

Presenza di cianobatteri produttori di tossine algali nel laghetto di Muzzano

Autor(en): **Wicht, Barbara / Lauceri, Rosaria / Austoni, Martina**

Objekttyp: **Article**

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

Band (Jahr): **100 (2012)**

PDF erstellt am: **12.07.2024**

Persistenter Link: <https://doi.org/10.5169/seals-1003029>

Nutzungsbedingungen

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

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

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

Haftungsausschluss

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

Presenza di cianobatteri produttori di tossine algali nel Laghetto di Muzzano

Barbara Wicht¹, Rosaria Lauceri², Martina Austoni², Andrea Lami²,
Francesca Caviglia³, Giuseppina Tondi³, Mauro Tonolla¹, Nicoletta Riccardi²

¹ Istituto cantonale di microbiologia, Via Mirasole 22a, CH-6500 Bellinzona

² C.N.R. - Istituto per lo Studio degli Ecosistemi, Largo Tonolli 50, I-28922 Verbania Pallanza

³ Agenzia Regionale per la Protezione Ambientale, Dip. Prov. - via IV Novembre 294 - 28887 - Omegna (VB)

barbarawicht@yahoo.it

Riassunto: Nell'ambito del progetto "Sistema di Sorveglianza TOssine Algali (SISTO)", nel mese di ottobre 2011 è stata rilevata la presenza di tossine algali prodotte da cianobatteri del genere *Microcystis* nel Laghetto di Muzzano. Le tossine (microcistine del tipo MC-LR e MC-LR demetilata) sono state identificate mediante spettrometria di massa MALDI-TOF (*Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization analysis by Time-Of-Flight*), HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*) ed ELISA (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*). La loro tossicità per l'uomo e gli animali superiori e la loro potenziale persistenza nell'ambiente devono essere tenute in conto nel caso di utilizzo delle acque contaminate, in particolare durante i periodi di fioritura algale.

Abstract: In October 2011, the project of surveillance of algal blooms "SISTO" allowed discovering the presence of algal toxins produced by cyanobacteria of the genus *Microcystis* in the Lake Muzzano. These toxins (microcystins MC-LR and demethylated MC-LR types) were identified by MALDI-TOF (*Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization analysis by Time-Of-Flight*) mass spectrometry, HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*) and ELISA (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*). Their toxicity for humans and animals, as well as their persistence in the environment should be taken into account when contaminated waters are used, especially during the periods of algal bloom.

INTRODUZIONE

Le fioriture algali

Le fioriture algali sono un fenomeno sempre più frequente, non solo nell'ambiente marino ma anche nelle acque dolci, nelle quali le fioriture di cianobatteri (oltre 20 generi) sono le maggiori responsabili della produzione di tossine pericolose per l'uomo e gli animali superiori. Essendo incolori e inodori, queste sostanze non sono generalmente percepite dai fruitori dell'ambiente. Inoltre, i cianobatteri sono noti per la capacità di svilupparsi in modo tanto massiccio da alterare il colore e la trasparenza delle acque, e di produrre schiume e depositi di cellule algali in putrefazione sui litorali e sulle rive dei laghi, alterando la percezione estetica dell'ambiente e producendo sostanze maleodoranti (ad es. geosmina e metil-isoborneolo) che disincentivano le attività ricreative e degradano la qualità delle acque destinate alla potabilizzazione.

L'esposizione della popolazione umana (e degli animali superiori) alle tossine algali può avvenire mediante l'ingestione di acqua e/o alimenti contaminati, ma anche durante lo svolgimento d'attività ricreative lungo le coste interessate da episodi di fioriture, attraverso il contatto diretto con l'acqua o l'inalazione dell'aerosol che si forma nell'area di efflorescenza. Recenti sono, a questo proposito, gli episodi accaduti a Genova, dove circa 200 bagnanti sono stati intossicati dopo aver inala-

to neurotossine prodotte da un'alga di origine tropicale, *Ostreopsis ovata* (DURANDO *et al.* 2007) che si sta diffondendo lungo le coste italiane. Oltre ai numerosi episodi di mortalità di fauna selvatica e di animali domestici segnalati in diversi Paesi, sono noti episodi più o meno gravi ed estesi di intossicazione delle popolazioni umane. Uno dei più drammatici si è verificato in Brasile nel 1996 in una clinica per pazienti emodializzati, in seguito all'utilizzo di acque potabili non adeguatamente trattate per la rimozione delle cianotossine: 126 pazienti furono gravemente intossicati e 60 morirono nei giorni e mesi successivi. Oltre agli effetti acuti, vi sono effetti sulla salute umana dovuti all'esposizione cronica a basse dosi di cianotossine. Tra questi, sono noti effetti di induzione di alcuni tipi di tumore e, secondo recenti studi epidemiologici, di alcune malattie neurodegenerative (AZEVEDO *et al.* 2008, PILOTTO 2008). La maggioranza delle tossine algali non ha effetti sugli organismi della rete alimentare acquatica e, di conseguenza, può essere trasferita lungo la catena trofica ed essere accumulata (bioamplificazione), anche negli organismi utilizzati a scopo alimentare (molluschi, crostacei e pesci). In genere i pesci, al contrario dei molluschi, non espongono l'uomo a un rischio tossicologico rilevante, in quanto, essendo nella maggior parte dei casi sensibili all'azione delle biotossine, muoiono prima che nei loro tessuti si sia ottenuta una concentrazione tale da rappresentare un pericolo per il consumatore. Non sono tuttavia da sottovalutare

i problemi legati al consumo di pesce d'acqua dolce, nel quale potrebbero verificarsi fenomeni di bioaccumulo. Infatti, benché i rischi non siano stati, fino ad oggi, verificati, è importante sottolineare che le ricerche su questo argomento sono fortemente sbilanciate a favore della fauna marina, proprio in conseguenza del suo maggiore impatto socio-economico. Nei casi d'intossicazione di tipo alimentare, a seconda della tossina coinvolta, si riscontrano sintomatologie di lieve entità, solitamente autolimitanti, caratterizzate da disturbi gastrointestinali o episodi allergici, e forme ben più gravi di tipo neurologico, che possono condurre a morte il soggetto colpito (AZEVEDO *et al.* 2008, CODD *et al.* 1999).

Il progetto SISTO

Il progetto "Sistema di Sorveglianza TOssine Algali (SISTO) (Rif. 2010-2357 Fondazione Cariplo), iniziato nel 2011, prevede l'impiego di bioindicatori di accumulo come sistema di allarme in situ per la verifica precoce del potenziale rischio sanitario legato alle fioriture di alghe produttrici di sostanze tossiche. Utilizzando diverse metodologie di rilevamento delle tossine, il SISTO sarà in grado di prevedere i rischi ad esse legati, permettendo alle autorità d'intervenire per tempo (ad es. limitando l'utilizzo delle acque contaminate).

Nel quadro del SISTO è di primaria importanza l'implementazione di metodologie rapide, accurate ed affidabili per l'identificazione e la quantificazione in situ delle tossine algali, allo scopo di attivare sistemi di sorveglianza in grado di fornire un segnale d'allarme quando la concentrazione della tossina è ancora al di sotto del livello di allerta e/o dei limiti di permmissibilità nelle acque destinate all'uso umano. Per identificare e quantificare le diverse tossine, nel progetto sono impiegati metodi immunologici (ELISA: *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*) e fisico-chimici (HPLC: *High Performance Liquid Chromatography*). È inoltre in fase di sperimentazione un terzo metodo, basato sulla spettrometria di massa (MALDI-TOF: *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization analysis by Time-Of-Flight*) che, negli ultimi anni, sta trovando sempre più largo impiego grazie alla sua elevata sensibilità e alla possibilità di definire la struttura molecolare delle tossine e di analizzarne classi differenti nello stesso campione. La spettrometria di massa MALDI-TOF offre il vantaggio di consentire anche l'individuazione delle molecole varianti delle cianotossine, e viene applicata in diversi campi per l'analisi di peptidi, proteine e acidi nucleici (KARAS & HILLENKAMP 1988). Benché sia una tecnica non quantitativa, presenta l'importante vantaggio di consentire il rilevamento di un'ampia gamma di cianotossine e altri prodotti cianobatterici e di registrarli in una banca dati (WELKER *et al.* 2002, WELKER 2008).

Il Laghetto di Muzzano

Il progetto SISTO prevede una fase di allestimento di colture di alghe produttrici di tossine da ricercare nei laghi della regione insubrica. Uno dei laghi noti per le sue fioriture algali è il Laghetto di Muzzano, dal caratteristico colore, mutevole con le stagioni e che, soprattutto a fine estate, viene attribuito a massicce fioriture di

cianobatteri, ben visibili sotto forma di aloni verdastri, marroni o rossicci che galleggiano in superficie, spesso concentrati in prossimità delle rive. Il laghetto è fortemente inquinato dagli scarichi fognari e dalle attività antropiche, per cui le principali cause delle proliferazioni algali sono da ricercare nelle elevate concentrazioni di fosforo, azoto e altri nutrienti sciolti nell'acqua (SCHÖNENBERGER 2007). Tra i taxa responsabili delle fioriture sono stati identificati *Pseudoanabaena* sp., *Nostoc* sp., *Synechocystis* sp., *Synechococcus* sp., *Plectonema* sp., ma soprattutto *Microcystis wesenbergii*, dominante rispetto agli altri cianobatteri. Sebbene le analisi condotte per determinare se tali organismi producessero tossine algali siano risultate positive, la natura esatta dei composti tossici non è mai stata determinata con certezza (BOTTINELLI 1999, 2000). Nell'ambito del SISTO il laghetto è quindi stato monitorato con lo scopo di verificare la presenza di tossine nelle sue acque e, in caso positivo, stabilire l'identità dei ceppi produttori responsabili delle fioriture.

MATERIALI E METODI

Nel corso del mese di ottobre 2011, nel Laghetto di Muzzano si è verificata una fioritura che ha colorato le sue acque di una tonalità verde intenso (fig. 1). Sono stati effettuati due prelievi d'acqua di superficie il 10 ottobre e il 14 ottobre 2011, sulle rive in zona "Casa del Pescatore", dove il fenomeno era particolarmente evidente. In laboratorio, il campione è stato predisposto per la lettura. La metodologia di preparazione seguita per l'osservazione al microscopio degli organismi algali è quella di UTERMÖHL (1958), nota anche come "metodo del microscopio rovesciato" o "metodo di sedimentazione", attualmente l'unica per cui esiste un protocollo completo ufficiale europeo (UNI EN 15204). Il riconoscimento tassonomico ha previsto la sedimentazione delle cellule algali e l'uso di un microscopio ottico invertito (Zeiss Axiovert 10), effettuando le osservazioni con obiettivo a 400 ingrandimenti, basandosi sui testi di ANAGNOSTIDIS & KOMÁREK (1988, 2005). L'acqua di superficie è stata centrifugata e il pellet analizzato tramite MALDI-TOF (modalità Reflectron con matrice CHCA; TONOLLA *et al.* 2009), ELISA (QuantiPlate Kit for Microcystins, Envirologix USA) e HPLC.



Fig. 1 - Fioritura algale nel Laghetto di Muzzano (novembre 2011).

La determinazione cromatografica è stata condotta utilizzando un HPLC-DAD (Dionex Summit), munito di sistema di degasaggio, pompa quaternaria, auto campionatore e di un vano colonna termostata e un rivelatore a serie di diodi (PDA-100, Dionex; 190-800 nm) che consente di registrare, oltre al cromatogramma, anche lo spettro dei picchi per una loro migliore identificazione. Il range di acquisizione per questa metodica è compreso tra 200 e 400 nm. La separazione degli analiti è avvenuta su colonna Luna C18 (250 mm × 4.6 mm i.d.; diametro particelle 5 µm; Phenomenex, USA) protetta da una pre-colonna. Il metodo utilizzato è stato adattato partendo da quello sviluppato da GUZZELLA *et al.* (2010).

RISULTATI

I responsabili della fioritura sono stati identificati come cianobatteri delle specie *Microcystis wesenbergii* (fig. 2a) e *Microcystis aeruginosa* (fig. 2b).



Fig. 2a - *Microcystis wesenbergii* (ingrandimento 40×).

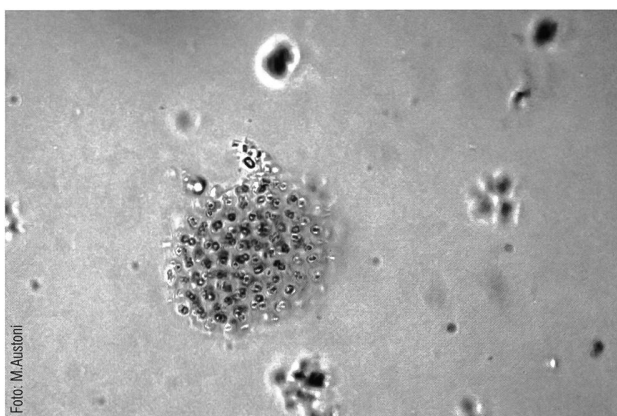


Fig. 2b - *Microcystis aeruginosa* (ingrandimento 40×).

L'analisi mediante MALDI-TOF ha permesso di individuare la presenza di microcistine del tipo MC-LR (peso molecolare=994) e [D-Asp3]-MC-LR (MC-LR demetilata; peso molecolare= 980). Le analisi mediante ELISA e HPLC hanno confermato i risultati della spettrometria di massa, stabilendo in entrambi i prelievi un'alta concentrazione di tossine, tra 700 e 1000 volte il limite

di potabilità dell'acqua fissato dall'OMS, corrispondente a 1 µg/l (CHORUS 2005).

I due ceppi di *Microcystis* sono stati mantenuti in coltura mista in terreno BG11 e il loro isolamento è in corso per poter individuare quali di essi producano le tossine.

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Molte tossine algali hanno una tossicità molto più elevata di quelle prodotte da funghi e piante superiori. Per questa ragione, ad esempio, le saxitossine sono considerate "armi chimiche" dalla Convenzione Internazionale sulle Armi Chimiche (ORGANISATION FOR THE PROHIBITION OF CHEMICAL WEAPONS 2000) e, insieme alle microcistine, sono soggette a controlli e restrizioni particolari nei regolamenti di esportazione di diversi Paesi (HOUSE OF COMMON SCIENCE AND TECHNOLOGY COMMITTEE 2003). Le informazioni sugli effetti di tali sostanze sono tuttavia ancora incomplete e la ricerca è molto attiva nell'identificazione dei composti implicati. È stato appurato che le microcistine sono prodotte dai generi *Anabaena*, *Aphanocapsa*, *Hapalosiphon*, *Microcystis*, *Nostoc*, *Oscillatoria*, *Planktothrix* (PAERL *et al.* 2001, FRISTACHI *et al.* 2008). A breve termine, gli effetti causati da questo tipo di sostanze includono disturbi gastrointestinali, epatiti, emorragie, insufficienza epatica, polmoniti e dermatiti, mentre a lungo termine possono verificarsi un incremento dell'incidenza di tumori epatici e insufficienza epatica con esito letale (FALCONER & HUMPAGE 2005, HARRNESS 2005).

La presenza di microcistine nel Laghetto di Muzzano deve rendere attenti, soprattutto nei periodi di fioriture algali, qualora le sue acque siano utilizzate come fonte d'abbeveraggio di animali da compagnia (ad es. i cani delle persone che passeggiano lungo le rive) o da reddito (cavalli e mucche al pascolo nei prati adiacenti). Numerosi episodi di mortalità di fauna selvatica e animali domestici legati all'ingestione di tossine algali sono infatti stati segnalati in diversi Paesi, tra cui la Svizzera: nel Canton Grigioni un'ottantina di mucche sono morte tra il 1974 e il 1996 dopo aver bevuto acque contaminate da cianotossine epatotossiche (NAEGELI *et al.* 1997). D'altra parte, nel caso del Laghetto di Muzzano, non dovrebbero sussistere rischi rilevanti per salute umana. Essendo vietate la balneazione e la pesca (CONSIGLIO DI STATO 2002), difficilmente potrebbero verificarsi problemi dovuti a ingestione di microcistine. A contatto con la pelle, le tossine algali possono causare dermatiti in alcuni individui particolarmente sensibili. Durante le fioriture, considerate le alte concentrazioni di tossine rilevate, sarebbe bene evitare di entrare in contatto con l'acqua del laghetto (ad es. non immergere le mani o i piedi, soprattutto all'altezza delle rive, dove spesso si accumulano i cianobatteri).

Da considerare infine che le tossine algali sono caratterizzate da un'elevata persistenza nell'ambiente, anche dopo il rilascio dalle cellule algali che le hanno prodotte, grazie alla bassa volatilità e all'elevata stabilità della molecola. Le microcistine non sono inattivate né dall'e-

bollizione né dall'aggiunta di acidi e/o basi forti, ma nell'ambiente naturale sono soggette a progressiva fotodegradazione da parte di radiazioni visibili e UV, e biodegradazione da parte di batteri comunemente presenti nell'ambiente. Questo comporta che la persistenza della tossina, e del conseguente rischio nell'uso dell'acqua, va ben oltre la durata del fenomeno di fioritura algale che l'ha prodotta. Sono, di conseguenza, indispensabili l'adozione di adeguati trattamenti delle acque e di controlli accurati prima dell'immissione nella rete idrica, e l'estensione temporale dei divieti di fruizione dell'ambiente acquatico ben oltre termine della fioritura algale.

RINGRAZIAMENTI

Gli autori ringraziano Claudio Sili (C.N.R.-ISE, Sesto Fiorentino) per l'isolamento dei ceppi, e Nicola Schoenenberger (Pro Natura, Bellinzona) per le informazioni inerenti il Laghetto di Muzzano.

BIBLIOGRAFIA

AZEVEDO S.M.F.O., CHERNOFF N., FALCONER I.R., GAGE M., HILBORN E.D., HOOT M.J., JENSEN K., MACPHAIL R., ROGERS E., SHAW G.R. & STEWART I. 2008. Human health effects workgroup report. Ch. 27 in: HUDNELL, H.K. (ed), Cyanobacterial Harmful Algal Blooms: State of the Science and Research Needs. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, Springer, 619: 579–606.

BOTTINELLI M. 1999. Fioriture di cianobatteri della specie *Microcystis wesenbergii* nel Lago di Muzzano (Svizzera). Tesi Sperimentale di Laurea in Scienze Naturali, Univ. Pavia, 172 pp.

BOTTINELLI M., TONOLLA M., FORLANI G., CRIVELLI C., SANANGELANTONI A. M. & PEDUZZI R. 2000. Fioriture di cianobatteri della specie *Microcystis wesenbergii* nel lago di Muzzano (Svizzera). *Bollettino della Società Ticinese di Scienze Naturali* (ISSN 0379-1254) 88: 53–61.

CHORUS I. 2005. Current approaches to cyanotoxin risk assessment, risk management and regulations in different countries. Dessau: Federal Environment Agency (WaBaLu 02/05).

CODD G.A., BELL S.G., KAYA K., WARD C.J., BEATTIE K.A., & METCALFE J.S. 1999. Cyanobacterial toxins, exposure routes and human health. *European Journal of Phycology*, 34(4): 405–415.

CONSIGLIO DI STATO 2002. Piano Regolatore Cantonale di Protezione del Laghetto di Muzzano [PRCP-LM]. Repubblica e Cantone Ticino, Bellinzona.

DURANDO P., ANSALDI F., ORESTE P., MOSCATELLI P., MARENSI L., GRILLO C., GASPARINI R. & ICARDI G. 2007. *Ostreopsis ovata* and human health: epidemiological and clinical features of respiratory syndrome outbreaks from a two-year syndromic surveillance, 2005-2006, in north-west Italy. *Euro Surveillances*, 12(23): pii=3212.

FALCONER I.R. & HUMPAGE A.R. 2005. Health risk assessment of cyanobacterial (blue-green algal) toxins in drinking water. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 2(1): 43–50.

FRISTACHI A., SINCLAIR J.L., HALL S., HAMBROOK BERKMAN J.A., BOYER G., BURKHOLDER J.A., BURNS J., CARMICHAEL W., DUFOUR A. & FRAZIER W., *et al.* 2008. Occurrence of cyanobacterial harmful algal blooms workgroup report. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 619: 45–103.

GUZZELLA L., GHISLANZONI L., POZZONI F., CERASINO L. & SALMASO N. 2010. Determinazione di tossine algali (microcistine e nodularina) nelle acque superficiali. *Notiziario dei Metodi Analitici*, 1: 17–31.

HARRNESS 2005. Harmful algal research and response: a national environmental science strategy 2005-2015. In: RAMSDELL J.S., ANDERSON D.M. & GLIBERT P.M. (eds.), *Ecological Society of America*, Washington D.C., 96 pp.

HOUSE OF COMMON SCIENCE AND TECHNOLOGY COMMITTEE 2003. *The Scientific Response to Terrorism*, Vol. 1., The Stationery Office, London, 95 pp.

KARAS M. & HILLENKAMP F. 1988. Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10⁴000 daltons. *Analytical Chemistry*, 60(20): 2299–2301.

KOMÁREK J. & ANAGNOSTIDIS K. 1998. Cyanoprokaryota 1. Teil: Chroococcales. - In: ETTL H., GÄRTNER G., HEYNYG H. & MOLLENHAUER D. (eds): *Süßwasserflora von Mitteleuropa* 19/1, Gustav Fischer, Jena-Stuttgart-Lübeck-Ulm, 548 pp.

KOMÁREK J. & ANAGNOSTIDIS K. 2005. Cyanoprokaryota 2. Teil/ 2nd Part: Oscillatoriales. - In: BÜDEL B., KRIENTZ L., GÄRTNER G. & SCHAGERL M. (eds): *Süßwasserflora von Mitteleuropa* 19/2, Elsevier/Spektrum, Heidelberg, 759 pp.

NAEGELI H., SAHIN A., BRAUN U., HAUSER B., MEZ K., HANSELMANN K., PREISIG H.-R., BIVETTI A. & EITEL J. 1997. Plötzliche Todesfälle von Alprindern im Kanton Graubünden. *Schweizer Archiv für Tierheilkunde*, 139(5): 201–209.

ORGANISATION FOR THE PROHIBITION OF CHEMICAL WEAPONS 2000. Convention on the prohibition of the development, production stockpiling and use of chemical weapons and on their destruction. The Hague, pp. 183.

PAERL H.W., FULTON R.S., MOISANDER P.H. & DYBLE J. 2001. Harmful freshwater algal blooms, with an emphasis on cyanobacteria. *Scientific World Journal*, 4(1): 76–113.

PILOTTO L.S. 2008: Epidemiology of cyanobacteria and their toxins. Ch. 29 in: HUDNELL, H.K. (ed), Cyanobacterial Harmful Algal Blooms: State of the Science and Research Needs. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, Springer, 619: 639–649.

SCHOENENBERGER N. 2007. Quello strano colore. *Rivista Pronatura*, 11: 3–5.

TONOLLA M., BENAGLI C., DE RESPINIS S., GAIA V. & PETRINI O. 2009. Mass spectrometry in the diagnostic laboratory. *Pipette*, 3: 20–25.

UNI EN 15204 2006. Water quality- Guidance standard on the enumeration of phytoplankton using inverted microscopy (Utermöhl technique).

UTERMÖHL H. 1958. Zur vervollkommnung der qualitativen Phytoplankton metodik. *Mitteilungen Internationale Vereinigung für Theoretische und Angewandte Limnologie* 9: 1–38.

WELKER M., FASTNER J., ERHARD M. & VON DÖHREN H. 2002. Application of MALDI-TOF MS in cyanotoxin research. *Environmental Toxicology*, 17: 367–374.

WELKER M. 2008. Cyanobacterial hepatotoxins: microcystins, nodularins, and cylindrospermopsins. In: BOTANA L.M. (ed) *Seafood and freshwater toxins: pharmacology, physiology and detection*, 2nd edition, London, Taylor & Francis Group, 798 pp.