., 2005. A review of analytical methods for assessing the public health risk from

- microcystin in the aquatic environment. *Journal of Water Supply: Research and Technology - Aqua*. 54: 509-518.
- Hayes, A., 'Principles and Methods of Toxicology', Taylor and Francis, 4th Ed, 2001, Chapter 18
- Hayman J., 1992. Beyond the Barcoo: probable human cyanobacterial poisoning in outback Australia. *Medical Journal of Australia* 157: 794-796.
- Hendrickx, M.E., 1995. Cangrejos. pp. 565-636. *In* W. Fisher, F. Krupp, W. Schneider, C. Sommer, K.E. Carpenter y V.H. Niem (eds.). *Guía FAO para la identificación de especies para los fines de la pesca. Pacífico centro-Oriental. Vol. 1. Plantas e Invertebrados*. Roma, Italia.
- Henriksen, P., 1996. Microcystin profiles and contents in Danish populations of cyanobacteria/blue-green algae as determined by HPLC, *Phycologia*, 35(6): 102-110.
- Hesse, K., Dittmann, E., and Börner, T., 2001. Consequence of impaired microcystin production for light-dependent growth and pigmentation of *Microcystis aeruginosa* PCC 7806. *FEMS Microbiology and Ecology* 37: 39-43.
- Hesse, K., and J.-G. Kohl., 2001. Effects of light and nutrient supply on growth and microcystin content of different strains of *Microcystis aeruginosa* p. 152-158. *In* I. Chorus (ed.), *Cyanotoxins: occurrence, causes, consequences*. Springer-Verlag KG, Berlin, Germany.
- Hill, A.J., Teraoka, H., Heideman, W., Peterson, R.E., 2005. Zebrafish as a model vertebrate for investigating chemical toxicity. *Toxicological Sciences* 86: 6-19.
- Hirooka, M.H.P. Pinotti, T. Tsutsumi, F. Yoshida and Y. Ueno, 1999. Survey of microcystins in water between 1995 and 1996 in Parana, Brazil using ELISA. *Natural Toxins* 7 (3):103-109.
- Hitzfeld, B.C., Höger, S.J., Dietrich, D.R., 2000. Cyanobacterial toxins: removal during drinking water treatment and risk assessment. *Environmental Health Perspectives* 108: 113-122.

- Hoeger, S.J., Hitzfeld, B.C., Dietrich, A.M., 2005. Occurrence and elimination of cyanobacterial toxins in drinking water treatment plants. *Toxicology and Applied Pharmacology* 203: 231–242.
- Hoek, C. van den, Mann, D.G and Jahns, H.M. [Eds] 1995 *Algae. An Introduction to Phycology*. Cambridge University Press, Cambridge, 623 pp.
- Holcik J., 1980. Possible reason of the expansion of *Carassius auratus* Linnaeus, 1758 Teleostei, Cyprinidae in the Danube River Basin. *Int. Revue ges. Hydrobiologie* 65: 673-79.
- Hollows, J.W., Townsend, C.R., and Collier, K.J., 2002. Diet of the crayfish *Paranephrops zealandicus* in bush and pasture streams: insights from stable isotopes and stomach analysis. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research* 36: 129-142.
- Holte HR, Eriksen S, Skulberg O, Pal Aas, 1998. The effect of water soluble cyanotoxin(s) produced by two species of *Anabena* on the release of acetylcholine from the peripheral cholinergic nervous system of the rat airway. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 5:51–59.
- Honkanen, R. E., Zwillers, J., Moore, R. A., Daily, S. L., Khatra, B. S., Dukelow, M. and Boynton, A. L., 1990. Characterization of microcystin-LR, a potent inhibitor of type 1 and type 2A protein phosphatases. *Journal of Biological Chemistry* 265: 19401-19404.
- Horppila, J. & Peltonen, H., 1994. The fate of a roach *Rutilus rutilus* stock under an extremely strong fishing pressure and its predicted development after the cessation of mass removal. *Journal of Fish Biology* 45, 777–786.
- Horst, Janus, 1965. *The young specialist looks at land and freshwater molluscs*. Burke, London.
- Hoshinoh, Miwa M ., Fujikhi and Sugimurat A., 1980. Aggregation of human lymphoblastoid cells by tumor promoting phorbol esters. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 95: 842-848.

- Hotto A, Satchwell M, Boyer G., 2005. Seasonal production and molecular characterization of microcystins in Oneida Lake, New York, USA. *Environmental Toxicology* 20:243–248.
- Hotto, A.M., Satchwell, M.F., Berry, D.L., Gobler, C.J., Boyer, G.L., 2008. Spatial and temporal diversity of microcystins and microcystin-producing genotypes in Oneida Lake, NY. *Harmful Algae* 7 (5): 671–681.
- Huisman Jef, Hans C.P Matthijs and Petra Visser, 2005. *Harmful Cyanobacteria*, Aquatic Ecology Series, Springer.
- Humpage AR, Hardy SJ, Moore EJ, Froscio SM, Falconer IR., 2000. Microcystins (cyanobacterial toxins) in drinking water enhance the growth of aberrant crypt foci in the mouse colon. *Journal of Toxicology and Environmental Health A* 61(3):155–165.
- Huynh-Delerme, C., Edery, M., Huet, H., Puiseux-Dao, S., Bernard, C., Fontaine, J.J., Crespeau, F., de Luze, A., 2005. Microcystin-LR and embryo-larval development of medaka fish, *Oryzias latipes*. I. Effects on the digestive tract and associated systems. *Toxicology* 46(1):16-23.
- Ibelings, B.W., Bruning, K., de Jonge, J., Wolfstein, K., Dionisio, P.L.M., Postma, J., Burger, T., 2005. Distribution of microcystins in a lake foodweb: no evidence for biomagnification. *Microbial Ecology* 49(4):487-500.
- Iliadou, K.; Ondrias, I., 1986. Biology and morphology of *Parasilurus aristotelis* (Agassiz, 1856) (Pisces Cypriniformes, Siluridae) in lakes Lysimachia and Trichonis of western Greece. *Biol. Gallo-Hellenica* 11, 207–238 (in Greek).
- Ishikawa K., Kumagai M., Vincent W.F., Tsujimura S., Nakahara H., 2002. Transport and accumulation of bloom-forming cyanobacteria in a large, mid-latitude lake: the gyre-Microcystis hypothesis. *Limnology* 3:87–96.
- Izydorczyk K., Tarczynska M., Jurczak T., Mrówczyński J., Zalewski M., 2005. Measurement of phycocyanin fluorescence as an online

- early warning system for cyanobacteria in reservoir intake water. *Environmental Toxicology* 20:425–30.
- Izydorczyk K., Carpentier C., Mrówczyński J., Wagenvoort A., Jurczak T., Tarczynska M., 2009. Establishment of an Alert Level Framework for cyanobacteria in drinking water resources by using the Algae Online Analyser for monitoring cyanobacterial chlorophyll-a. *Water Research* 1–8, doi:10.1016/j.watres.2008.11.048.
- Jacoby J.M., Collier D.C., Welch E.B., Hardy F.J., Crayton M., 2000. Environmental factors associated with a toxic bloom of *Microcystis aeruginosa*. *Canadian Journal of Fish Aquatic Science* 57:231–240
- Jacquet, C., Thermes, V., Luze, A.D., Puiseux-Dao, S., Bernard, C., Joly, J.S., Bourrat, F., Edery, M., 2004. Effects of microcystin-LR on development of medaka fish embryo (*Oryzias latipes*). *Toxicol* 43: 141–147.
- Janse I., Kardinaal W.E., Agterveld M.K., 2005. Contrasting microcystin production and cyanobacterial population dynamics in two *Planktothrix*-dominated freshwater lakes. *Environmental Microbiology* 7:1514–1524.
- Jeffrey, S. W., Humphrey, G. F., 1975. New spectrophotometric equations for determining chlorophylls a, b, c, and c2 in higher plants, algae and natural phytoplankton. *Biochem. Physiol. Pfl.* 167: 191-194.
- Jochimsen E.M., Carmichael W.W., An J.S., Cardo D.M., Cookson S.T., Holmes C.E., Antunes M.B., de Melo Filho D.A., Lyra T.M., Barreto V.S., Azevedo S.M., Jarvis W.R., 1998. Liver failure and death after exposure to microcystins at a hemodialysis center in Brazil. *New England Journal of Medicine* 338:873–878.
- Kaebnick, M., Neilan, B.A., Börner, T., Dittman, E., 2000. Light and the transcriptional response of the microcystin biosynthesis gene cluster. *Applied and Environmental Microbiology* 66 (8): 3387–3392.

- Kaebernick, M., Neilan, B.A., 2001. Ecological and molecular investigations of cyanotoxin production. *FEMS Microbiology and Ecology* 35: 1–9.
- Kagalou I, Tsimarakis G, Patsias A., 2001. Phytoplankton dynamic and physicochemical features in Lake Pamvotis. *Fresenius Environmental Bulletin* 10:845–849.
- Kagalou, I., G. Tsimarakis, and E. Bezirtzoglou., 2002. Interrelationships between bacteriological and chemical variations in Lake Pamvotis-Greece. *Microbial Ecology in Health and Disease* 14:37–41.
- Kagalou, I., Papastergiadou, E., Tsimarakis, G., & Petridis, D., 2003. Evaluation of the trophic state of Lake Pamvotis Greece, a shallow urban Lake. *Hydrobiologia* 506–509:745–752.
- Kagalou, I., Papadimitriou, T., Bacopoulos, V., Leonardos, I., 2008. Assessment of microcystins in lake water and the omnivorous fish (*Carassius gibelio*, Bloch) in Lake Pamvotis (Greece) containing dense cyanobacterial bloom. *Environmental Monitoring and Assessment* 137:185–195.
- Kagalou, I. and Leonardos, I., 2009. Typology, classification and management issues of Greek lakes: implication of the Water Framework Directive (2000/60/EC). *Environmental Monitoring and Assessment* 150: 469-484.
- Kameyama K., Sugiura N., Isoda H., Maekawa T., 2002. Effect of nitrate and phosphate concentration on production of microcystins by *Microcystis viridis* NIES-102. *Aquatic Ecology and Health Management* 5:443– 449.
- Kamjunke N., Mendonca R., Hardewig I. and Mehner T., 2002a. Assimilation of different cyanobacteria as food and the consequences for internal energy stores of juvenile roach. *Journal of Fish Biology* 60: 731–738.
- Kamujunke, N., K. Schmidt, S. Pflugmacher & T. Mehner, 2002b. Consumption of cyanobacteria by roach (*Rutilus rutilus*) useful or harmful to the fish? *Freshwater Biology* 47: 243–250.

- Khan Tariq, 2003. Dietary studies on exotic carp (*Cyprinus carpio* L.) from two lakes of western Victoria, Australia. *Aquatic Science* 65: 272–286.
- Kankaanpaa, H., Holliday, J., Schroder, K., Goddard, T., von Fister, R., & Carmichael, W., 2005. Cyanobacteria and prawn farming in northern New South Wales, Australia – A case study on cyanobacteria diversity and hepatotoxin bioaccumulation. *Toxicology and Applied Pharmacology* 203: 243–256.
- Karandinos M., & L., Paraschos, 1992. *The Red Data Book of Threatened Vertebrates of Greece*, Hellenic Zoological Society.
- Karjalainen M., Reinikainen M., Spoo L., Meriluoto J.A.O., Sivonen K., 2005. Trophic transfer of cyanobacterial toxins from zooplankton to planktivores: Consequences for pike larvae and mysid shrimps. *Environmental Toxicology* 20(3): 354–362.
- Kato Y. and Scheuer P. J., 1974. Aplysiatoxin and debromoaplysiatoxin, constituents of the marine mollusk *Stylocheilus longicauda* (Quoy and Gaimard, 1824). *Journal of the American chemical Society* 96: 2245–2246.
- Kehr, J. C., Y. Zilliges, A. Springer, M. D. Disney, D. D. Ratner, C. Bouchier, P. H. Seeberger, N. Tandeau de Marsac & E. Dittmann, 2006. A mannan binding lectin is involved in cell–cell attachment in a toxic strain of *Microcystis aeruginosa*. *Molecular Microbiology* 59: 893–906.
- Keil, C., Forchert, A., Fastner, J., Szewzyk, U., Chorus, I., Krätke, R., 2002. Toxicity and microcystin content of extracts from a *Planktothrix* bloom and two laboratory strains. *Water Research* 36:2133–2139.
- Kent, M. L., 1990. Netpen liver disease (NLD) of salmonid fishes reared in sea water; species susceptibility, recovery, and probable cause. *Dis. aquat. Organisms* 8: 21–28 .
- Kiesecker, J. M., Blaustein, A. R., and Belden, L. K., 2001. Complex causes of amphibian population declines. *Nature* 410: 681–684.

- Kimmel, C. B., Ballard, W. W., Kimmel, S. R., Ullmann, B., and Schilling, T. F., 1995. Stages of embryonic development of the zebrafish. *Developmental Dynamics* 203:253–310.
- Klaassen C.D., Watkins J.B., 1984. Mechanisms of bile formation, hepatic uptake, and biliary excretion. *Pharmacological Reviews* 36:1–67.
- Komarek, J., Anagnostidis, K., 1986. Modern approach to the classification system of cyanophytes. 2- Chroococales. *Archives of Hydrobiology* 73: 157-226.
- Komarek, J., Anagnostidis, K., 1989. Modern approach to the classification system of cyanophytes. 4- Nostocales. *Archives of Hydrobiology* 82: 247-345.
- Konopka, A., 1982. Physiological ecology of a metalimnetic *Oscillatoria rubescens* population. *Limnology and Oceanography* 27: 1154–1161.
- Kopp R., Heteša J., 2000. Changes of haematological indices of juvenile carp (*Cyprinus carpio* L.) under the influence of natural populations of cyanobacterial water blooms, *Acta Veterinaria Brno* 69:131-137.
- Kopp D., Cucherousset J., Syväranta J., Martino A., Céréghino R., Santoul F., 2009. Trophic ecology of the pikeperch (*Sander lucioperca*) in its introduced areas: a stable isotope approach in southwestern France. *Comptes Rendus Biologies* 332: 741–746.
- Kotak B.G., Lam A.K.-Y, Prepas E.E., 1995. Variability of the hepatotoxin microcystin-LR in hypereutrophic drinking water lakes. *Journal of phycology*, 31:248-263.
- Kotak, B.J., Semalulu, S., Friytz, D.L., Prepas, E.E., Hrudey, S.E., Coppock, R.W., 1996. Hepatic and renal pathology of intraperitoneally administered microcystin-LR in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Toxicon* 34: 517–525.
- Kotak B.G., Lam A.K.-Y, Prepas E.E., Hrudey S.E., 2000. Role of chemical and physical variables in regulating microcystin-LR

- concentration in phytoplankton of eutrophic lakes. *Canadian Journal of Fish Aquatic Science* 57:1584–1593.
- Kottelat, M., 1997. European Freshwater Fishes. *Biologia* 52(5): 1-271.
- Kottelat M., Freyhof J., 2007. Handbook of European Freshwater Fishes. Kottelat, Cornol, Switzerland and Freyhof, Berlin, Germany, pp 660
- Kotti, M., Vlessidis, A., Evmiridis, N., 2000. Determination of phosphorous and nitrogen in the sediment of Lake Pamvotis (Greece). *International Journal of Environmental Analytical Chemistry* 78(3–4): 455–467.
- Koussouris, T., Diapoulis, A., Balopoulos, E., 1989. Assessing the trophic status of Lake Mikri Prespa, Greece. *Annals of Limnology* 25: 3:17-24.
- Krienitz, L., Ballot, A., Kotut, K., Wiegand, C., Puetz, S., Metcalf, J.S., Codd, G.A., Pflugmacher, S., 2003. Contribution of hot spring cyanobacteria to the mysterious deaths of Lesser Flamingos at Lake Bogoria, Kenya. *FEMS Microbiology Ecology* 43: 141– 148.
- Kuiper-Goodman, T., Falconer, I., Fitzgerald, J., 1999. Human health aspects. In: Chorus, I., Bartram, J., (Eds). *Toxic Cyanobacteria in Water*. World Health Organization, E & FN Spon, London and New York, pp. 113-153.
- Kurmayer, R., Jüttner, F., 1999. Strategies of the coexistence of zooplankton with the cyanobacterium *Planktothrix rubescens* in Lake Zürich. *Journal of Plankton Research* 21: 659–683.
- Kurmayer, R., Dittman, E., Fastner, J., Chorus, I., 2002. Diversity of microcystin genes within a population of the toxic cyanobacterium *Microcystis* spp in Lake Wannsee (Berlin, Germany). *Microbiology Ecology* 43: 107–118.
- Kurmayer, R., Christiansen, G., Chorus, I., 2003. The abundance of microcystin-producing genotypes correlates positively with colony size in *Microcystis* sp. and determines its microcystin net

- production in Lake Wannsee. *Applied and Environmental Microbiology* 69 (2): 787–795.
- Lam A.K.-Y., Fedorak P.M. & Prepas E.E., 1995. Biotransformation of the cyanobacterial hepatotoxin microcystin-LR, as determined by HPLC and protein phosphatase bioassay. *Environmental Science and Technology* 29: 242-246.
- Lammer, E., Carr, G.J., Wendler, K., Rawlings, J.M., Belanger, S.E., Braunbeck, T., 2009. Is the fish embryo toxicity test (FET) with the zebrafish (*Danio rerio*) a potential alternative for the fish acute toxicity test? *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C, Toxicology* 149: 196–209.
- Lampert, W., 1982. Further studies on the inhibitory effect of the toxic blue-green *Microcystis aeruginosa* on the filtering rate of zooplankton. *Archives of Hydrobiology* 95: 207-220.
- Lampert W., 1987. Laboratory studies on zooplankton– cyanobacterial interactions. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research* 21: 483–490.
- Lanaras T., Tsitsamis S., Chlichlia C., Cook CM, 1989. Toxic cyanobacteria in Greek freshwaters. *Journal of Applied Phycology* 1: 67–73.
- Lawton L. A., Edwards C. and Codd G. A., 1994a. Extraction and high-performance liquid chromatographic method for the determination of microcystins in raw and treated waters. *Analyst* 119: 1525-1530.
- Lawton, L. A., Beattie, K. A., Hawser, S. P., Campbell, D. L., & Codd, G. A., 1994b. Evaluation of assay methods for the determination of cyanobacterial hepatotoxicity. In G. A. Codd, T. M. Jeffries, C.W. Keevil, & E. Potter (Eds.), *Detection methods for cyanobacterial toxins* (pp. 111–116). Cambridge: The Royal Society of Chemistry.
- Lecoz, N., Malcot, M., Quiblier, C., Puiseux-Dao, S., Bernard, C., Crespeau, F., Edery, M., 2008. Effects of cyanobacterial crude extracts from *planktothrix agardhii* on embryo-larval development of medaka fish, *Oryzias latipes*. *Toxicon* 51 (2): 262–269.

- Le Cren ED (1978) Key to Species (2nd edn). The Ferry House, Surrey, England.
- Lee SJ, Jang M-H, Kim H-S, Yoon B-D, Oh H-M., 2000. Variation of microcystin content of *Microcystis aeruginosa* relative to medium N:P ratio and growth phase. *Journal of Applied Microbiology* 89:323–329
- Legrand, C., Rengefors, K., Fistarol, G. O. & Graneli, E., 2003. Allelopathy in phytoplankton—biochemical, ecological and evolutionary aspects. *Phycologia* 42:406–19.
- Leeuwangh, P., Kappers, F.I., Dekker, M. and Koerselman, W., 1983. Toxicity of cyanobacteria in Dutch lakes and reservoirs. *Aquatic Toxicology* 4: 63-72.
- Leonardos, I.D., 2001. Ecology and exploitation pattern of a landlocked population of sand smelt, *Atherina boyeri* (Risso, 1810) in Trichonis lake (Western Greece). *Journal of Applied Ichthyology* 17: 262-266.
- Leonardos, I., Kagalou, I., Triantafyllidis, A. & Sinis, A., 2005. The biological adaptations of a protected fish species in two Greek lakes exhibiting different pollution degree and trophic state. *Journal of Freshwater Ecology* 20: 715–722.
- Leonardos, I., Kagalou, I. & Triantafyllidis, A., 2007. Threatened fishes of the world: *Silurus aristotelis* (Agassiz, 1856) (Siluridae). *Environmental Biology of Fishes* 78: 285–286.
- Leonardos I, Kagalou I, Tsoumani M., Economidis P., 2008. Fish fauna in a Protected Greek lake: biodiversity, introduced fish species over a 80-year period and their impacts on the ecosystem. *Ecology of Freshwater Fish* 17: 165–173.
- Leonardos. D. I A. C. Tsikliras, I. Batzakas, A. Ntakis and V. Liouisia, 2009. Life-history characteristics of the endangered Aristotlelis catfish (*Silurus aristotelis* Garman, 1890), Lake Pamvotis, north-western Greece. *Journal of Applied Ichthyology* 25: 746–751.
- Li RH, Carmichael WW, Brittain S, Eaglesham GK, Shaw GR, Liu YD, Watanabe MM., 2001. First report of the cyanotoxins

- cylindrospermopsin and deoxycylindrospermopsin from *Raphidiopsis curvata* (cyanobacteria). *Journal of Phycology* 37:1121–1126.
- Li, X., Liu, Y., Song, L., Liu, J., 2003. Responses of antioxidant systems in the hepatocytes of common carp (*Cyprinus carpio* L.) to the toxicity of microcystin-LR. *Toxicon* 42: 85–89.
- Li, L., Xie, P., and Chen, J., 2007. Biochemical and ultrastructural changes of the liver and kidney of the phytoplanktivorous silver carp feeding naturally on toxic *Microcystis* blooms in Taihu Lake, China. *Toxicon* 49: 1042–53.
- Liu, B.-H., Yu, F.-Y., Huang, X., Chu, F.F., 2000. Monitoring of microcystin-protein phosphatase adduct formation with immunochemical methods. *Toxicon* 38 (5): 619–632.
- Liu, I., Lawton, L., Cornish, B., Robertson, P.K.J., 2002. Mechanistic and toxicity studies of the photocatalytic oxidation of microcystin-LR. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* 148: 349–354.
- Long, B. M., Jones, G. J. and Orr, P. T., 2001. Cellular microcystin content in N-limited *Microcystis aeruginosa* can be predicted from growth rate. *Applied and Environmental Microbiology* 67: 278–283.
- 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 Letters* 264: 187-192.
- Magalhães, V. F., Soares, R., & Azevedo, S., 2001. Microcystin contamination in fish from the Jacarepagua Lagoon (Rio de Janeiro, Brazil): Ecological implication and human health risk. *Toxicon* 39: 1077–1085.
- Malbrouck, C., Kestemont, P., 2006. Effects of microcystins on fish. *Environmental Toxicology and Chemistry* 25: 72–86.
- María VA, Díaz MP, Wunderlin DA, 2003. Occurrence of toxic cyanobacteria blooms in San Roque Reservoir (Cordoba,

- Argentina): a field and chemometric study. *Environmental Toxicology* 18:192–201.
- Mars̃a'lek B, Bla'ha L, Tura'nek J, Neca J., 2001. Microcystin-LR and total microcystin in cyanobacterial blooms in the Czech Republic 1993–1998. In: Chorus I, editor. *Cyanotoxins*. Berlin: Springer. p 56–62.
- Martins J.C., Vasconcelos V.M., 2009. Microcystin dynamics in aquatic organisms. *Journal of Toxicology and Environmental Health* 12:65–82.
- Mathison, J.C., and Ulevitch, R., 1979. The clearance, tissue distribution, and cellular localization of intravenously injected lipopolysaccharide in rabbits. *Journal of Immunology* 123:2133–2143.
- Mathys, W., Surholt, B., 2004. Analysis of microcystins in freshwater samples using high performance liquid chromatography and an enzyme-linked immunosorbent assay. *International Journal of Hygiene and Environmental Health* 207: 601–605.
- Mayer, C. M. and Wahl, D. H., 1997. The Relationship between Prey Selectivity and Growth and Survival in a Larval Fish. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 54: 1504–1512.
- Meier-Abt, F., Hammann-Hanni, A., Stieger, B., Ballatori, N., Boyer, J.L., 2007. The organic anion transport polypeptide 1d1 (Oatp1d1) mediates hepatocellular uptake of phalloidin and microcystin into skate liver. *Toxicology and Applied Pharmacology* 218: 274–279.
- Menon, A.G.K., 1999. Check list — fresh water fishes of India. *Rec. Zool. Surv. India. Misc. Publ., Occas. Pap.* 175 (366): 234–259.
- Meriluoto. J.A.O. and J.E. Eriksson, 1988. Rapid analysis of peptide toxins in cyanobacteria. *Journal of Chromatography* 438: 93–99.
- Metcalf, J.S., Beattie, K.A., Pflugmacher, S., Codd, G.A., 2000. Immunocrossreactivity and toxicity assessment of conjugation products of the cyanobacterial toxin, microcystin-LR. *FEMS Microbiology Letters* 189: 155–158.

- Metcalf, J.S., Banack, S.A., Lindsay, J., Morrison, L.F., Cox, P.A., Codd, G.A., 2008. Cooccurrence of b-N-methylamino-L-alanine, a neurotoxic amino acid with other cyanotoxins in British waterbodies, 1990–2004. *Environmental Microbiology* 10: 702–708.
- Milutinovic A, Zivin M, Zorc-Pleskovic R, Sedmak B, Suput D., 2003. Nephrotoxic effects of chronic administration of microcystins-LR and -YR. *Toxicon* 42:281–288.
- Mitraki, G. H., Crisman, T., & Zalidis, G., 2004. Lake Koronia, Greece: Shift from autotrophy to heterotrophy with cultural eutrophication and progressive water-level reduction. *Limnologia* 34: 110–116.
- Mizuno T., 1990. *Illustrations of Freshwater Plankton of Japan*. Hoikush Publishing Co, Japan.
- Mohamed, Z.A., Carmichael, W.W., Hussein A.A., 2003. Estimation of microcystins in the freshwater fish *Oreochromis niloticus* in an Egyptian fish farm containing a *Microcystis* bloom. *Environmental Toxicology* 18: 137-141.
- Molica R., Onodera, H., Garcia, C., Rivas, M., Andrinolo, D., Nascimento, S., Meguro, H., Oshima, Y., Azevedo, S. & Lagos, N., 2002. Toxins in the freshwater cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanophyceae) isolated from Tabocas reservoir in Caruaru, Brazil, including demonstration of a new saxitoxin analogue. *Phycologia*, 41(6): 606-611.
- Moore R.E., 1996. Cyclic peptides and depsipeptides from cyanobacteria: a review. *Journal of Industrial Microbiol* 16:134–143
- Moreno I., Pichardo S., Jos A., Gomez-Amores L., Mate A., Vazquez C.M., Camean A.M., 2005. Antioxidant enzyme activity and lipid peroxidation in liver and kidney of rats exposed to microcystin-LR administered intraperitoneally. *Toxicon* 45:395–402.
- Moustaka-Gouni and Nikolaidis, G., 1990. Phytoplankton of a warm monomictic lake - Lake Vegoritis, Greece. *Archives of Hydrobiology Lake* 119: 299-313.

- Moustaka-Gouni, M., Cook, C. M., Gkelis, S., 2004. The coincidence of a *Prymnesium parvum* bloom and the mass kill of birds and fish in Lake Koronia. *Harmful Algae News* 26: 1–2.
- Moustaka-Gouni M., Vardaka E., Michaloudi E., K.Ar. Kormas, Tryfon E., Mihalatou H., Gkelis S., Lanaras T., 2006. Plankton food web structure in a eutrophic polymictic lake with a history of toxic cyanobacterial blooms. *Limnology and Oceanography* 51:715–727.
- Murch, S.J., Cox, P.A., Banack, S.A., Steele, J.C., Sacks, O.W., 2004. Occurrence of b-methylamino-L-alanine (BMAA) in ALS/PDC patients from Guam. *Acta Neurologica Scandinavica* 110 (4): 267–269.
- Mwaura, F., Koyo, A.O., Zech, B., 2004. Cyanobacterial blooms and the presence of cyanotoxins in small high altitude tropical headwater reservoirs in Kenya. *Journal of Water Health* 2: 49–57.
- Nagel, R., 2002. DarT: the embryo test with the zebrafish *Danio rerio* – a general model in ecotoxicology and toxicology. *Altex* 19: 38–48.
- Namikoshi, M., Rinehart, K.L., Dahlem, A.M., Beasley, V.R., Carmichael, W.W., 1989. Total synthesis of Adda, the unique C20 amino acid of cyanobacterial hepatotoxins. *Tetrahedron Lett* 30, 4349-4352.
- Namikoshi M., Rinehart K.L., 1996. Bioactive compounds produced by cyanobacteria. *Journal of Industrial Microbiology* 17: 373-384.
- Namikoshi, M., Murakami, T., Watanabe, M.F., Oda, T., Yamada, J., Tsujimura, S., Nagai, H., Oishi, S., 2003. Simultaneous production of homoanatoxin-a, anatoxin-a, and a new non-toxic 4-hydroxyhomoanatoxin-a by cyanobacterium *Raphidiopsis mediterranea skuja*. *Toxicon* 42 (5): 533–538.
- Nandini S., 2000. Responses of rotifers and cladocerans to *Microcystis aeruginosa* (Cyanophyceae): A demographic study. *Aquatic Ecology* 34: 227–242.

- Neumann, U., Campos, V., Cantarero, S., Urrutia, H., Heinze, R., Weckesser, J., Erhard, M., 2000. Co-occurrence of non-toxic (cyanopeptolin) and toxic (microcystin) peptides in a bloom of *Microcystis* sp from a Chilean Lake. *Systematic and Applied Microbiology* 23 (2): 191-197.
- Nicholson, B.C., Burch, M.D., 2001. Evaluation of analytical methods for detection and quantification of cyanotoxins in relation to Australian drinking water guidelines. Cooperative Research Centre for Water Quality and Treatment, National Health and Medical Research Council of Australia, Australia, 57pp.
- Niederholzer, R. & Hofer, R., 1980. The feeding of roach (*Rutilus rutilus* L.) and rudd (*Scardinius erythrophthalmus* L.). I. Studies of natural populations. *Ekologia Polska* 28:45-59.
- Nicoară, A., Szekely, P., 2004. Observations upon amphibians from Ciric River Floodplain – Iasi. *Studii si cercetari – Seria Biologie, Bacău* 9: 121-123.
- Novaczek, I., Madhyastha, M.S., Ablett, R.F., Johnson, G., Nijjar, M.S., Sims, D.E., 1991. Uptake, disposition and depuration of domoic acid by blue mussels (*Mytilus edulis*). *Aquatic Toxicology* 21: 103–118.
- Oberemm I Axel, Fastner Jutta and Steinberg E. W. Christian, 1997. Effects of Microcystin-LR and cyanobacterial crude extracts on embryo-larval development of Zebrafish (*Danio rerio*). *Water Research*. 31(11): 2918-2921.
- Oberemm, A., Becker, J., Codd, G. A., and Steinberg, C., 1999. Effects of cyanobacterial toxins and aqueous crude extracts of cyanobacteria on the development of fish and amphibians. *Environmental Toxicology* 14:77–88.
- Oh, H-M., Lee, S-J., Jang, M-H. and Yoon, B-D., 2000. Microcystin production by *Microcystis aeruginosa* in a phosphorus-limited chemostat. *Applied and Environmental Microbiology* 66: 176–179.
- Oh, H.M.; Seog, J.L.; Jeehwan, K.; Heesik, K.; Byungdae, Y., 2001. Seasonal Variation and indirect monitoring of microcystin

- concentration in Daechung Reservoir, Korea. *Applied and Environmental Microbiology* 67: 1484-1489.
- Ojaveer, E., Simm, M., Balode, M., Purina, I. & Suursaa, Ü., 2003: Effect of *Microcystis aeruginosa* and *Nodularia spumigena* on survival of *Eurytemora affinis* and the embryonic and larval development of the Baltic herring *Clupea harengus membras*. *Environmental Toxicology* 18: 236-242.
- Oliver, R.L., Ganf, G.G., 2000. Freshwater blooms. In: Whitton B.A., Potts, M. (Eds). *The ecology of cyanobacteria. Their diversity in time and space*. Kluwer Academic Publishers, The Netherlands. pp. 149-194.
- Olson, T.A., 1960. Water poisoning - a study of poisonous algae blooms in Minnesota. *American Journal of Public Health* 50: 883-884.
- Orr PT, Jones GJ, 1998. Relationship between microcystin production and cell division rates in nitrogen-limited *Microcystis aeruginosa* cultures. *Limnology and Oceanography* 43:1604–1614.
- Oudra, B., Loudiki, M., Vasconcelos, V., Sabour, B., Sbiyyaa, B., Oufdou, K., Mezrioul, N., 2002. Detection and quantification of microcystins from cyanobacteria strains isolated from reservoirs and ponds in Morocco. *Environmental Toxicology* 17 (1): 32–39.
- Ozawa K., Yokoyama A., Ishikawa K., Kumagai M., Watanabe M.F., Park H.D., 2003. Accumulation and depuration of microcystin produced by the cyanobacterium *Microcystis* in a freshwater snail. *Limnology* 4:131–138.
- Palikova, M., Kovaru, F., Navaritel, S., Kubala, L., Pesak, S. and Vajcova, V., 1998. The effects of pure microcystin-LR and biomass of blue-green algae on selected immunological indices of carp (*Cyprinus carpio* L.) and silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix* Val.). *Acta Veterinaria Brno* 67: 265–272.
- Pan Xiaojie, Chang Fengyi, Liu Yongding, Li Dunhai, Xu Aihua, Shen Yinwu, Huang Zebo, 2009. Mouse Toxicity of *Anabaena flos-aquae* from *Lake Dianchi*. *Environmental Toxicology* 24:10-18.

- Papadimitriou, T., Kagalou, I., Bacopoulos, V., & Leonardos, I., 2009. Accumulation of microcystins in water and fish tissues: An estimation of risks associated with microcystins in most of the Greek lakes. *Environmental Toxicology* 25(4):418-427.
- Papastergiadou E., I. Kagalou, K., Stefanidis A., Retalis I. Leonardos, 2010. Effects of Anthropogenic Influences on the Trophic State, Land Uses and Aquatic Vegetation in a Shallow Mediterranean Lake: Implications for Restoration. *Water Resources Management* 24:415–435.
- Park H.-D, Iwami C., Watanabe M.F., Harada K.-I., Okino T., Hayashi H., 1998. Temporal variabilities of the concentrations of intra- and extracellular microcystin and toxic *Microcystis* species in a hypertrrophic Lake, Lake Suwa, Japan (1991-1994). *Environmental Toxicology and Water Quality* 13:61–72.
- Park S., Brett M.T., Müller-Solger A., Goldman C.R., 2004. Climatic forcing and primary productivity in a subalpine lake: Interannual variability as a natural experiment. *Limnology and Oceanography* 49: 614-619.
- Pearl, H.W., 1996. A comparison of cyanobacterial bloom dynamics in freshwater, estuarine and marine environments. *Phycologia* 35: 25–35.
- Persson L., 1983. Food consumption and the significance of detritus and algae to intraspecific competition in roach *Rutilus rutilus* in a shallow eutrophic lake. *Oikos* 41: 118-125.
- Petaloti, C., Voutsas, D., Smara, C., Sofoniou, M., Stratis, I. & Kouimtzis, T., 2004. Nutrient dynamics in shallow lakes of Northern Greece. *Environmental Science and Pollution Research*, 11: 11–17.
- Pflugmacher S., Wiegand C., Beattie K.A., Codd G.A., Steinberg C.E.W., 1998. Uptake of the cyanobacterial hepatotoxin microcystin- LR by aquatic macrophytes. *Journal of Applied Botany* 72:228–232.

- Pflugmacher S., Wiegand C., Beattie K.A., Krause E., Steinberg C.E.W., Codd G.A., 2001. Uptake, effects and metabolism of cyanobacterial toxins in the emergent reed plant *Phragmites australis* (Cav.) Trin ex. Steud. *Environmental Toxicology and Chemistry* 20: 846–852.
- Pflugmacher S., 2002. Possible allelopathic effects of cyanotoxins, with reference to microcystin-LR, in aquatic ecosystems. *Environmental Toxicology* 17:407–413.
- Phillips, M. J., Roberts, R. J., Stewart, J. A., and Codd, G. A., 1985. The toxicity of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* to rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. *Journal of Fish Disease* 8: 339–344.
- Pietsch C., Wiegand C., Amé M.V., Nicklisch A., Wunderlin D., Pflugmacher S., 2001. The effects of a cyanobacterial crude extract on different aquatic organisms: evidence for cyanobacterial toxin modulating factors. *Environmental Toxicology* 16:535–42.
- Pilotto L.S., Douglas R.M., Burch M.D., Cameron S., Beers M., Rouch G.J., Robinson P., Kirk M., Cowie C.T., Hardiman S., Moore C., Attewell R.G., 1997. Health effects of exposure to cyanobacteria (blue-green algae) during recreational water-related activities. *Australian NZ Journal of Public Health* 21:562–566.
- Pinho G.L.L., Rosa M.C., Maciel F.E., Bianchini A., Yunes J.S., Proenca L.A.O., Monserrat J.M., 2005. Antioxidant response and oxidative stress after microcystin exposure in the hepatopancreas of an estuarine crab species. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 61:353–360
- Pitois, S., Jackson, M.H., Wood, B.J.B., 2001. Sources of the eutrophication problems associated with toxic algae, an overview, *Journal of Environmental Health* 64: 25–32.
- Pouria S., de Andrade A., Barbosa J., Cavalcanti R. L., Barreto V. T. S., Ward C. J., Preiser W., Poon G. K., Neild G.H., Codd G.A.,

- 1998, Fatal microcystin intoxication in haemodialysis unit in Caruaru, Brazil. *Lancet* 352: 21–26.
- Prejs A., 1984. Herbivory by temperate freshwater fishes and its consequences. *Environmental Biology of Fishes* 10: 281-296.
- Premazzi, G., and L., Volterra, 1993. Microphyte toxins. A manual for toxin detection, Environmental monitoring and therapies to counteract intoxications. JRC CEC, Luxembourg.
- Prepas, E. E., B. G. Kotak, L. M. Campbell, J. C. Evans, S. E. Hrudey & C. F. Holmes, 1997. Accumulation and elimination of cyanobacterial hepatotoxins by the freshwater clam *Anodonta grandis simpsonia*. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 54: 41–46.
- Psilovikos, A., Tzimopoulos, Ch., Spiridis, A., Papadopoulou, E., Tsitsopoulos, I., 1995. Appraisal and management study of water resources in Acheloos downstream basin for the development and environmental reclamation of the area's estuary. Ministry of Environment, Town Planning and Public Works, Technical Report, University of Thessaloniki, Department of Geology and Physical Geography
- Puschner, B., Galey, F.D., Johnson, B., Dickie, C.W., Vondy, M., Francis, T., Holstege, D.M., 1998. Blue-green algae toxicosis in cattle. *Journal of American Veterinary Medical Association* 213 (11): 1605–1607.
- Rantala, A., Fewer, D. P., Hisbergues, M., Rouhiainen, L., Vaitomaa, J., Borner, T. & Sivonen, K., 2004. Phylogenetic evidence for the early evolution of microcystin synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 101:568–73.
- Rao P.V., Gupta N., Bhaskar A.S., Jayaraj R., 2002. Toxins and bioactive compounds from cyanobacteria and their implications on human health. *Journal of Environmental Biology* 23:215-24.
- Rapala, J., Sivonen, K., Lyra, C., Niemelä, S.I., 1997. Variation of microcystins, cyanobacterial hepatotoxins, in *Anabaena* spp. as a

- function of growth stimuli. *Applied and Environmental Microbiology* 63 (6): 2206–2212.
- Rapala, J., Sivonen, K., 1998. Assessment of environmental conditions that favour hepatotoxic and neurotoxic *Anabaena* spp. strains cultured under light limitation at different temperatures. *Microbiology and Ecology* 36: 181–192.
- Rapala, J., Erkomaa, K., Kukkonen, J., Sivonen, K., Lahti, K., 2002. Detection of microcystins with protein phosphatase inhibition assay, high-performance liquid chromatography-UV detection and enzyme-linked immunosorbent assay. Comparison of methods. *Analytica Chimica Acta* 466: 213–231.
- Rask, M., 1989. A note on the diet of roach, *Rutilus rutilus* L. and other cyprinids at Tvařminne, northern Baltic Sea. *Aqua Fennica* 19: 19–27.
- Reinikainen M., Ketola M., Walls M., 1994. Effects of the concentration of toxic *Microcystis aeruginosa* and an alternative food on the survival of *Daphnia pulex*. *Limnology and Oceanography* 39:424– 432.
- Ressom, R., Soong, F. S., Fitzgerald, J., Turczynowicz, L., El Saadi, O., Roder, D., Maynard, T. & Falconer, I. R., 1994. Health Effects of Toxic Cyanobacteria (Blue-Green Algae). Canberra: National Health and Medical Council, Australian Government Publishing Service.
- Reynolds, C. S., 1984. The ecology of freshwater phytoplankton. Cambridge University Press, Cambridge.
- Riede, K., 2004. Global register of migratory species - from global to regional scales. Final Report of the R&D-Projekt 808 05 081. Federal Agency for Nature Conservation, Bonn, Germany. 329 p.
- Rinehart, K.L., Harada, K.-I., Namikoshi, M., Chen, C., Harvis, C.A., Munro, M.H.G., Blunt, J.W., Mulligan, P.E., Beasley, V.R., Dahlem, A.M., Carmichael, W.W., 1988. Nodularin, microcystin and the conformation of Adda. *Journal of the American Chemical Society* 110: 8557-8558.

- Rinehart, K.L., Namikoshi, M. & Choi, B.W., 1994. Structure and biosynthesis of toxins from blue-green algae (Cyanobacteria). *Journal of Applied Phycology* 6: 159–176.
- Robarts Richard, Marley J. Waiser, Michael T. Arts and Marlene S. Evans, 2005. Seasonal and diel changes of dissolved oxygen in a hypertrophic prairie lake. *Lakes & Reservoirs: Research and Management* 10: 167–177
- Rodger, H.D., Turnbull, T., Edwards, C., Codd, G.A., 1994. Cyanobacterial (blue-green algal) bloom associated pathology in brown trout (*Salmo trutta* L.) in Loch Leven, Scotland. *Journal of Fish Disease* 17:177–181.
- Rohrlack, T., Christoffersen, K., Dittmann, E., Nogueira, I., Vasconcelos, V., Boerner, T., 2005. Ingestion of microcystins by *Daphnia*: intestinal uptake and toxic effects. *Limnology and Oceanography* 50: 440–448.
- Rogalus, M. K. and Watzin, M. C., 2008. Evaluation of sampling and screening techniques for tiered monitoring of toxic cyanobacteria in lakes. *Harmful Algae* 8: 665–673.
- Romanowska-Duda Z., Mankiewicz J., Tarczynska M., Walter Z., Zalewski M., 2002. The effect of toxic cyanobacteria (blue-green algae) on water plants and animal cells. *Polish Journal of Environmental Studies* 11: 561- 566.
- Romero, J., Kagalou, I., Imberger, J., Hela, D., Kotti, M. Bartzokas, A., 2002. Seasonal water quality of shallow and eutrophic Lake Pamvotis, Greece: Implications for restoration. *Hydrobiologia* 474: 91–105.
- Rositano, J., Nicholson, B., 1994. *Water Treatment Techniques for the Removal of Cyanobacterial Toxins from Water 2/94*. Australian Centre for Water Quality Research, Salisbury, SA, Australia.
- 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.

- Runnegar, M.T., Kong, S., Berndt, N., 1993. Protein phosphatase inhibition and in vivo hepatotoxicity of microcystins. *American Journal of Physiology* 265: 224-230.
- Runnegar, M., Berndt, N. and Kaplowitz, N., 1995. Microcystin uptake and inhibition of protein phosphatases: Effects of chemoprotectants and self-inhibition in relation to known hepatic transporters. *Toxicology and Applied Pharmacology* 134: 264-272.
- Sabour B., Loudiki M., Oudra B., Vasconcelos V., Martins R., Oubrain S, Fawzi B., 2002. Toxicology of *Microcystis ichthyoblabe* waterbloom from Lake Oued Mellah (Morocco). *Environmental Toxicology* 17: 24–31.
- Saito, S., Y., Nakano, K., Kushida, M., Shirai, K.-I., Harada, and M., Nakano, 1994. Cross-reactivity and neutralizing ability of monoclonal antibodies against microcystins. *Microbiology and Immunology* 38: 389-392.
- Sakamoto H., Terada M., Fujiki H., Mori M., Nakayasu M., Sugimura T., Weinstein I.B., 1981. Stimulation of prostaglandin production and choline turnover in HeLa cells by lyngbyatoxin A and dihydroteleocidin B. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 102:100-107
- Saker, M.L., Eaglesham, G.K., 1999. The accumulation of cylindrospermopsin from the cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* in tissues of the Redclaw crayfish *Cherax quadricarinatus*. *Toxicon* 37: 1065-1077.
- Sarada R., Pillai M.G., Ravishankar G.A., 1999. Phycocyanin from *Spirulina* sp.: influence of processing of biomass on phycocyanin yield, analysis of efficacy of extraction methods and stability studies on phycocyanin. *Process Biochemistry* 34:795–801.
- Schantz, E. J., 1986. Chemistry and biology of saxitoxin and related toxins. In *Tetrodotoxin, Saxitoxin, and the Molecular Biology of the Sodium Channel*. (C. Y. Kao and S. R. Levinson, Eds.), Vol. 479, pp. 15-23. *Annals of the New York Academy of Sciences*, NY.

- Schatz, D., Keren, Y., Vardi, A., Sukenik, A., Carmeli, S., Bořner, T., Dittmann, E., Kaplan, A., 2007. Towards clarification of the biological role of microcystins, a family of cyanobacterial toxins. *Environmental Microbiology* 9 (4):965–970.
- Scheffel Peter & Bernd Sceiba. *Plants and Animals of Central Europe (Pflanzen und Tiere)*.
- Scheffer M., Rinaldi S., Gragnani A., Mur L.C. and van Nes E.H., 1997. On the dominance of filamentous cyanobacteria in shallow turbid lakes. *Ecology* 78: 272-282.
- Schembri, M.A., Neilan, B.A., Saint, C.P., 2001. Identification of genes implicated in toxin production in the cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii*. *Environmental Toxicology* 16: 413-421.
- Schirmer, K., 2006. Proposal to improve vertebrate cell cultures to establish them as substitutes for the regulatory testing of chemicals and effluents using fish. *Toxicology* 224: 163–183.
- Schopf, J.W., 1993. Microfossils of the Early Archean Apex chert : new evidence of the antiquity of life. *Science* 260: 640-646.
- Schriver, P., E. Bøgestrand, Jeppesen, & M., Søndergaard, 1995. Impact of submerged macrophytes on fish-zooplankton-phytoplankton interactions: large-scale enclosure experiments in a shallow eutrophic lake. *Freshwater Biology* 33: 255–270.
- Scott W. E., Barlow D. J. & Hauman J. H., 1981. Studies on the ecology, growth and physiology of toxic *Microcystis aeruginosa* in South Africa. In: *The Water Environmental Algal Toxins and Health* (ed. W. W. Carmichael) pp. 49–69. Plenum Press, New York.
- Shen P.P., S.W. Zhao, W.J. Zheng, Z.C. Hua, Q. Shi, Z.T. Liu, 2003. Effects of cyanobacteria bloom extract on some parameters of immune function in mice. *Toxicology Letters* 143: 27-36.
- Shi L., Carmichael W.W., Miller I., 1995. Immunogold localization of hepatotoxins in cyanobacterial cells. *Archives of Microbiology* 163(1):7–15

- Sipia V.O., Kankaanpaa H.T., Flinkman J., Lahti K., Meriluoto J.A.O., 2001. Time-dependent accumulation of cyanobacterial hepatotoxins in flounders (*Platichthys flesus*) and mussels (*Mytilus edulis*) from the northern Baltic Sea. *Environmental Toxicology* 16: 330-336.
- Sipia, V., Lahti, K., Kankaanpaa, H., Vuorinen, P., & Meriluoto, J., 2002. Screening for cyanobacterial hepatotoxins in herring and salmon from the Baltic Sea. *Aquatic Ecosystem Health & Management* 5(4): 451-456.
- Sivonen, K., K. Himberg, R. Luukkainen, S. I. Niemela, G. K. Poon, and G. A. Codd., 1989. Preliminary characterization of neurotoxic cyanobacteria blooms and strains from Finland. *Toxicology Assessment* 4:339-352.
- Sivonen, K., Jones, G., 1999. Cyanobacterial toxins. In: Chorus, I., Bartram, J. (Eds). *Toxic Cyanobacteria in Water*. World Health Organization, E & FN Spon, London and New York, pp. 41-110.
- Skoulikidis, N., Bertahas, I., Koussouris, T., 1998. The environmental state of freshwater resources in Greece (rivers and lakes). *Environmental Geology* 36: 1-16.
- Skulberg, O., B. Underdal and H. Utkilen, 1994. Toxic waterblooms with cyanophytes in Norway – current knowledge. *Algological Studies* 75: 279-289.
- Smith A. and Gilbert J.J., 1995. Relative susceptibilities of rotifers and cladocerans to *Microcystis aeruginosa*. *Archiv für Hydrobiologie* 132: 309-336.
- Smith J.L., Haney J.F., 2006. Foodweb transfer, accumulation, and depuration of microcystins, a cyanobacterial toxin, in pumpkinseed sunfish (*Lepomis gibbosus*). *Toxicon* 48:580-589.
- Snyder, S., Goodwin, A., Freeman, D., 2002. Evidence that channel catfish *Ictalurus punctatus* mortality is not linked to ingestion of the hepatotoxin microcystin-LR. *Journal of Fish Disease* 25: 275-278.

- Soll, M.D., Williams, M.C., 1985. Mortality of a white rhinoceros (*Ceratotherium simum*) suspected to be associated with the blue-green algae *Microcystis aeruginosa*. J. S. Afr. Vet. Assoc. 56 (1): 49–51.
- Sotero-Santos, R.B., Silva, C.R.D.S.E., Verani, N.F., Nonaka, K.O., Rocha, O., 2006. Toxicity of a cyanobacterial bloom in Barra Bonita Reservoir (Middle Tietê River, São Paulo, Brazil). *Ecotoxicology and Environmental Safety* 64 (2): 163–170.
- Speczia'r A, To'lg L, Biro' P., 1997. Feeding strategy and growth of cyprinids in the littoral zone of Lake Balaton. *Journal of Fish Biology* 51:1109–1124.
- Spoof, L., Karlsson, K., Meriluoto, J., 2001. High-performance liquid chromatographic separation of microcystins and nodularin, cyanobacterial peptide toxins, on C18 and amide C16 sorbents. *Journal of Chromatography A* 909 (2): 225–236.
- Spratte, S., and U., Hartmann, 1997. *Fischartenkataster: Süßwasserfische und Neunaugen in Schleswig-Holstein*. Ministerium für ländliche Räume, Landwirtschaft, Ernährung und Tourismus, Kiel Germany. 183 p.
- Stalikas, C., Pilidis, G., and Karayannis, M., 1994. Heavy metal concentrations in sediments of Lake Pamvotis and Kalamas River in North-Western Greece. *Freshenius Environmental Bulletin* 3: 575-579.
- Stanković, S., 1931. Sur les particularités limnologiques des lacs égéens. *Verh. int. Ver. Limnol.* 5: 158-196.
- Stanner D., & Bourdeau P., 1995. *Europe's Environment*. European Environmental Agency, Copenhagen.
- Steffensen, A., 2008. Cyanobacterial Harmful Algal Blooms: State of the Science and Research Needs. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 619: 855-865.

- Stefouli M., Tiligadas E., Devene S., Use of earth observation/geoscientific data and web-GIS techniques for water resources management of the Nestos basin. FIG Working Week 2005 and GSDI-8. From pharaohs to geoinformatics—the role of SDI's in an information society, 16–21 April 2005, Cairo, Egypt; 2005. p. 1-16.
- Stephanidis A., 1937. Poissons d'eau douce, nouveaux pour l'ichthyofaune de la Grece. Acta Instituti et Musei Zoologia Universitatis Atheniensis 1: 263-268.
- Stewart, I., Webb, P.M., Schluter, P.J., Shaw, G.R., 2006. Recreational and occupational field exposure to freshwater cyanobacteria: a review of anecdotal and case reports, epidemiologic studies, and the challenges for epidemiologic assessment. Environmental Health 5, 6.
- Sueoka, E., N., Sueoka, S., Okabe, T., Kozu, A., Komori, T., Ohta, M., Suganuma, S., J., Kim, I., K., Lim & H., Fujiki, 1997. Expression of the tumor necrosis factor alpha gene and early response genes by nodularin, a liver tumor promoter, in primary cultured rat hepatocytes. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology* 123: 413–419.
- Tafas, T. P. & A. Economou-Amilli, 1997. Limnological survey of the warm monomictic lake Trichonis (central western Greece). Seasonal phytoplankton periodicity – a community approach. *Hydrobiologia* 344: 141–153.
- Talwar, P.K., Jhingran, A.G., 1991. Inland Fishes of India and Adjacent Countries. A.A. Balkema, Rotterdam. 1158 pp.
- Temponeras, M., Kristiansen, J., Moustaka-Gouni, M., 2000. Seasonal variation in phytoplankton composition and physical-chemical features of the shallow Lake Doirani, Macedonia, Greece. *Hydrobiologia* 424: 109–122.
- Tencalla, F., Dietrich, D., Schlatter, C., 1994. Toxicity of *Microcystis aeruginosa* peptide toxin to yearling rainbowtrout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquatic Toxicology* 30: 215–224.

- Tencala, F., Dietrich, D., 1997. Biochemical characterization of microcystin toxicity in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Toxicon* 35 (4): 583–595.
- Teixera, M., Costa, M., Carvalho, V., Pereira, M., Hage, E., 1993. Gastroenteritis epidemic in the area of the Itaparica Dam, Bahia, Brazil. *Bulletin of Pan American Health Organization* 27: 244–253.
- Teubner, K., Haake, H., Woitke, P. & Kohl, J.-G., 1996. Die Beziehung zwischen der Artenzusammensetzung und der Jahresdynamik des Phytoplanktons und der Hydrochemie in 11 Gewässern in Berlin-Brandenburg. In: *Erweiterte Zusammenfassung der Jahrestagung 1995 (24.9.-29.9) in Berlin (Deutsche Gesellschaft für Limnologie, ed.): 707 pp.*
- Thompson, S., Tilton, F., Schlenk, D. and Benson, W. H., 2000, Comparative Vitellogenic Responses in Three Teleost Species: Extrapolation to in Situ Field Studies. *Marine Environmental Research* 50: 185–189.
- Thostrup, L., & Christoffersen, K., 1999. Accumulation of microcystin in *Daphnia magna* feeding on toxic *Microcystis*. *Archiv für Hydrobiologie* 145: 447–467.
- Tilman, D., 1986. Nitrogen-limited growth in plants from different successional stages. *Ecology* 67: 555–563.
- Toranzo, A.E., Nieto, F. and Barja, J.L., 1990. Mortality associated with a cyanobacterial bloom in farmed rainbow trout in Galicia (northwestern Spain). *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.* 10: 106–107.
- Törökné, A.K., 1991. Toxin producing cyanobacteria in Hungarian fresh waters. Doctoral Dissertation, Budapest, Hungary.
- Towle, A. *Modern Biology*. Austin, TX: Holt, Rinehart and Winston, 1989. ISBN 0030139198
- Tregouboff, G., and Rose, M., 1957. *Manuel de planctonologie Méditerranéenne*. Centre Nationale de la Recherche Scientifique, Paris.

- Tryfon, E., Moustaka-Gouni, M. and Nikolaidis, G., 1997. Planktic cyanophytes and their ecology in the shallow Lake Mikri Prespa, Greece. *Nordic Journal of Botany* 17: 439-448.
- Tsoumani M., Liasko R., Moutsaki P., Kagalou I., Leonardos I. 2006. Length-weight relationships of an invasive cyprinid fish (*Carassius gibelio*) from 12 Greek lakes in relation to their trophic states. *Journal of Applied Ichthyology* 22: 281-284.
- Tsujimura S., Tsukada H., Nakahara H., Nakajima T., Nishino M., 2000. Seasonal variations of *Microcystis* populations in sediments of Lake Biwa, Japan. *Hydrobiologia* 434:183-192.
- Turker, H., A. G. Eversole & D. E. Brune, 2003. Filtration of green algae and cyanobacteria by Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, in the partitioned aquaculture system. *Aquaculture* 215: 93-101.
- Turner, P.C., Gammie, A.J., Hollinrake, K., Codd, G.A., 1990. Pneumonia associated with cyanobacteria. *British Medical Journal* 300: 1440-1441.
- Tyler M., J., 1999. *Australian Frogs. A Natural History*. Reed New Holland, Sydney.
- Ueno, Y., Nagata, S., Tsutsumi, T., Hasegawa, A., Watanabe, M.F., Park, H.D., Chen, G., Yu, S.Z., 1996. Detection of microcystin, a blue-green algal hepatotoxin, in drinking water sampled in Haimen and Fusui, endemic areas of primary liver cancer in China, by highly sensitive immunoassay. *Carcinogenesis* 17 (6): 1317-1321.
- Underdal B., Nordstoga K., Skulberg O.M., 1999. Protracted toxic effects caused by saline extracts of *Aphanizomenon flos-aquae* (Cyanophyceae/Cyanobacteria). *Aquatic Toxicology* 46:269-278.
- Uzzell, T., 2004. *Rana epirotica*. 2006 IUCN Red List of Threatened Species
- Van Apeldoorn E., Marian, van Egmond P., Hans, Speijers J. A., Gerrit and Bakker J. I. Guido, 2007. Toxins of cyanobacteria. *Molecular Nutrition & Food Research* 51: 7 - 60.

- Van Buynder, P.G., and T., Oughtred, B., Kirkby, S., Phillips, G., Eaglesham, K., Thomas, and M., Burch, 2001. Nodularin Uptake by Seafood During a Cyanobacterial Bloom. *Environmental Toxicology* 16: 468-471.
- Vardaka E., Moustaka-Gouni M., Lanaras T., 2000. Temporal and spatial distribution of planktic cyanobacteria in Lake Kastoria, Greece, a shallow, urban lake. *Nordic Journal of Botany* 20:501–511.
- Vardaka E., 2001. Toxic cyanobacteria and cyanobacterial toxins in Lake Kastoria and other freshwaters in Greece [Doctoral Dissertation]. *Scientific Annals of the School of Biology of the Faculty of Sciences, Appendix, Aristotle University of Thessaloniki* [in Greek with English summary].
- Vardaka, E., Moustaka-Gouni, M., Cook, C., M. & Lanaras, T., 2005. Cyanobacterial blooms and water quality in Greek waterbodies. *Journal of Applied Phycology* 17: 391–401.
- Vareli K., Briasoulis, E., Pilidis G., and Sainis I., 2009. Molecular confirmation of *Planktothrix rubescens* as the cause of intense, microcystin—Synthesizing cyanobacterial bloom in Lake Ziros, Greece. *Harmful Algae* 8(3):447-453.
- Vasconcelos V. M., Evans W. R., Carmichael W. W. and Namikoshi M., 1993. Isolation of microcystin-LR from a *Microcystis* (cyanobacteria) waterbloom collected in the drinking water reservoir for Porto, Portugal. *Journal of Environmental Science and Health A* 28: 2081-2094.
- Vasconcelos, V. M., 1999. Cyanobacterial toxins in Portugal: Effects on aquatic animals and risk for human health. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 32:249–254.
- Ve'zie, C., L., Brient, K., Sivonen, G., Bertru, 1997. Occurrence of microcystin-containing cyanobacterial blooms in freshwaters of Brittany (France). *Archiv für Hydrobiologie* 139: 401-413.
- Ve'zie, C., Rapala, J., Vaitomaa, Seitsonen, J., Sivonen, K., 2002. Effect of nitrogen and phosphorus on growth of toxic and

- nontoxic *Microcystis* strains and on intracellular microcystin concentrations. *Microbiology Ecology* 43 (4): 443–454.
- Vinagre, T.M., Alciati, J.C., Regoli, F., Bocchetti, R., Yunes, J.S., Bianchini, A., & Monserrat, J.M., 2003. Effect of hepatotoxins (microcystin) on ion-regulation and antioxidant system in gills of *Chasmagnathus granulatus* (Decapoda, Grapsidae). *Comparative Biochemistry and Physiology* 135: 67–75.
- Vincent, R. K., Qin, X., McKay, R. M., Miner J., Czajkowski, K., Savino, J., & Bridgeman T., 2004. Phycocyanin detection from LANDSAT TM data for mapping cyanobacterial blooms in Lake Erie. *Remote Sensing of Environment* 89: 381-392.
- Von Westernhagen, H., 1988. Sublethal effects of pollutants on fish eggs and larvae. pp. 253-346. In: W. S. Hoar & D. J. Randall (eds.), *Fish Physiology vol. XIA – The physiology of developing fish*. Academic Press, San Diego, 546p.
- Walsby, A. E., Utkilenh, C. & Johnsen, .J., 1983. Buoyancy changes of a red coloured *Oscillatoria agardhii* in Lake Gjersjwn, Norway. *Archiv fur Hydrobiologie* 97: 18-38.
- Walsby A.E., Schanz F., 2002. Light-dependent growth rate determines changes in the population of *Planktothrix rubescens* over the annual cycle in Lake Zürich, Switzerland. *New Phytologist* 154: 671–687.
- Wang, P.J., Chien, M.S., Wu, F.J., Chou, H.N., Lee, S.-J., 2005. Inhibition of embryonic development by microcystin-LR in zebrafish, *Danio rerio*. *Toxicon* 45: 303–308.
- Ward, C.J., Beattie, K.A., Lee, E.Y.C., Codd, G.A., 1997. Colorimetric protei phosphatase inhibition assay of laboratory strains and natural blooms of cyanobacteria: comparisons with high-performance liquid chromatographic¹⁸⁷ analysis for microcystins. *FEMS Microbiology Letters* 153: 465-473.
- Ward, C.J., Codd, G.A., 1999. Comparative toxicity of four microcystins of different hydrophobicities to the protozoan

- Tetrahymena pyriformis*. Journal of Applied Microbiology 86: 874-882.
- Watanabe, M.F., and Oishi, S., 1980 Toxicities of *Microcystis aeruginosa* collected from some lakes, reservoirs, ponds and moat in Tokyo and adjacent regions. Journal of Limnology 41: 5-9.
- Watanabe MF, Oishi S., 1985. Effect of environmental factors on toxicity of a cyanobacterium (*Microcystis aeruginosa*) under culture conditions. Applied and Environmental Microbiology 49:1342-1344.
- Watanabe F., Mariyo, Ken-ichi Harada, Wayne W. Carmichael, Hirota Fujiki, 1996. Toxic Microcystis, CRC Press.
- Weithoff, G., and Walz, N., 1995. Influence of the filamentous cyanobacterium *Planktothrix agardhii* on population growth and reproductive pattern of the rotifer *Brachionus calyciflorus*. Hydrobiologia (313-314): 381-386.
- Welker, M., Chorus, I., and Fastner, J., 2004. Occurrence of cyanobacterial toxins (microcystins) in surface waters of rural Bangladesh- pilot study, W.H.O Report, Bangladesh, 23 pp.
- Wetzel R.G., 2001. Limnology:Lake and river ecosystems.
- Whitton, B.A., 1973. Interactions with other microorganisms. In The Biology of Blue-Green Algae. Carr, N.G., and Whitton, B.A. (eds). Oxford: Blackwell Scientific Publications, pp. 415-533.
- Whitton, B. A. & Potts, M., 2000. Introduction to the cyanobacteria. In *The Ecology of Cyanobacteria*, pp. 1-11. Edited by B. A. Whitton & M. Potts. Dordrecht: Kluwer Academic.
- W.H.O., 1998. Cyanobacterial toxins: microcystin-LR. In: Guidelines for drinking water quality. 2nd Edition, Addendum to Vol. 2. Health criteria and other supporting information. World Health Organization, Geneva, Switzerland, pp. 95-110.
- W.H.O., 2003. Algae and cyanobacteria in fresh water. In: Guidelines for safe recreational water environments. Vol. 1: Coastal and fresh waters. World Health Organization, Geneva, Switzerland, pp. 136-158.

- Wiedner, C., Visser, P.M., Fastner, J., Metcalf, J.S., Codd, G.A., Mur, L.R., 2003. Effects of light on the microcystin content of *Microcystis* strain PCC 7806. *Applied and Environmental Microbiology* 69 (3):1475–1481.
- Wiegand, C., Pflugmacher, S., Oberemm, A., Meems, N., Beattie, K.A., Steinberg, C.E.W., Codd, G.A., 1999. Uptake and effects of microcystin-LR on detoxication enzymes of early life stages of the zebra fish (*Danio rerio*). *Environmental Toxicology* 14: 89-95.
- Wiegand, C., Pflugmacher, S., Oberemm, A., Steinberg, C.E.W., 2000. Activity development of selected detoxication enzymes during the ontogenesis of the zebrafish (*Danio rerio*). *International Review of Hydrobiology* 85: 413- 422.
- Wiegand, C., Pflugmacher, S., 2005. Ecotoxicological effects of selected cyanobacterial secondary metabolites: a short review. *Toxicology and Applied Pharmacology* 203: 201-218.
- Williams D.E., Kent M.L., Andersen R.J., Klix H., Holmes C.F.B., 1995. Tissue distribution and clearance of tritium-labeled dihydromicrocystin- LR epimers administered to Atlantic salmon via intraperitoneal injection. *Toxicon* 33:125–131
- Williams, D.E., Craig, M., Dawe, S.C., Dawe, S.C., Kent, M.L., Andersen, R.J., Holmes, C.F.B., 1997. ¹⁴C labeled microcystin-LR administered to atlantic salmon via intraperitoneal injection provides in vivo evidence for covalent binding of microcystin-LR in salmon livers. *Toxicon* 35: 985–989.
- Willn, T., and Mattsson, R., 1997. Water-blooming and toxin-producing cyanobacteria in Swedish fresh and brackish waters, 1981-1995. *Hydrobiologia* 353: 181-192.
- Wixon Jo, 2000. *Danio rerio*, the zebrafish. *Yeast* 17: 225-231.
- Wood S.A., Holland P.T., Stirling D.J., Briggs L.R., Sprosen J., Ruck J.G., Wear R.G., 2006. Survey of cyanotoxins in New Zealand water bodies between 2001 and 2004. *N Z Journal of Marine Freshwater Research* 40:585–597.

- Wu J., Xu Q., Gao G., Shen J., 2006. Evaluating genotoxicity associated with microcystin-LR and its risk to source water safety in Meiling Bay, Taihu Lake. *Environmental Toxicology* 21:250–255.
- Xie, L., Xie, P., Guo, L., Li, L., Miyabara, Y., & Park, H. D., 2005. Organ distribution and bioaccumulation of microcystins in freshwater fish at different trophic levels from the eutrophic Lake Chaohu, China. *Environ. Toxicology* 20: 293–300.
- Xie, L., Yokoyama, A., Nakamura, K., and Park, H., 2007. Accumulation of microcystins in various organs of the freshwater snail *Sinotaia histrica* and three fishes in a temperate lake, the eutrophic Lake Suwa, Japan. *Toxicon* 49: 646–52.
- Yokoyama, A., Park, H.D., 2003. Depuration kinetics and persistence of the cyanobacterial toxin microcystin-LR in the freshwater bivalve *Unio douglasiae*. *Environmental Toxicology* 18: 61–67.
- Yoshizawa, S., Matsushima, R., Watanabe, M. F., Harada, K.-i., Ichihara, A., Carmichael, W. W. and Fujiki, H., 1990. Inhibition of protein phosphatases by microcystins and nodularin associated with hepatotoxicity. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology* 116: 609-614.
- Zacharias, I., Bertahas, I., Skoulikidis, N., & Koussouris, T., 2002. Greek lakes: Limnological overview. *Lakes & Reservoirs: Research and Management* 7: 55–62.
- Zhang Q.-X., Carmichael W.W., Yu M.-J., Li S.-H., 1991. Cyclic peptide hepatotoxins from freshwater cyanobacterial (blue-green algae) waterblooms collected in central China. *Environmental Toxicology and Chemistry* 10:313–321.
- Zhang, L., Ping, X., Yang, Z., 2004. Determination of microcystin- LR in surface water using high-performance liquid chromatography/tandem electrospray ionization mass detector. *Talanta* 62: 193–200.
- Zhang, D.W., Xie, P., Liu, Y.Q., Qiu, T., 2009. Transfer, distribution and bioaccumulation of microcystins in the aquatic food web in

- Lake Taihu, China, with potential risks to human health. *Science of the Total Environment* 407: 2191–2199.
- Zhao M., Xie S.Q., Zhu X.M., Yang Y.X., Gan N.Q., Song L.R., 2006. Effect of dietary cyanobacteria on growth and accumulation of microcystins in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture* 261: 960-966.
- Zheng, L., Xie, P., Li, Y.L., Yang, H., Wang, S.B., Guo, N.C., 2004. Variation of intracellular and extracellular microcystins in a shallow, hypereutrophic subtropical Chinese lake with dense cyanobacterial blooms. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 73: 698–706.
- Zhou, L., Yu, H., Chen, K., 2002. Relationship between microcystin in drinking water and colorectal cancer. *Biomedical and Environmental Sciences* 15 (2): 166–171.
- Zimba, P.V., Khoo, L., Gaunt, P., Carmichael, W.W., Brittain, S., 2001. Confirmation of catfish mortality from *Microcystis* toxins. *Journal of Fish Disease* 24: 41–47.
- Zimba, P.V., Camus, A., Allen, E.H., Burkholder, J.M., 2006. Co-occurrence of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, mortalities and microcystin toxin in a southeastern USA shrimp facility. *Aquaculture* 261: 1048–1055.
- Zurawell, R.W., Kotak, B.G., Prepas, E., 1999. Influence of lake trophic status on the occurrence of microcystin-LR in the tissue of pulmonate snails. *Freshwater Biology* 42: 707–718.

ΕΙΣΑΓΩΓΙΚΕΣ ΕΙΚΟΝΕΣ

Εικόνα εξωφύλλου: Κεντρικά απεικονίζεται αποικία του κυανοβακτηρίου *Microcystis* sp. (<http://www-cyanosite.bio.purdue.edu/images/images.html>), ενώ περιφερειακά απεικονίζονται ορισμένες από τις συνέπειες των κυανοβακτηρίων, όπως η άνθηση τους στις λίμνες (από <http://www-cyanosite.bio.purdue.edu/images/images.html>) και στις θάλασσες (The Maritimes), η αυξημένη θνησιμότητα των ιχθύων ([publicfiles.dep.state.fl.us - /dear/labs/biology/hab/images/microcystis bloom photos/](http://publicfiles.dep.state.fl.us/dear/labs/biology/hab/images/microcystis_bloom_photos/)) και η πιθανή απειλή της δημόσιας υγείας (Jonathan Frodge).

Microcystis sp. (<http://www.cyanosite.bio.purdue.edu/images/images.html>), cyanobacterial bloom in fresh and sea waters (<http://www-cyanosite.bio.purdue.edu/images/images.html>), fish mortality ([publicfiles.dep.state.fl.us - /dear/labs/biology/hab/images/microcystis bloom photos/](http://publicfiles.dep.state.fl.us/dear/labs/biology/hab/images/microcystis_bloom_photos/)), possible threat of public health (Jonathan Frodge).

Εικόνα Κεφαλαίου 3

Άνθηση κυανοβακτηρίων στη Λίμνη Παμβώτιδα, τους θερμούς μήνες του 2008 (από Ντάκης Αλέξανδρος)

Cyanobacterial bloom in Lake Pamvotis during warm months of 2008 (from Ntakis Alexandros).

Εικόνα Κεφαλαίου 4

Θνησιμότητα ιχθύων κατά τη διάρκεια άνθησης κυανοβακτηρίων στη Λίμνη Dunn's Creek (από Photo Credit: FWC)

Dead fish and cyanobacterial bloom in Dunn's Creek (from Photo Credit: FWC)

Εικόνα Κεφαλαίου 5

Άτομο του ιχθύος *Rutilus rapanosi* (από www.wikimedia.org)

Rutilus rapanosi (from www.wikimedia.org)

Εικόνα Κεφαλαίου 6

Όργανισμοί που διαβιούν στη Λίμνη Παμβώτιδα (από www.Ittiofauna.org, www.Weichtiere.at, www.Biolib.cz, www.Biopix.com, Αντωνόπουλος Αντώνης)

Organisms from Lake Pamvotis (from www.Ittiofauna.org, www.Weichtiere.at, www.Biolib.cz, www.Biopix.com, Antonopoulos Antonis)

Εικόνα Κεφαλαίου 7

Νεκρή αγελάδα μετά από κατάποση νερού που περιείχε μεγάλες ποσότητες τοξικών κυανοβακτηρίων (από W. Carmichael, www.wallowavalleyonline.com).

Dead cow, exposed to toxic cyanobacteria, through drinking water (from W. Carmichael, www.wallowavalleyonline.com).

Εικόνα Κεφαλαίου 8

Ψυχαγωγικές δραστηριότητες που λαμβάνουν χώρα σε εσωτερικά ύδατα της Ελλάδος *(από www.active-nature.gr)*.

Recreational activities in greek lakes *(from www.active-nature.gr)*.