

DetECCIÓN DE CIANOBACTERIAS Y SUS TOXINAS. UNA REVISIÓN

Roset J, Aguayo S, Muñoz MJ

Centro de Investigación en Sanidad Animal (CISA-INIA), 28150 Valdeolmos (Madrid). Tfno: 91 620 23 00. Fax: 91 620 22 47
e-mail: reoyo@inia.es

Recibido 20 de Febrero de 2001 / Aceptado 14 de Mayo de 2001

Resumen: La creciente eutrofización de los ambientes acuáticos favorece el crecimiento masivo (blooms) de algas, y poblaciones de cianobacterias, capaces de producir potentes toxinas con graves repercusiones en la salud pública y en la sanidad animal.

Más del 50% de las proliferaciones masivas de cianobacterias son tóxicas. Dentro de una misma especie de cianobacteria, existen cepas que producen toxinas y otras que no las producen. Se hace necesario disponer de métodos que permitan detectar y cuantificar cianobacterias y sus toxinas. Los tradicionales bioensayos en ratón para conocer la toxicidad de una muestra sospechosa, se van sustituyendo por otros bioensayos y diversos métodos *in vitro* que están demostrando ser eficaces. El avance experimentado en las técnicas inmunológicas y enzimáticas ha facilitado la detección rápida de toxinas mediante el empleo de kits comerciales y no comerciales. Uno de los campos más prometedores de investigación, consiste en la determinación de las secuencias genéticas que diferencian géneros incluso cepas tóxicas, así como otras que codifican para la síntesis de toxinas; métodos que permitirán prever el desarrollo de cianobacterias o sus toxinas. El control y seguimiento de los desarrollos masivos de cianobacterias, es muy importante para garantizar la calidad del agua. El reconocimiento de los factores ambientales que influyen o desencadenan la aparición de blooms, es otro factor fundamental para la prevención y el control.

Palabras clave: Cianobacterias, blooms algales, Neurotoxinas, Hepatotoxinas, métodos de detección.

Abstract: Cyanobacteria and toxins detection. A review. Water environment eutrophication increases the risk of harmful bloom development, like cyanobacterial blooms, which can produce potent toxins able to affect public and animal health. More than 50% of the cyanobacterial proliferation are toxic. Both toxigenic (toxin producers) and non-toxigenic strains, may exist within a single specie of cyanobacteria. It is very important to develop different methods to detect and quantify cyanobacteria and theirs toxins. Although mouse bioassay has been usually used for toxicity testing for cyanobacterial toxins from suspicious samples, actually is being replaced by different *in vitro* assays that show efficient results. Advancements in immunoassay and biochemical techniques are providing rapid toxins detection methods. Even, several commercial and non commercial kits are available. One of the more promising methods consists of developing molecular probes that recognise DNA or RNA unique sequences to a given species, or single toxigenic strains.

All these methods will allow to preview the development of cyanobacterial blooms and their toxins. Also, they contribute to develop studies of control and monitoring.

Key words: Cyanobacteria, Harmful Algal Bloom, Neurotoxin, Hepatotoxin, detection methods.

Introducción

Las cianobacterias o cianofíceas (algas azules), son microorganismos procariontes, aeróbicos y fotoautótrofos. La fotosíntesis es su principal modo de obtención de energía. Se encuentran entre los organismos más primitivos de la tierra; su origen se estima en unos 3500 millones de años.

Su facilidad de crecimiento favorece su aparición tanto en el suelo como en el medio acuático, preferentemente en los ambientes dulceacuícolas de aguas alcalinas o neutras con pH entre 6 y 9, y temperaturas entre 15 y 30°C. Prefieren una alta concentración de nutrientes, principalmente nitrógeno y fósforo.

La creciente eutrofización de los ambientes acuáticos puede favorecer su proliferación masiva o “floración” (HABs: harmful algal blooms o simplemente “Blooms”). No obstante, se han observado blooms altamente toxigénicos en aguas de carácter oligotrófico –con escasez de nutrientes–, como en determinados lagos alpinos [1].

A parte de los efectos negativos que se producen como consecuencia del crecimiento masivo de estas poblaciones, como son las alteraciones en la calidad del agua (en especial en el pH y oxígeno disuelto), y otras alteraciones indirectas por modificación de parámetros de toxicidad (fundamentalmente por el pH); actualmente se sabe que algunas especies producen potentes toxinas, capaces de originar efectos agudos y crónicos en el hombre, en animales y vegetales [2]. Se estima que más del 50% de estos blooms son tóxicos [3,4].

Las primeras intoxicaciones de poblaciones humanas por el consumo de agua contaminada por cepas tóxicas de cianobacterias, fueron descritas en Australia, Inglaterra, China y África del Sur [5]. En Brasil, se

conocen varios casos [6], pero el más grave hasta el momento, fue el episodio de Caruaru (Brasil), en 1996, donde murieron más de 50 enfermos sometidos a hemodiálisis en los que se utilizó agua contaminada con toxinas de cianobacterias [7].

Cianobacterias y producción de toxinas

Varias especies de cianobacterias en ambientes acuáticos, pueden producir potentes toxinas; sin embargo, dentro de la misma especie, pueden existir cepas productoras y no productoras. En muchos casos, las toxinas son metabolitos secundarios en la formación de los fotopigmentos, que se acumulan en el citoplasma en determinadas situaciones [8]. La producción de estas endotoxinas es máxima cuando las condiciones de crecimiento son óptimas, por este motivo, se observa una producción directamente proporcional al aumento de la biomasa [9]. Cuando las condiciones ambientales son desfavorables, las cianobacterias mueren, produciéndose la lisis celular y la liberación de las toxinas al medio [8].

Las toxinas de las cianobacterias se suelen agrupar principalmente en neurotoxinas y hepatotoxinas. Las neurotoxinas son producidas principalmente por especies y cepas de los géneros: *Anabaena*, *Aphanizomenon* [10], *Oscillatoria* [11], *Trichodesmium* [12] y *Cylindrospermopsis* [10-13].

Se conocen más de cinco neurotoxinas. La **anatoxina-a**, fue la primera en ser química y funcionalmente definida. Se trata de un importante bloqueador neuromuscular post-sináptico que impide la degradación de la acetilcolina ligada a los receptores. Un mecanismo semejante tiene la **anatoxina-a (s)**, estructuralmente caracterizada [14]. Otras neurotoxinas del tipo PSP (“Paralytic Shellfish Poisoning”), inicialmente caracterizadas en dinoflagelados marinos causantes de las mareas rojas, han sido aisladas en cepas de cianobacterias de los géneros *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Lyngbia* y *Cylindrospermopsis* [15].

Las neurotoxinas del grupo de las PSP, inhiben la conducción nerviosa bloqueando los canales celulares de sodio.

La acción de las neurotoxinas es rápida, causan la muerte por parada respiratoria a los pocos minutos de la exposición. La mayoría han sido identificadas como alcaloides o compuestos organofosforados neurotóxicos. Dosis orales producen la muerte aguda sólo en concentraciones elevadas, aunque la toxicidad de las células de las cianobacterias es alta, y los animales pueden ingerir una dosis letal al beber unos pocos mililitros de agua conteniendo altas concentraciones de cianobacterias procedentes de las acumulaciones superficiales (“mantas”, “scum”) de los blooms remansados en las orillas.

Las **Hepatotoxinas** ocasionan el tipo más común de intoxicación relacionado con las cianobacterias. De

Tabla 1. Tipos, origen y propiedades de las toxinas de cianobacterias [57]

Toxina	Géneros productores	Estructura molecular	Número de variantes
NEUROTOXINAS			
Anaxotina-a	<i>Anabaena</i> , <i>Microcystis</i> , <i>Oscillatoria</i> , <i>Phormidium</i> , <i>Aphanizomenon</i>	Alcaloide Amina secundaria	1
Homoantotoxina-a	<i>Phormidium</i>	Amina secundaria Alcaloide	1
Toxinas PSP, “Paralytic Shellfish Poisonig” (Saxitoxinas, neo-saxitoxinas, Toxinas GTX y GTX)	<i>Aphanizomenon</i> , <i>Anabaena</i>	Alcaloides	Al menos 8
Anatoxina-a (s)	<i>Anabaena</i>	Éster de guanidina metil fosfato	1
HEPATOTOXINAS			
Nodularina	<i>Nodularia</i>	Pentapéptido cíclico	6
Microcistinas	<i>Microcystis</i> , <i>Anabaena</i> , <i>Nostoc</i> , <i>Oscillatoria</i>	Heptapéptido cíclico	>50
Cilindrospermosina	<i>Cylindrospermopsis</i> , <i>Umezakia</i>	Alcaloide cíclico guanidina	1
ENDOTOXINAS			
LPS	Muchos géneros	Lipopolisacárido	>3

acción más lenta, causan la muerte en horas o a los pocos días.

Estas hepatotoxinas son péptidos [16], y fueron caracterizadas [17] como heptapéptidos cíclicos (microcistinas), y como pentapéptidos (nodularinas). La estructura general de las microcistinas fue definida por Carmichael y col. en 1988. Actualmente son conocidas más de 8 nodularinas distintas, clasificadas de acuerdo con las variaciones en su grado de metilación, composición e isomerización de sus aminoácidos. Las especies identificadas como productoras están incluidas en los géneros *Microcystis*, *Anabaena*, *Nodularia*, *Oscillatoria*, *Nostoc* y *Cylindrospermopsis* [18].

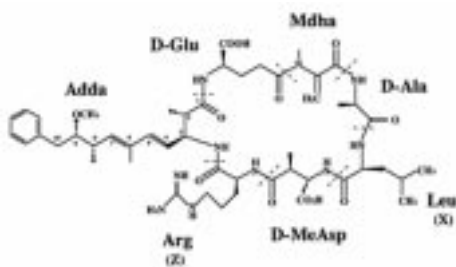


Figura 1. Estructura general de las microcistinas. Es un ciclo (-D-Ala-X-D-MeAsp-Z-Adda-D-Glu-Mdha-), en la que X y Z pueden ser varios L aminoácidos, D-MeAsp es D-eritro- β -ácido metilaspártico, Adda es un aminoácido atípico: 3-amino-9-metoxi-10-fenil-2,6,8-trimetil-deca-4,6-ácido dienóico, y Mdha es N-etildehidroalanina. En la figura se representa concretamente la Microcistina-LR (MCYST-LR).

Las hepatotoxinas llegan a los hepatocitos por medio de los receptores de los ácidos biliares [19-21] y provocan una retracción de los hepatocitos y una pérdida de contacto entre ellos y las células que forman los capilares sinusoides [22]. El hígado pierde su arquitectura y desarrolla graves lesiones internas. La pérdida de contacto entre las células origina espacios internos (vacuolización) que provoca la afluencia de sangre capilar. Esto ocasiona un edema hepático (hepatomegalia), fácilmente observable en la necropsia, acompañado de la anastomosis de los vasos sanguíneos, observable al trasluz en los hígados afectados.

Otro alcaloide hepatotóxico, denominado cilindrospermosina, fue aislado en algunas especies de cianobacterias (especialmente en climas tropicales y templados): *Cylindrospermopsis raciborskii* [23] y en *Umenzaquia natans* [24]. Su mecanismo de acción consiste en la inhibición de la síntesis proteica, causando daños severos en las células renales de los animales ensayados.

A través del estudio de los mecanismos de acción de esas hepatotoxinas, se ha demostrado que varias microcistinas y nodularinas son potentes inhibidores de las fosfatasa tipo 1 y 2A de las células eucariontes [25-27].

Estas toxinas han resultado ser potentes promotores de tumores hepáticos [21,28,29] y, por tanto, la aparición

de especies potencialmente productoras en nuestros ambientes acuáticos, precisa de estudios de control y seguimiento ante el peligro de que pequeñas dosis de toxinas en exposiciones prolongadas [30], puedan aumentar la incidencia de cáncer hepático en las poblaciones expuestas.

Niveles máximos de referencia para las toxinas

En 1997, la Organización Mundial de la Salud (OMS) [31], estableció como valor provisional de referencia, 1 $\mu\text{g/litro}$ como nivel máximo aceptable para el consumo oral diario de microcistina-LR, en aguas de abastecimiento público.

Aunque en este momento las normativas europeas en materia de calidad de aguas no contemplan la obligatoriedad de detectar y medir toxinas de cianobacterias; sin embargo, la nueva Directiva marco de aguas [32], establece como criterio para determinar el "estado ecológico", la necesidad de conocer la composición y abundancia de taxones de fitoplancton, la carga de nutrientes y la turbidez en lagos y otras aguas continentales. Sin embargo, al no existir una categoría específica para los embalses, se puede dificultar su aplicación en España. Junto con otros, estos criterios de calidad se utilizarán para trazar los objetivos ambientales de mejora de la calidad del agua de los países comunitarios.

En la mayoría de los países europeos, los organismos responsables del abastecimiento de agua potable y las agencias de medio ambiente, han incluido planes de vigilancia y control de cianobacterias y sus toxinas, para asegurar la calidad del suministro de las aguas potables y evitar procesos toxicológicos. En España no existe ninguna regulación, sin embargo, algunos países como Gran Bretaña, cuentan con legislación y métodos normalizados [33].

Aunque en España los episodios científicamente documentados son escasos, se ha constatado blooms de cianobacterias tóxicas en embalses de abastecimiento público [34].

Metodologías actuales y avanzadas en la detección e identificación de blooms de cianobacterias y sus toxinas

La identificación de los organismos causantes de blooms tóxicos, es con frecuencia el mejor modo de monitorizar una zona susceptible de sufrir dichas proliferaciones. Los estudios en este campo, han estado orientados a la identificación de las especies por microscopia, apoyados con la valoración de la toxicidad mediante bioensayos. Estos métodos son bastante intensivos y lentos, por lo que se están dedicando muchos esfuerzos en el desarrollo de metodologías automatizadas.

Tabla 2. Algunas posibles rutas de exposición a toxinas cianobacterianas vía aguas continentales (D), aguas de transición (S) o marinas (M) y actividades con riesgo

Ruta de exposición	Medio	Actividad
Contacto de la piel	D, S, M	1. Actividades recreativas, contacto directo con la capa superficial, espumas o tapices de cianobacterias tóxicas.
	D, S, M	2. Actividades recreativas o laborales con contacto directo con aguas en las que se ha producido un bloom, o haya toxinas libres.
	D	3. Baño, ducha con agua tratada conteniendo bloom tóxico o toxinas libres.
Agua de bebida	D, S, M	1. Ingestión accidental de cianobacterias tóxica.
	D	2. Bebida de agua natural en la que se ha producido un bloom o toxinas libres.
	D	3. Bebida de agua tratada conteniendo bloom tóxico o toxinas libres.
Inhalación	D, S, M	1. Ducha, prácticas laborales, deportes acuáticos.
Consumo de alimentos	D, S, M	2. Moluscos o y otros productos de maricultura conteniendo toxinas.
	D, S	3. Consumo de productos vegetales si las toxinas se acumulan por riego por aspersión.
Hemodiálisis	D	1. Exposición al agua de hemodiálisis conteniendo toxinas de cianobacterias.

Modificada de [4] y [57]

Análisis Físico-Químicos

Cuantificación de la biomasa: Se utilizan técnicas convencionales como clorofila-a, recuento microscópico, peso seco, Carbono orgánico particulado, o ATP/Carbono orgánico [35].

En la actualidad es posible identificar y estimar las concentraciones de otros pigmentos fotosintéticos accesorios, para estudiar la dinámica, el estado fisiológico, la estructura y el potencial de productividad de la comunidad. Algunos de estos pigmentos lipofílicos de cianobacterias son: *Zeaxantina* / *Mixoxantofila* / *Echinenona* / *Oscillaxantina* / *B-Caroteno*, los cuales, al encontrarse sólo en este grupo, sirven de indicadores de su presencia en el medio. La metodología de extracción [9,36], separación e identificación cromatográfica por HPLC, está bien desarrollada [37,38]. También se dispone de metodologías no cromatográficas [39].

Uno de los procedimientos más sensibles para la identificación de microcistinas y nodularinas, es la cromatografía de alta resolución con detector UV-diodos (HPLC-DAD). Se trata de un método rápido, ampliamente utilizado y normalizado en algunos países [33]. Sin embargo, al no ser una técnica específica, sino basada en el reconocimiento de los espectros de absorción ultravioleta de eluatos a tiempos de retención determinados, necesita confirmar la presencia de toxinas mediante otras técnicas accesorias como el bioensayo o los test enzimáticos.

También se utilizan variantes de la electroforesis capilar micelar para la detección de la microcistinas, y el ácido okadaico de cianobacterias [40].

Bioensayos

Bioensayo de toxicidad en ratón: normalmente se utilizan machos de ratón albino suizo, al cual se le inyectan intraperitonealmente entre 0,1 y 1 mL de la solución de ensayo. Esta solución, en agua o solución salina fisiológica, contiene bien un lisado por sonicación, filtración y posterior congelación de las células de la muestra problema; bien un extracto de la muestra problema.

Se observa durante 24 horas la sintomatología presentada por el ratón, y se procede a un estudio post-mortem de los tejidos afectados para identificar y concentrar la toxina [41,42].

La DL₅₀ intraperitoneal (i.p.) en ratón, para la neurotoxina purificada, es de 200 µg/kg de peso corporal con un tiempo de supervivencia de entre 1 y 20 minutos para la anatoxina-a. Para la anatoxina-a(s), la DL₅₀ en ratón es de 20 µg/Kg de peso corporal, y por tanto, diez veces más potente que la anatoxina-a. La DL₅₀ (i.p.) en ratones para neurotoxinas PSP es de 10 µg/kg de peso corporal. Todas las microcistinas presentan una DL₅₀ (i.p.) entre 60 y 70 ug/kg de peso corporal [15].

Bioensayos en organismos acuáticos: Se utilizan los géneros *Daphnia* o *Artemia*, dependiendo del medio de origen de la muestra. También se han desarrollado bioensayos en peces y ranas [43].

Ensayos alternativos: los cultivos de hepatocitos de rata presentan una buena correlación con el ensayo en ratón [41,44]. También se ha desarrollado un test con fibroblastos (V79 de hamster) para microcistina aunque se dan falsos positivos y falsos negativos que enmascaran los resultados [45]. Existen tests para la saxitoxina y se

han empleado líneas celulares de neuroblastoma en kits comerciales [42,46].

Recientemente, se ha desarrollado un bioensayo *in vitro* utilizando membranas de cerebro de trucha como procedencia de la enzima colinesterasa [47]. Otro ensayo de unión a un receptor [42], está basado en el desplazamiento competitivo de la toxina radiomarcada en sinaptomas cerebrales de rata preparados con toxinas.

Ensayos enzimáticos: Inhibición de la Fosfatasa: Estos ensayos utilizan los procesos bioquímicos afectados por las toxinas a nivel celular y molecular para desarrollar ensayos *in vitro* de mucha sensibilidad. Su límite de detección es de nanogramos. También se puede realizar sin marcaje radiactivo mediante un método colorimétrico [48]. Se ha encontrado una correlación lineal de $r = 0,74$ entre los resultados obtenidos por HPLC y los obtenidos por este método de PP2A [41].

Técnicas inmunológicas: Se han desarrollado anticuerpos policlonales [49], y kits de ELISA para microcistinas que visualizan los efectos mediante una reacción de peroxidasa [42]. También se han desarrollado anticuerpos monoclonales para microcistinas [50], que reconocen un epítipo específico del antígeno, y que se detectan por fluorescencia utilizando un citómetro o un fluorímetro. Se trata de un ensayo rápido, sensible, específico y de procedimiento sencillo, con un nivel de detección de microgramos [41]. Se han producido anticuerpos monoclonales para distintos tipos de microcistinas

como la LR, RR y YR y otras como la LY y LA, aunque para estas últimas ofrecen menos respuesta. Hay que tener cuidado con los falsos positivos, especialmente en los ensayos con microcistina LR [41]. También se han producido anticuerpos monoclonales para las nodularinas.

Técnicas genéticas: Determinadas secuencias de material genético (rRNA y DNA), permiten diferenciar géneros como *Mycrocistis* [51], *Nodularia* [52], *Synechocystis* y *Synechococcus* [53], así como muchos otros [54], o incluso cepas tóxicas dentro de una misma especie. Determinadas secuencias específicas codifican para la síntesis de las toxinas y son específicas de la cepa en cuestión. Estas se pueden identificar mediante RFLP y sintetizar en grandes concentraciones utilizando técnicas de PCR. Los productos de PCR se pueden utilizar para construir sondas marcadas, aunque también permiten estudiar y cuantificar la biodiversidad de la población aplicando electroforesis y calculando la abundancia relativa de los distintos rRNA o rDNA de cada grupo taxonómico, previa comparación con una base de datos de genes del material obtenido [51- 53,55,56]. Estas técnicas permitirían desarrollar sistemas de monitorización y detección a largo plazo, y por tanto alertar de una futura proliferación cianobacteriana.

Los ensayos más utilizados para la detección y para la cuantificación de las toxinas cianobacterias, se refieren en la Tabla 3.

Tabla 3. Métodos y características de los ensayos de toxicidad para las toxinas de cianobacterias

Método	Duración	Infraestructuras	Identificación de toxinas		Sensibilidad (1)	Validez para Screening
			Modo de acción	Especificidad		
Ratón	Min.-horas	Pli, NI, Alc.	Sí	no	Sí	Sí (rápido)
Daphnia	Días	Pli, Fácil	No	no	Sí	Sí (lento)
Artemia	Días	Fácil	No	no	Sí	Sí (lento)
Microtox	Min.	Fácil, E	No	no	no	no
Citotoxicidad	Min.-días	Pli, Alc, E	Sí (2)	no	Sí	Sí (2) (variable)
Inmunoensayos	Min.-Horas	Fácil, E (3)	Sí (4)	Sí (4)	Sí	Sí (rápido)
Inhibición de la fosfatasa						
1. Radioisotópico	Min.-horas	Pli, NI, Alc, E	Sí (5)	no	Sí	Sí (5) (Rápido)
2. Colorimétrico	Min.	Fácil, E	Sí (5)	no	Sí	Sí (5) (Rápido)
Colinesterasa	Min.	Fácil, E	Sí (6)	no	Sí	Sí (6) (Rápido)
ELISA	Horas	Fácil, E	Sí	Sí	Sí	Sí (Rápido)

Procede de [58]

Pli: Preparación de laboratorio intensiva. NI: Necesidad de licencia. Alc: Auxiliares de laboratorios cualificados.

Fácil: Fácil de utilizar. E: Requiere equipamientos especiales.

(1) Sensible a las toxinas, en ese caso significa que el ensayo no presenta falsos negativos.

(2) Los hepatocitos primarios pueden revelar hepatotoxinas, y las células neuroblásticas murinas pueden detectar neurotoxinas bloqueadoras del canal de sodio. Por esta razón, estos ensayos pueden utilizarse para la búsqueda de sus correspondientes toxinas.

(3) Para algunos ensayos no se requiere equipamientos especiales.

(4) La especificidad de determinados ensayos depende de la especificidad de los anticuerpos (reactividad cruzada)

(5) Sólo detectan inhibidores de la fosfatasa (hepatotoxinas)

(6) Sólo se detecta la Anatoxina-a, y es válida por tanto para la detección de la inhibición de la acetilcolinesterasa.

Crterios de actuación

Ante la sospecha de un bloom de cianobacterias, debe aplicarse el principio de precaución, asumiéndose como toxigénico mientras no se demuestre lo contrario. Un procedimiento de trabajo actual comprendería: Muestreo periódico. Análisis microscópico con identificación y recuento de colonias de cianobacterias. Ensayo de toxicidad aguda por exposición intraperitoneal en ratón. Según sintomatología, confirmación de presencia de hepatotoxinas o neurotoxinas mediante HPLC-DAD y otras técnicas accesorias como el ensayo de la fosfatasa o ELISA. En caso de determinarse la presencia de un bloom tóxico, deberían de desplegar un conjunto de medidas para evitar el acceso de personas y animales, así como limitar los usos del agua.

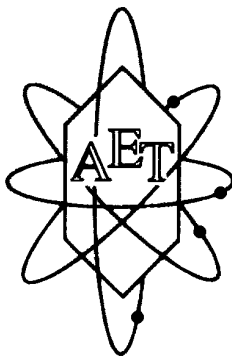
Finalmente, resultaría fundamental favorecer la investigación, el desarrollo y la innovación de técnicas de detección, cuantificación y eliminación de toxinas y cianobacterias, sistemas de predicción de riesgos, e incorporar sistemas de vigilancia y control de la presencia de cianobacterias y sus toxinas, al menos en las redes de suministro de agua potable, especialmente en las épocas más calurosas del año.

Bibliografía

1. Mez K, Beattie KA, Codd GA, Hanselmann K, Hauser B, Naegeli H and Preisig HR (1997): Identification of a microcystin in benthic cyanobacteria linked to cattle deaths on alpine pastures in Switzerland. *European Journal of Phycology* 32, 111-117.
2. Codd GA, Metcalf JS and Beattie KA (1999): Retention of *Microcystis aeruginosa* and microcystin by salad lettuce (*Lactuca sativa*) after spray irrigation with water containing cyanobacteria. *Toxicon* 37, 1181-1185.
3. Costa SM and Azevedo SMFO (1994): Implantação de um Banco de Culturas de Cianofíceas Tóxicas. *Iheringia - Série Botânica*, 45: 69-74.
4. Codd GA, Bell SG, Kaya K, Ward CJ, Beattie KA and Metcalf JS (1999): Cyanobacterial toxins, exposure routes and human health. *European Journal of Phycology* 34, 405-415.
5. Falconer IR (1994): Health implications of Cyanobacterial (blue-green algae) toxins. In: *Toxic Cyanobacteria current status of research and management*. Eds. Steffensen DA & Nicholson BC. Proceedings fo an International Workshop. Adelaide. Australia.
6. Teixeira MGLC, Costa MCN, Carvalho VLP, Pereira MS and Hage E (1993): Gastroenteritis epidemic in the area of the Itaparica, Bahia, Brazil. *Bulletin of PAHO*, 27(3): 244-253.
7. Azevedo SMFO (1996): Toxic cyanobacteria and the Caruaru tragedy. IV Simpósio da Sociedade Brasileira de Toxinologia.
8. Paerl HW and David F Millie (1996): Physiological ecology of toxic aquatic cyanobacteria. *Phycologia*. Volume 35, 160-167.
9. Robillot C, Winh J, Puisieux-Dao S and Marie-Claire Hennion (2000): Hepatotoxin production kinetic of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* PCC 7820, as determined by HPLC- Mass Spectrometry and protein phosphatase bioassay. *Environ. Sci. Technol.* 34, 3372-3378.
10. Mahmood NA and Carmichael WW (1986): Paralytic shellfish poisons produced by the freshwater cyanobacterium *Aphanizomenon flos-aquae* NH-5. *Toxicon*, 24:175-186.
11. Sivonen K, Himberg K, Luukainen R, Niemela S, Poon GK and Codd GA (1989): Preliminary characterization of neurotoxic cyanobacterial blooms and strains from Finland. *Toxicity Assessment*, 4:339-352.
12. Hawser SP, Codd GA, Capone DG, Carpenter EJ (1991): A neurotoxic factor associated with the bloom-forming cyanobacterium *Trichodesmium*. *Toxicon*, 29:277-278.
13. Carmichael WW, Mahmood NA, Hyde EG (1990): Natural toxins from cyanobacteria (ble-green algae). In *Marine Toxins: Origin, Structure, and Molecular Pharmacology*, eds. Hall S & Strichartz G, pp. 87-106. Washington, DC: American Chemical Society.
14. Matsunaga S, Moore RE, Mieczkura WP, Carmichael WW (1989): Anatoxin-a(s), a potent anticholinesterase from *Anabaena flos-aquae*. *Journal of American Chemical Society*. 111: 8021-8023.

15. Carmichael WW (1994): The toxins of Cyanobacteria. *Scientific American*. 270(1), pp. 78-86.
16. Bishop CT, Anet EFLJ, Gorham PR (1959): Isolation and identification of the past-death factor in *Microcystis aeruginosa* NRC-1. *Can. J. Biochem. Physiol.* 37:453-471.
17. Botes DP, Viljoen CC, Kruger H, Wessels PL, Williams DH (1982): Configuration assignments of the amino acid residues and the presence of N-methyldehydroalanine in toxins from the blue-green algae *Microcystis aeruginosa*. *Toxicon*, 20:1037-1042
18. Carmichael WW (1992): Cyanobacteria secondary metabolites - The Cyanotoxins. *J. Appl. Bact.*, 72: 445-459.
19. Runneger MTC, Falconer IR, Silver J (1981): Deformation of isolated rat hepatocytes by a peptide hepatotoxin from the blue-green algae *Microcystis aeruginosa*. *Archives of Pharmacology*. 317: 268-272.
20. Eriksson JE, Grönberg L, Nygård S, Slotte JP, Meriluoto JA0 (1990): Hepatocellular uptake of 3H-dihydromicrocystin-LR a cyclic peptide toxin. *Biochim. Biophys. Acta*. 1025:60.
21. Falconer IR (1991): Tumor Promotion and Liver Injury Caused by Oral Consumption of Cyanobacteria. *Environmental Toxicology and Water Quality*, 6: 177-184.
22. Runneger MTC and Falconer IR (1986): Effects of toxin from the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* on ultrastructural morphology and actin polymerization in isolated hepatocytes. *Toxicon*, 24: 109-115.
23. Ohtani I, Moore RE, Runneger MTC (1992): Cyindrospermopsin, a potent hepatotoxic from the blue-green algae *Cyindrospermopsis raciborskii*. *J. Am. Chem. Soc.* 114:7941.
24. Harada K-I, Ohtani I, Ivamoto K, Suzuki M, Watanabe MF, Terao K (1994): Isolation of cyindrospermopsin from cyanobacterium *Umezakia natans* and its screening method. *Toxicon*.32: 73.
25. Mackintosh C, Beattie KA, Klump S, Cohen P, Codd GA (1990): Cyanobacterial microcystin-LR is a potent and specific inhibitor of protein phosphatases 1 and 2A from both mammals and higher plants. *FEBS*
26. Yoshizawa S, Matsuhima R, Watanabe MF, Harada K, Ichihara A, Carmichael WW, Fujiki H (1990): Inhibition of protein phosphatase by microcystin and nodularin associated with hepatotoxicity. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 116:609-614
27. Matsuhima R, Yoshigawa S, Watanabe MF, Harada K, Furusawa M, Carmichael WW, Fujiki H (1990): *In vitro* and *in vivo* effects of protein phosphatases inhibitors, microcystins and nodularin, on mouse skin and fibroblasts. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 171(2): 867-874.
28. Fujiki H (1992): Is the inhibition of Protein Phosphatase 1 and 2^a activities a general mechanism of tumor promotion in human cancer development *Molecular Carcinogenesis*, 5: 91-94.
29. Nishiwaki-Matsushima R, Oohta T, Nishiwaki S, Sugunuma M, Kohyama K, Ishikawa T, Carmichael WW and Fujiki H (1992): Liver tumor promotion by the cyanobacterial cyclic peptide toxin microcystin-LR. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, 118:420-424.
30. Lambert TW, Boland MP, Holmes CFB, Hruddy SE (1994): Quantitation of the microcystin hepatotoxins in water at environmentally relevant concentrations with the protein phosphate bioassay. *Environ. Sci. Technol.* 28(4):753-755.
31. Gupta S (1998): Cyanobacterial toxins: Microcystin-LR. Guidelines for drinking-water quality, 2nd ed. Addendum to vol. 2. Health criteria and other supporting information. Génova, Organización Mundial de la Salud. pp. 95-110
32. CE (2000). Directiva 2000/60/CE del Parlamento Europeo y del Consejo de 23 de octubre de por la que se establece un marco comunitario de actuación en el ámbito de la política de aguas.
33. UK Environment Agency. (1998). The determination of microcystin algal toxins in raw and treated waters by high performance liquid chromatography. In: Environment Agency, Methods for the examination of waters and associated materials.
34. Gordo Muñoz MC y col. (1999): Presencia de microorganismos en las aguas prepotables y sus consecuencias: cianobacterias. XVIII Jornadas Técnicas de la Asociación España de Abastecimientos de Agua y Saneamiento. I: 301-315.
35. Millie DF, Schofield OM, Dionigi CP and Johnsen PB (1995): Assessing noxious phytoplankton in aquaculture systems using bio-optical methodologies: a review. *Journal of the World Aquaculture society*. Vol.26, n° 4, 329-345.
36. Piñeiro N, Gago Martínez A and Rodríguez Vázquez JA (1999): Capillary electrophoresis with diode array detection as an alternative analytical method for paralytic and amnesic shellfish toxins. *Journal of Chromatography A*, 847: 223-232
37. Wilhelm C, Rudolph Y and Renner W (1991): A quantitative method based on HPLC-aided pigment analysis to monitor structure and dynamics of the phytoplankton assemblage- A study from Lake Meerfelder Maar (Eifel, Germany). *Arch.Hydrobiol.* 123, 1, 21-35.

38. Yacobi YZ, Pollinger U, Gonen Y, Gerhardt V and Sukenink A (1996): HPLC analysis of phytoplankton pigments from Lake Kinneret with special reference to the bloom-forming dinoflagellate *Peridinium gatunense* (Dinophyceae) and chlorophyll degradation products. *Journal of Plankton Research*. Vol. 18, nº 10, pp.1781-1796.
39. Dickman M and Han X (1995): Paleopigment evidence of competition between phytoplankton and a cyanobacterial algal mat in a meromictic lake near Toronto, Ontario Canada. *Hydrobiologia*. 306, 131-146.
40. Bouaïcha N, Hennion M and Sandra P (1997): Détermination de phycotoxines de milieux aquatiques par électrophorèse capillaire. *C.R.Soc.Biol.*, 191, 313-327.
41. Harada K, Kondo F and Lawton L (1999): Laboratory analysis of cyanotoxins. In: *Toxic Cyanobacteria in water*. [Eds] Ingrid Chorus and Jamie Bartram. World health organization and E&FN SPON.
42. Pierce RH and Gary J Kirkpatrick (2001): Innovative techniques for harmful algal toxin analysis. Annual review. *Environmental Toxicology and Chemistry*. Vol. 20, nº1, pp: 107-114.
43. Fischer WJ and Daniel R Dietrich (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.
44. Aune T and Berg K (1986): Use of freshly prepared rat hepatocytes to study toxicity of blooms of blue-green algae *Microcystis aeruginosa* and *Oscillatoria agardhii*. *J.Toxic. Environ. Health*. 19, 325-336.
45. Lawton LA, Edwards C and Codd GA (1994): Extraction and high-performance liquid chromatographic method for the determination of microcystins in raw and treated waters. *Analyst*. 119, 1525-1530.
46. Mur LR, Skulberg OM and Utkilen H (1999): Cyanobacteria in the environment. In: *Toxic Cyanobacteria in water* [Eds] Ingrid Chorus and Jamie Bartram. World health organization and E & FN SPON.
47. Jones Susan: Development and use of Immuno- and Bioassays for detection of cyanobacterial Toxins. Abstrac in CERC Fisheries and aquatic Resources Research. [en línea] <http://222.cerc.usgs.gov/Research/fisheries.htm>.
48. Ann J and Carmichael WW (1994): Use of a colorimetric protein phosphatase inhibition assay and enzyme linked immuno sorbent assay for the study of microcystins and nodularins. *Toxicol*, 32, 1495-1507
49. Anderson DM (1995): Identification of Harmful Algal species using molecular probes: an emerging perspective. En: Lassus P, Arzul G, Erard E, Gentien P, Marcaillou C, Harmful Marine Algal Blooms, Technique et Documentation, Lavoisier Intercept Ltd, 3-13.
50. Nagata S, Tsutsumi T, Yoshida F and Ueno Y (1999): A new type sandwich immunoassay for microcystin: production of monoclonal antibodies specific to the immune complex formed by microcystin and an antimicrocystin monoclonal antibody. Búsqueda en De. John Willey and Sons, Ltd.
51. Kondo R, Komura M, Hiroishi S. and Yoshihiko Hata (1998): Detection and 16S rRNA sequence analysis of a bloom-forming cyanobacterial genus *Microcystis*. Short Paper. *Fisheries Science*. 65(5): 840-841.
52. Bolch CJS, Orr PT, Jones GJ and Susan I Blackburn (1999): Genetic, morphological, and toxicological variation among globally distributed strains of *Nodularia* (Cyanobacteria). *J.Phycol*. 36, 339-355.
53. Honda D, Yokota A and Sugiyama J (1999): Detection of seven major evolutionary lineages in cyanobacteria based on the 16S rRNA gene sequence analysis with new sequences of five marine *Synechococcus* strains. *J. Mol. Wvol. Jun*, 48(6):723-739.
54. Nübel U, García-Pichel F and Gerar Muyzer (1997): PCR primers to amplify 16S rRNA genes from Cyanobacteria. *Applied and Environmental Microbiology*. Aug.1997: 3327-3332.
55. Fergusson KM and Christopher P Saint (2000): Molecular phylogeny of *Anabaena circinalis* and its identification in environmental samples by PCR. *Applied and Environmental Microbiology*. Sept. 2000. Pp: 4245-4248.
56. Rudi K, Skulberg OM, Skulberg R and Jokobsen KS (2000): Application of sequence-specific labeled 16S rRNA gene oligonucleotide probes for genetic profiling of cyanobacterial abundance and diversity by array hybridization. *Appl.Environ. Microbiol. Sep*; 66(9):4004-4011
57. Codd GA and Bell SG (1996): The Occurrence and Fate of Blue-Green Algal Toxins. National Rivers Authority R & D Report No. 29. HMSO, London, 30 pp.
58. Bell SG and Codd GA (1996): Detection, analysis and risk assessment of cyanobacterial toxins. In: *Agricultural Chemicals and the Environment*. No 5. Eds. R.E. Hester and R.M. Harrison. The Royal Society of Chemistry, Cambridge, 109-122.



Asociación Española de Toxicología

aetox@uhm.es

Revista de Toxicología

revista.toxicologia@ccma.csic.es

<http://tox.umh.es/aet/revista/>

XIV CONGRESO ESPAÑOL DE TOXICOLOGÍA

Murcia, 26-29 de Septiembre de 2001

Organiza: Dr. Antonio Juan García Fernández (ajgf@fcu.um.es)

Área de Toxicología. Facultad de Veterinaria

Universidad de Murcia. Campus de Espinardo. 30100 Murcia

<http://www.um.es/grupos/grupo-toxicologia/congreso.html>